



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**SIÇAN OVARYUMUNUN VİTRİFİKASYON SONRASI
FRAGMENTASYONU VE MATÜRASYON
AKTİVATÖRLERİ İÇEREN İN VİTRO KÜLTÜRÜNÜN
OTOTRANSPLANTASYON SONRASI FOLİKÜL
KORUNMASINA ETKİSİ**

MERVE EREMRE YANIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA - 2020



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**SIÇAN OVARYUMUNUN VİTRİFİKASYON SONRASI
FRAGMENTASYONU VE MATÜRASYON AKTİVATÖRLERİ
İÇEREN İN VİTRO KÜLTÜRÜNÜN
OTOTRANSPLANTASYON SONRASI FOLİKÜL
KORUNMASINA ETKİSİ**

Merve EREMRE YANIK

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DANIŞMAN:
Doç.Dr. Berrin AVCI**

BURSA-2020

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum;

“Sıçan ovaryumunun vitrifikasyon sonrası fragmantasyonu ve matürasyon aktivatörleri içeren in vitro kültürünün ototransplantasyon sonrası folikül korunmasına etkisi” adlı çalışmanın, bütün süreçlerinde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığımı ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Merve EREMRE YANIK



SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi **Merve EREMRE YANIK** tarafından hazırlanan “**Sıçan Ovaryumunun Vitrifikasyon Sonrası Fragmantasyonu ve Matürasyon Aktivatörleri İçeren İn Vitro Kültürünün Ototransplantasyon Sonrası Folikül Korunmasına Etkisi**” konulu Yüksek Lisans tezi 12/02/2020 günü, 11.00-13.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Üye

Üye

Adı-Soyadı

Doç. Dr. Berrin Avcı

Doç. Dr. Işıl Kasapoğlu

Öğr. Gör. Dr. Sema Sener
Koçoğlu

İmza

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Gülşah Çeçener
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU

12.02.2020

Adı Soyadı: Merve EREMRE YANIK

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Çalışma 'vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan ovaryum dokularının böbrek kapsülü altına ototransplantasyonu öncesinde dokunun fragmantasyonu ve/veya PI3-kinaz aktivatörü ile kültüre edilmesinin foliküler aktivasyon üzerine etkisini değerlendirmektedir

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı:
Doç.Dr. Berrin AVCI

İmza

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK

İÇ KAPAK

ETİK BEYANI..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KABUL ONAY FORMU ii

TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

İÇİNDEKİLER..... iv

TÜRKÇE ÖZET vi

İNGİLİZCE ÖZET viii

1. GİRİŞ..... 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Ovaryumun Yapısı.....3

2.1.1. Ovaryan Foliküllerin Gelişimi.....3

2.1.2. Folikül Gelişiminde Rol Oynayan Moleküller7

2.2. İn Vitro Folikül Aktivasyonu (IVA)12

2.3. Ovaryum Dokusunun Fragmantasyonu.....13

2.4. Kriyoprezervasyon.....13

2.4.1. Kriyoprotektanlar.....15

2.4.2. Kriyoprezervasyon Yöntemleri16

2.5. Fertilitenin Korunması17

2.5.1. Ovaryum Dokusunun Kriyoprezervasyonu ve Transplantasyonu18

2.6. Apoptoz21

2.6.1. Apoptozun Düzenlenmesi22

2.6.2. Apoptozda Görülen Morfolojik Değişiklikler.....25

2.6.3. Apoptoz ile Nekroz Arasındaki Farklar25

2.7. ÇALIŞMANIN AMACI.....25

3. GEREÇ VE YÖNTEM27

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma.....27

3.2. Ovaryum Dokusu Diseksiyonu ve Transplantasyonu.....29

3.3. Ovaryumun Dondurulması ve Çözülmesi.....31

3.3.1. Vitrifikasyon Protokolü.....31

3.3.2. Thawing (Çözme) Protokolü32

3.4. Ovaryum Dokusunun İnkübasyonu33

3.5. Işık Mikroskopik Preparasyon.....	35
3.6. Hematoksilen-Eosin Boyama ve Morfolojik Değerlendirme.....	35
4. BULGULAR.....	39
4.1. Ovaryum Dokusunun Morfolojik Değerlendirilmesi	39
4.1.1. Yarım Ovaryum Dokusunun Ototransplantasyonu Sonrası Histomorfolojik Bulguları (Grup 1).....	40
4.1.2. Fragmente Ovaryum Dokularının Ototransplantasyonu Sonrası Histomorfolojik Bulguları (Grup 2).....	41
4.1.3. Yarım Ovaryum Dokusunun IVA Uygulaması Sonrası Histomorfolojik Bulguları (Grup 3).....	42
4.1.4. Fragmente Edilen Ovaryum Dokusunun IVA Uygulaması Sonrası Histomorfolojik Bulguları (Grup 4).....	42
4.1.5. IVA Uygulaması Sonrası Fragmente Edilen Ovaryum Dokusunun Histomorfolojik Bulguları (Grup 5).....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
6. KAYNAKLAR	53
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	58
8. EKLER	61
9. TEŞEKKÜR	62
10. ÖZGEÇMİŞ.....	63

TÜRKÇE ÖZET

“Sıçan Ovaryumunun Vitrifikasyon Sonrası Fragmantasyonu Ve Matürasyon Aktivatörleri İçeren İn Vitro Kültürünün Ototransplantasyon Sonrası Folikül Korunmasına Etkisi”

Primer over yetmezliği olgularında, kemoterapi ve radyoterapi tedavileri sonrası ovaryum disfonksiyonu görülen hastalara uygulanan ovaryan doku transplantasyonunun, doğurganlığı ve endokrin fonksiyonları geri kazandırdığı Donnez ve arkadaşları (2004) tarafından bildirilmiştir.

Çeşitli hücre içi sinyalizasyon sistemleri arasında, primordiyal folikül aktivasyonunda fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) – Akt - Forkhead box O3 (FOXO3) yolunun önemi transgenik hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir. POI hastalarından oosit toplamak amacı ile preovulatar hücrelerin aktive edilip kullanılabilmesi için; kemirgen ve insan ovaryum dokularındaki uykuda olan foliküllerde AKT yolunu aktive etmek için fosfatidilinositol-3 kinaz aktivatörleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda ovaryan doku fragmantasyonunun ovaryum-Hippo sinyal yoluna müdahale edebileceği ve ayrıca folikül büyümesine yol açabileceği öne sürülmüştür. POI hastalarında kısırlığın tedavisinde bu iki yöntem in vitro aktivasyon (IVA) adı altında farklı bir yaklaşımla birleştirilmiştir. Ovaryektomiden sonra, foliküllerin AKT stimülatörleri kullanılarak in vitro olarak aktive edilmesi sağlanmış, ardından ovaryum dokusu ototransplantasyonu sonrası canlı doğum elde edilmiştir.

Bu çalışma ‘Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan ovaryum dokularının böbrek kapsülü altına ototransplantasyonu öncesinde dokunun fragmantasyonu ve/veya PI3-kinaz aktivatörü ile kültüre edilmesi foliküler aktivasyonu artırır’ hipotezinden yola çıkılarak gerçekleştirildi. Tek taraflı ovaryektomi yapılan deneklerde vitrifiye edilip çözülen ovaryum dokuları sadece ikiye bölünerek ya da küçük parçalara ayrılarak ve/veya PI3-kinaz aktivatörü içeren medyum içerisinde kültüre edilerek aynı deneğin

böbrek kapsülü altına ototransplantasyonu gerçekleştirildi. Transplantasyonun ardından ovaryum dokusunun histomorfolojik değerlendirmesi yapılarak fragmantasyon ve/veya moleküler aktivatörün foliküler aktivasyona etkisi değerlendirildi. Doku fragmantasyonu ve/veya moleküler aktivatör uygulamasının ototransplantasyon sonrasında foliküler korunmaya farklı bir etkisinin olmadığı, fakat gelişimin erken aşamasındaki ovaryan foliküllerin artışına neden olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Ovaryum dokusu vitrifikasyonu, PI3K (fosfotidilinositol-3-kinaz) , Doku fragmantasyonu.



İNGİLİZCE ÖZET

“The Protective Effect On Ovarian Follicles Of Tissue Fragmentation And In Vitro Culture Included Maturation Activators After Vitrification Of Rat Ovaries”

In primary ovarian failure cases, Donnez et al. (2004) reported that ovarian tissue transplantation applied to patients with ovarian dysfunction after chemotherapy and radiotherapy treatments restored fertility and endocrine functions.

Among the various intracellular signaling systems, the importance of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) - Akt - Forkhead box O3 (FOXO3) pathway in primordial follicle activation has been demonstrated by transgenic animal studies. To activate and use preovulatory cells to collect oocytes from POI patients; Phosphatase and tensin homologous (PTEN) enzyme inhibitors and phosphatidylinositol-3 kinase activators have been used to activate the AKT pathway in dormant follicles of rodent and human ovarian tissues. Studies have suggested that ovarian tissue fragmentation may interfere with the ovarian-Hippo signal pathway and also lead to follicle growth. These two methods in the treatment of infertility in POI patients have been combined with a different approach called in vitro activation (IVA). After ovariectomy, follicles were activated in vitro with using AKT stimulators, followed by live birth after ovarian tissue autotransplantation.

This study was designed based on the hypothesis that cultivation of ovarian tissues frozen with vitrification method before autotransplantation under the kidney capsule that were fragmented and/or activated with PI3-kinase activator will increase the follicle activation'. Autotransplantation was performed under the kidney capsule of the same subject by dividing the ovarian tissues that were vitrified and dissolved in unilateral ovariectomy by dividing them into two or splitting them into small pieces and/or culture in the medium containing PI3-kinase activator. After ototransplantation, the histomorphological evaluation of ovarian tissue was performed and the effect of fragmentation and/or molecular activator on follicular

activation was evaluated. Tissue fragmentation and/or molecular activator application were found to not a different affect for follicular protection after autotransplantation but increased ovarian follicles in the early stage of development.

Key words: Ovarian tissue vitrification, Phosphatidylinositol-3-kinase, Tissue fragmentation



1. GİRİŞ

Primer over yetmezlik (POI), 40 yaşından genç kadınların yaklaşık %1'inde görülen bir infertilite problemidir. Ortalama menapoz yaşından çok önce ovaryum fonksiyonlarının bozulması ve buna ek olarak amenore ve yükselmiş gonadotropin düzeyi neticesinde gelişen kan östrojen düzeylerinde düşme ve bu durumun yol açtığı fizyolojik, psikolojik problemler ile karakterize bir tablodur (Berker, 2018). Kemoterapi ve radyoterapi tedavileri sonrası ovaryum disfonksiyonu görülen hastalara uygulanan ovaryan doku transplantasyonunun, doğurganlığın ve endokrin fonksiyonların geri kazandırdığı Donnez ve arkadaşları (2004) tarafından bildirilmiştir.

Çeşitli hücre içi sinyalizasyon sistemleri arasında, primordiyal folikül aktivasyonunda fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) – Akt - Forkhead box O3 (FOXO3) yolunun önemi transgenik hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir (Reddy ve ark., 2005). Kit ligand, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) gibi parakrin faktörler, tirozin kinaz reseptörünü aktive eder, c-kitini bağlar ve PI3K'yı uyarır, bu da lipid ikinci habercisi PIP2'nin (fosfatidilinositol (4, 5) bisfosfat) PIP3'e (fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfat) dönüştürülmesini sağlar (Kawamura ve ark., 2017). Daha sonra PIP3, fosfatidilinositol bağımlı kinazı 1 (PDK1) uyarır, ardından AKT aktivasyonu gerçekleşir. AKT'nin çekirdeğe translokasyonu, bir transkripsiyonel faktör FOXO3'ün aktivitesini inhibe eder. Fosfataz ve tensin homologu (PTEN), PIP3'ün defosforilasyonla PIP2'ye dönüştürülmesini sağlayarak bu yolu negatif olarak düzenler (Reddy ve ark., 2005).

FOXO3 eksikliği olan farelerde, tüm uykuda olan primordiyal foliküllerin, erken postnatal evrede spontan olarak aktive edildiği ve POI fenotipine benzer şekilde, erken yaşamda ovaryum foliküllerin tükendiği ve ovaryum rezervinin azaldığı gösterilmiştir (Castrillion ve ark., 2003). Yapılan farklı bir çalışmada ise oosit spesifik PTEN delesyonu olan mutant farelerde benzer fenotipler tespit edildiği raporlanmıştır (Reddy ve ark., 2005).

2010 yılında POI hastalarından oosit toplamak amacı ile preovulatuvar hücrelerin aktifleştirilip kullanılabilmesi için; kemirgen ve insan ovaryum dokularındaki uykuda olan foliküllerde AKT yolunu aktive etmek için fosfataz ve tensin homolog (PTEN) enzim inhibitörleri ve fosfatidilinositol-3 kinaz aktivatörleri kullanıldı (Kawamura ve ark., 2010). Daha sonraki çalışmalarda, ovaryan doku fragmantasyonunun ovaryum-Hippo sinyal yoluna müdahale edebileceği ve ayrıca folikül büyümesine yol açabileceği öne sürüldü (Kawamura ve ark., 2013). Kawamura ve arkadaşları (2017) POI hastalarında kısırlığı tedavi etmek için bu iki yöntemi in vitro aktivasyon (IVA) adı altında farklı bir yaklaşımla birleştirmiştir. Ovaryektomiden sonra, foliküllerin AKT stimülatörleri kullanılarak in vitro olarak aktive edilmesini sağlamışlar, ardından ovaryum dokusu ototransplantasyonu yapılmış ve canlı doğum ile sonuçlanmıştır (Kawamura ve ark., 2017).

Bu bağlamda çalışmamızda hızlı kriyopreservasyon yöntemi olan vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan ovaryan doku örneklerinin ototransplantasyonu öncesi fragmantasyon ve moleküler aktivatörlerle kültüre edilmesinin foliküler aktivasyona ve foliküllerde apoptotik hücre kaybına etkisini değerlendirmek amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumun Yapısı

Ovaryumlar, bir çift olmak üzere pelviste bulunan, ortalama 3 cm boyunda, 1,5 cm eninde ve 1 cm kalınlığında, pembe beyaz renkte organlardır. Peritoneal katlantı olan mezovaryum ve ovaryumun sinir ve damarlarını taşıyan suspensor ligament ile pelvis duvarına bağlanırlar. Üreme çağından önce en dış yüzeyi düzgün görünümde iken, menstruasyonun başlamasıyla düzensizleşir. Yüzeyde tek katlı yassı ve kübik hücrelerden oluşan germinal epitel olarak bilinen sellüler tabaka bulunur. Ovaryumda sınırları tam olarak birbirinden ayıramayan bir korteks ve medulla tabakaları bulunur. Germinal epitelin hemen altında, korteks ile arasında sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer almaktadır. Gevşek bağ dokusu yapısındaki medulla, ovaryumun orta kısmındadır ve hilustan ovaryuma giren kan damarları, lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücreleri barındırır. Korteks ise ovaryumun periferinde yer alır. Stromasında, farklı gelişim aşamalarındaki foliküller ve düz kas hücreleri bulunur (Ross 2011).

2.1.1. Ovaryan Foliküllerin Gelişimi

Dişi üreme hücresi oositin öncül hücreleri olan primordiyal germ hücreleri, embriyonik gelişimin ikinci haftasında epiblast tabakasında oluşup 3-4 gebelik haftalarında vitellüs kesesinin dorsal duvarının endoderminde görülmektedirler. Bu hücreler daha az organel içermeleri nedeniyle şeffaf sitoplazmalı ve endoderm tabakasını oluşturan hücrelerden daha büyük olmaları ile karakterizedir. 4. haftadan itibaren gonadın gelişeceği bölgeye göç etmeye başlarlar ve 5. haftada gelişen gonadlara ulaşırlar (Langman 2005; McKAY ve ark., 1953). Gonadlara ulaşan bu hücreler hızla mitoz ile çoğalırlar ve oogoniumlara farklılıanırlar. Gelişimin 3. ayında kümeleşen oogoniumların bir kısmı mitozla bölünmeye devam eder. Mitotik aktiviteleri primordiyal germ hücrelerinden daha hızlıdır. Oogoniumların çoğalmaya devam etmesi ile sayıları fetal hayatın yaklaşık 3. ayında 600-700 bin, 5. ayında 6-7 milyona ulaşır. Gelişimin 12-13. haftasında oogoniumlar primer oositlere dönüşmeye başlar. 7. aydan itibaren oogoniumların çoğu primer oosit haline geçmiştir ve mitoz

durmuştur. Yenidoğanda yaklaşık 1–2 milyon arasında primer oosit bulunur. Çoğu olgunlaşmasını tamamlayamaz ve atreziye uğrar. Bu sayı puberte başlangıcında 300-400 bin arasındadır (Oktem ve ark., 2008) ve ovaryum rezervini belirler (Baltus ve ark., 2006). Primer oositler puberteye kadar profaz evresinin diploten safhasında dinlenme halinde kalırlar. Primer oositin etrafını yassı epitel hücreleri çevreler ve primordiyal foliküller oluşturulur. Dolayısıyla oogenez fetal hayatta başlar ve pubertede foliküler gelişimle devam eder. Ancak bir kadının doğurganlık süresi boyunca primer oositlerin 400 kadarı sekonder oosit olarak ovulasyona uğrar. Geri kalanı farklı gelişim evrelerinde dejenere olurlar. Menopoz sonrasında kalan oositler birkaç yıl içinde dejenere olurlar.

Puberteye ulaşıldığında dişi gonad primordiyal folikül havuzuna sahiptir. İlk olarak fetal gelişimin 3. ayında görülen bu inaktif foliküllerde FSH reseptörü bulundurmaz ve bu nedenle gelişimleri FSH'dan bağımsızdır (Oktay ve ark., 1997). Olgun ovaryumda primordiyal foliküller korteks stromasında, tunika albuginea tabakasına yakın konumlanmışlardır. Ovaryan kortekste sayıca en çok bulunan ve en küçük foliküllerdir. Primer oositin etrafı tek tabakalı yassı folikül hücreleri ile çevrilidir. Folikül hücrelerince çevrelenen oosit yaklaşık 30 µm çapındadır ve küre şeklindedir. Büyük bir nukleus ve belirgin nukleolusu vardır. Kromozomlar çoğunlukla çözünmüş haldedir ve bu nedenle koyu boyanmazlar. Sitoplazmadaki organeller nukleusa yakın konumlanma eğilimindedirler. Küre şeklindeki mitokondriyonlar ile çok sayıdaki vezikül oosit sitoplazmasında dağınık halde bulunurlar. Ooplazmada golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun, mitokondriyonların ve lizozomların birlikte oluşturduğu küme olan “Balbiani cisimciği” bulunmaktadır. Ayrıca insan oositleri “Annüler lameller” içerir. Annüler lameller, bir nuklear zarf kesitleri dizisidir. Folikül hücreleri stromadan bazal lamina ile ayrılır (Ross 2011 ve Junqueira 2003).

Pubertenin başlamasıyla primordiyal folikül grubunda büyüme süreci başlar. Bu süreci ovaryum içerisindeki farklı yapılardan kaynaklanan sinyallerin (oosit, folikül hücreleri, stroma) otokrin parakrin etkileşimleri başlatır (Skinner, 2005). Oosit, folikül hücreleri ve folikülü çevreleyen stromanın fibroblast hücrelerinde değişiklikler gözlenir. Oositi çevreleyen folikül hücreleri granüloza tabakasını oluşturur. Bu gelişmekte olan hücreler oosite fiziksel destek sağlar. Aktif olarak

hücrel farklılaşma gösteren bu hücreler folikülün bir diğer gelişim basamaklarına geçmesini sağlar.

Bekleme evresinden çıkan bir primordiyal folikül büyümekte olan foliküle dönüşür. Öncelikle oosit büyür ve oositi çevreleyen yassı folikül hücreleri kübik şekil alırlar. Bu evredeki foliküle primer folikül denilmektedir.

Primer folikül, primer oositi çevreleyen folikül hücre tabakalarının sayısına göre ikiye ayrılır:

Unilaminar primer folikül: Primer oositin etrafında tek sıra halinde kübik folikül hücreleri bulunur. Oosit tarafından ekstraselüler bir örtü olan Zona pellusida (ZP) oosit ile folikül hücreleri arasında oluşturulmaya başlanır. ZP bu evrede kesintili bir yapıdadır.

Multilaminar primer folikül: Oosit çok katlı ve kübik çoğalan hücrelerle çevrilidir. Bu evrede folikül hücreleri Granüloza hücreleri olarak isimlendirilirler. Kesintisiz bir zona pellusida mevcuttur. Kalınlaşan zona pellusida, üç asidik zona pellusida glikoproteininden meydana gelmektedir. Bunlar ZP-1, ZP-2, ZP-3 olarak adlandırılırlar. En önemlisi spermatozoa- bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyonu indükleyicisi olarak görev alan ZP-3'tür. Folikül büyürken granüloza hücrelerinin uzantıları zona pellusidayı geçerek oositin mikrovilluslarıyla temas eder ve oluklu bağlantılar oluşur. Oosit ve folikülün normal gelişimi için besinlerin ve makromoleküllerin kandan folikül sıvısına kolaylıkla ulaşabilmesi için granüloza hücrelerinin bazal tabakasını oluşturan hücreler arasında sıkı bağlantı kompleksleri yoktur (Ross 2011 ; Kierszenbaum ve Tres 2012).

Büyük ölçüde granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile hacimce büyüyen primer folikülde hücreler arasında içeriğinde sıvı olan hücreler arası boşluklar oluşur. Hyalüronan bakımından zengin ve likör foliküli denilen bu kaviteler birleşir ve antrum adı verilen tek bir kaviteye dönüşür. Folikül artık sekonder folikül ya da antral folikül adını alır. Oosit bu evrede yaklaşık 125 µm çapındadır. Oosit daha fazla büyümeyi. Büyümenin inhibisyonu, granüloza hücrelerinden antrumdaki sıvıya salgılanan "oosit matürasyon inhibitörü (OMI)" ile sağlanır.

Granüloza hücrelerinin proliferasyonu devam ederken folikül çevresinde bulunan stroma hücreleri, bazal laminanın dışında teka olarak isimlendirilen bir tabaka şeklinde düzenlenirler. Teka tabakası iki tabakaya ayrılır:

Teka interna: Vaskülarizasyonun yüksek olduğu ve salgı yapan kübik hücrelerin oluşturduğu kollajen ve fibroblastlarca zengin bağ doku yapısında olan iç tabakadır. Granüloza hücre tabakası ile arasında bazal laminanın bulunması avasküler olan granüloza tabakası ile teka internanın zengin kapiller yatağını birbirinden ayırır. Teka internanın hücreleri çok sayıda Luteinizan hormon (LH) reseptörüne sahiptir. Bu hücreler LH uyarısına yanıt olarak bir androjen prekürsörü olan androstenedionu salgılar ve bu hormon granüloza hücrelerine iletilir.

Teka eksterna: Dış bağ dokusu tabakasıdır ve onu çevreleyen ovaryumun stroması ile arasında belli bir sınır yoktur. Temel olarak düz kas hücreleri ve kollajen demetleri içerir.

Sekonder folikülün büyüklüğü arttıkça antrum genişler ve folikül sıvısı içeren tek büyük bir antrum oluşur. Genişleyen antrum, granüloza hücrelerinin yeniden düzenlenmesine neden olur. Oosit folikülün içinde kenarda konumlanır. Antruma doğru çıkıntı yapan ve oosit ile ilişkili olan granüloza hücreleri kumulus ooforus adını alır. Oositin etrafını saran, ovulasyon ile oositle beraber kalan tek tabakalı kumulus ooforus hücrelerine de korona radiata denilmektedir. Yaklaşık 10 mm ya da daha fazla çapa ulaştığında folikül Graaf (Olgun) folikül olarak adlandırılmaktadır. Ovaryumun korteksi boyunca uzanır ve yüzeyinde çıkıntı oluşturur (Ross 2011; Kierszenbaum ve Tres 2012).

Çok sayıda primer folikül olgunlaşma sürecine girer ancak yalnızca bir folikül gelişimini tamamlar, geri kalan foliküller atreziye uğrar ve dejenere olurlar. Foliküler gelişimin herhangi bir basamağında atrezi gerçekleşebilir. Atretik foliküller, dejenere olmuş oosit ve folikül hücrelerinin kalıntıları, camsı membran denilen kalın, kıvrılmış membranöz materyal, çok değişikliğe uğramamış zona pellusida ve yoğun makrofaj varlığı ile ayırt edilirler (Kierszenbaum ve Tres 2012).

2.1.2. Folikül Gelişiminde Rol Oynayan Moleküller

İnsanda fetal hayatta başlayan folikül gelişimi, primordiyal folikülün şekillenmesiyle başlar ve total folikül sayısı erken dönemde belirlenir (Hsueh ve ark., 2000). İntraovaryan faktörler olan Kit Ligand (KL), nörotropinler, Sohlh1, Nobox, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), kemik morfojenik protein 4 ve 7 (BMP4-7), lökemi inhibitör faktör (LIF) ve keratinosit büyüme faktörü (KGF) dormant fazda bekleyen bu foliküllerin aktifleşmesinde önemli rol oynarlar. Tek sıra yassı folikül hücreleri ile çevrili primer oositi bulunduran primordiyal folikül primer, sekonder ve antral folikül olmak üzere gelişim gösterir.

Folikül büyümesi geri dönüşümsüz bir olaydır ve büyümeye başlayan folikül ya süreci tamamlayıp ovulasyona gider ya da gelişimin herhangi bir aşamasında atreziye uğrar. Ancak çok sayıdaki dormant folikülden birkaç tanesinin aktifleşmesinde etkili mekanizma hala tam olarak bilinmemektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar intraselüler sinyal yollarının bu aktifleşme sürecinde önemli rol oynadığını göstermiştir (Adhikari ve ark., 2009; Hsueh ve ark. 2000).

Stemcell faktör olarak bilinen Kit ligand (KL), granüloza hücreleri tarafından üretilen tirozin kinaz reseptör proteinidir. Kit ligand reseptörü olan c-kit ise oosit ve teka hücrelerinde bulunur (Manova ve ark., 1993). Embriyoner dönemden itibaren büyüme faktörü olmasının yanı sıra oosit sağkalımı, sellüler proliferasyon, adhezyon, sekresyon ve farklılaşma gibi olaylarda rol oynar (Besmer ve ark., 1993; Kissel ve ark., 2000). Kit ligand molekül mutasyonu olan farelerde fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolağının çalışmadığı, folikül gelişiminin primer evrede arrest olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Kissel ve ark., 2000).

Granüloza hücrelerinden salınan ve insan folikül sıvısında bulunan Lökemi İnhibitör faktör (LIF) oosit büyümesi ve teka hücrelerinin folikül çevresinde toplanmasını sağlayarak primordiyal foliküllerin büyümesinde etkilidir.

Granüloza hücrelerinin salgıladığı farklı parakrin faktörler çeşitli intrasellüler sinyal yollarından ilerlerler ve folikül gelişimini uyarırlar. İn vitro kültür çalışmalarında, KGF, VEGF, BMP 4 ve BMP 7'nin, granüloza hücresindeki reseptör tirozin kinaz'a (RTKs) etki ettiği, fonksiyonlarını düzenlediği ve preantral folikül gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (Kezele ve ark., 2002b). Nörotropinler gibi büyüme faktörleri, erken evrede folikülogenezi düzenlemektedir. Folikül

formasyonundan önce somatik hücrelerden ve oositte eksprese edilen Nrf (Nervegrowthfactor) folikül aktivasyonunda rol oynar (Dissen ve ark., 2009). Aynı şekilde oosit kaynaklı Sohlh1 (Spermatogenesis and oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix 1) ve Nobox (Newborn Ovary Homeobox-Encoding Gene) transkripsiyon faktörlerinin primordiyal foliküllerin bir sonraki evreye geçişinde etkinliği, yokluklarında oositin dejenere olduğu ve folikülün primer evrede duraksadığı bilinmektedir (Rajkovic ve Ballow, 2004).

İlk olarak *Streptomyces hygroscopicus* bakterisi tarafından sekrete edildiği görülen anti-fungal makrolid olan “Rapamisin” günümüzde gıda ve ilaç sanayisinde organ üzerinde transplantasyon, anjiyoplasti sonrası damar daralmasının önlenmesi, yumuşak doku ve kemik sarkoması kemoterapisinde kullanılmaya başlanmıştır. Anti-proliferatif Rapamisin’in tanımlanmasından sonra bulunan “Mammalian Target of Rapamisin” (mTOR) bir serin/threonin kinaz proteindir (Hall ve ark., 1993). Farklı sinyal yollarına cevap olarak hücre büyümesi ve proliferasyonunu düzenler. Rapamisine duyarlı mTORC1 ve rapamisine duyarlı olmayan mTORC2 olmak üzere iki farklı multiprotein kompleksten meydana gelmektedir (Wullschleger ve ark. 2006). mTORC1 beslenme, stres, oksijen, enerji ve diğer sinyallere göre hücre büyümesi ve proliferasyonunda, protein, lipid ve organel sentezi ile otofaji gibi katabolik reaksiyonları sınırlayarak pozitif yönde etki gösterir (Lablante ve Sabatini., 2009).

Tümör baskılayıcı genler olan TSC1 ve TSC2, hamartin (TSC1) ve tuberin (TSC2) proteinlerini kodlar. Bu genlerin mutasyonu sonucu otozomal dominant olan tuberoskleroz kompleks (TSC) meydana gelir (Yang ve ark., 2007). TSC1 ve TSC2 kompleksi mTOR aktivitesini baskılar. Yapılan çalışmalarda TSC1/TSC2 mutant farelerde bütün primordiyal foliküllerin geliştiği, folikül havuzunun boşalmasını takiben primer over yetmezliği görülmüştür (Adhikari ve ark., 2009).

Mullerian-inhibiting substance (MIS) olarak adlandırılan Anti Mullerian Hormon (AmH), inhibin ve aktivin gibi büyüme ve farklılaşma ile ilgili olan Transforming Growth Factor-beta ailesinin bir üyesidir. Dimerik glikoprotein yapısındadır (Cate ve ark., 1986; Massague ve ark., 1990). AmH ekspresyonu, ilk olarak insan dişi fetusunun gestasyon evresinin 32. haftasında görülmüştür (Rajpert – De Meyts ve ark., 1999). Primordiyal foliküllerde AmH ekspresyonu yoktur. İlk olarak primer foliküllerde, immünohistolojik boyama ile AmH mRNA’sı ve protein

granüloza hücrelerinde belirlenmiştir. En az primer folikülde, en çok antral folikülde ekspresyonu vardır (Durlinger ve ark., 2002a; Weenen ve ark., 2004).

AmH'nın ovaryumlardaki en temel rolü, folikül gelişimini sınırlayarak düzenleyici rol oynamasıdır (Visser ve Themmen, 2005). Bunu da primordiyal folikül gelişimini kısıtlayarak ve folikülün FSH duyarlılığını azaltarak gerçekleştirir (Durlinger ve ark., 2002).

2.1.2.1 Hippo Sinyal Yolağı

Drosophila'da keşfedilen "Hippo sinyal yolağı" embriyonik ve postembriyonik morfogenezin ve hücre proliferasyonun kontrolü ve organ büyüklüğünün korunmasında önemli, iyi korunmuş intraselüler serin / threonin kinaz kaskadıdır (Halder ve Johnson, 2011). Büyümei negatif yönde etkileyen birkaç tane molekül, transkripsiyon koaktivatörleri olan YAP (Yes associated protein) ve TAZ'ı (Transcriptionalcoactivatorwith-PDZ binding motif) fosforiller, sitoplazmadan nukleusa geçişlerini engeller. Böylece bu moleküllerin transkripsiyon aktiviteleri düşürülerek optimal organ büyüklüğünün korunması sağlanır. Hippo sinyalizasyonunun çalışmaması durumunda YAP 'ın fosforillenmesi azalır, nükleer seviyesi artar. YAP ve TAZ, TEAD transkripsiyon faktörüne etki ederek hücre büyümesi, proliferasyonu ve sağkalımı için gerekli olan CCN büyüme faktörü ve BIRC (Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing) apoptoz inhibitörü seviyesi arttırılır (Pan, 2007; Kawamura ve ark., 2013).

2.1.2.2 PTEN/PI3K/AKT/FOXO3 Sinyal Yolağı

Geri dönüşümsüz olan foliküllerin ilk aktivasyonları gonadotropinlerden bağımsız olarak gerçekleşir. Bu nedenle foliküler aktivasyonda moleküler mekanizmaların araştırılması önem kazanmaktadır (McGee ve Hsueh, 2000). İntrasellüler sinyal mekanizması olan Fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K) / Akt yolağı, kinaz, fosfataz ve transkripsiyon faktörlerini kapsar ve bu sinyal molekülleriyle hücre proliferasyonu, sağkalımı, migrasyon ve metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Cantley, 2002). Yapılan çalışmalar oosit ile granüloza hücreleri arasındaki iletişimin sinyal yollarına bağlı olduğunu göstermiştir. Bu noktada görev alan ligand ve reseptör ilişkisi önem kazanmaktadır (Liu ve Reddy, 2006)

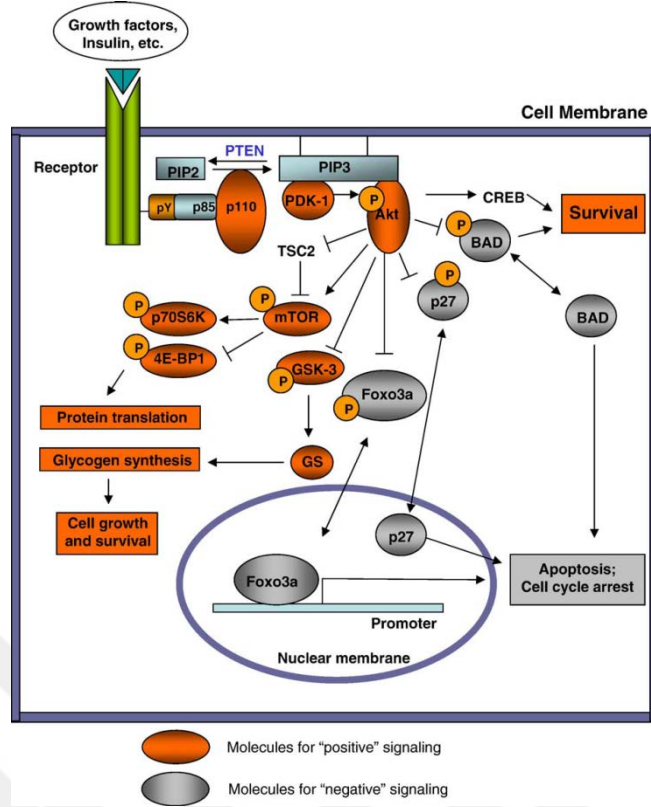
Lipidkinaz olan PI3K, inositol fosfolipidlerin inositol uçlarının 3'OH grubunu fosforiller. Gelişmiş ökaryotlarda çoklu formları bulunur:

Class 1A PI3K: Heterodimer yapısında, katalitik altünite p110 ve düzenleyici altünite p85'ten oluşur. Fosfotidilinositol-4,5-bifosfat'ı (PIP2) fosforilleyerek fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfat'a (PIP3) dönüştürür (Cantley 2002).

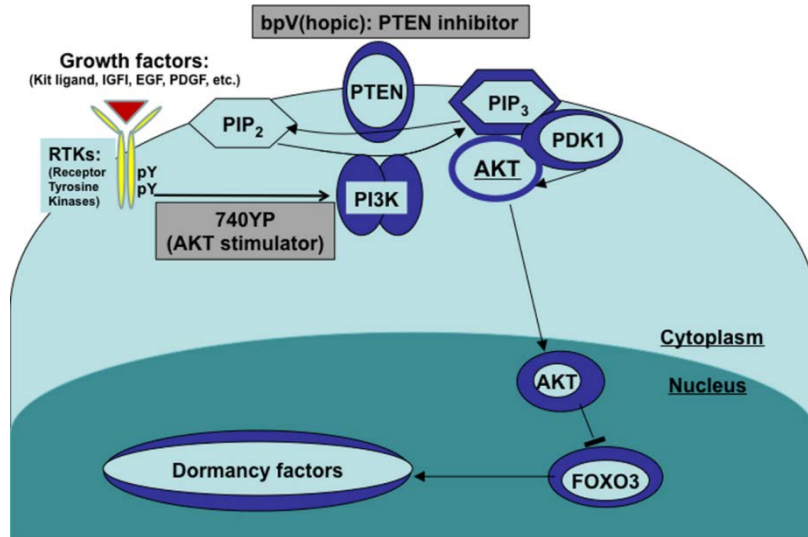
Hücre membranında bulunan reseptör protein tirozinkinaz (RTK) kit ligand, IGF1, EGF, VEGF, FGF gibi çeşitli parakrin faktörler tarafından aktive edilir ve foliküler gelişim başlatılır Ligandın bağlanmasıyla fosforillenen ve aktive olan RTK, PI3K'nın p85 alt ünitesine bağlanır. Stimüle olmayan hücrelerin sitozolünde bulunan PI3K, RTK'nın aktive olması ile membranda birikmeye başlar. Katalitik alt ünitesi olan p110, inositol fosfolipidlerin 3'OH grubunu fosforilleyerek PI(4,5)P2'nin PI(3,4,5)P3'e dönüşümünü sağlar (Şekil 1) (Adhikari ve Liu, 2009; Cantley, 2002). Bu dönüşümle birlikte bir serin / treoninkinaz olan Akt ile fosfoinositol bağımlı kinaz 1 (PDK1) membrana yaklaşır ve PDK1 tarafından Akt'ın fosforillenmesi kolaylaşır (Lawlor ve Alessi, 2001). Akt'ın fosforillenmesi katalitik aktivitesini stimüle eder ve hücre büyümesi, hücrenin sıklusa girmesi ve sağkalımına etki eden proteinler fosforillenir.

FOXO ailesinin "Forkhead transkripsiyon faktörleri" memelilerde evrimleşme süresince iyi korunmuşlardır. Birçok in vitro çalışmada hücre proliferasyonu, hücre siklus arresti ve apoptoz, farklılaşma, strese karşı dayanıklılık ve metabolizma gibi çeşitli süreçlerde rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu ailenin dört üyesinden üçü - Foxo1, Foxo3a, Foxo4 - Akt'ın substratıdır (Accili ve Arden, 2004; Arden ve Biggs, 2002). Akt tarafından fosforillenen Foxo3a nukleustan sitoplazmaya geçer ve folikül büyümesi indüklenir. Uyarıcı faktörlerin etkisinin azalmasıyla Foxo3a defosforile olur ve tekrar nukleusta yerini alarak apoptoz / hücre siklus arrestinin başlamasını sağlar.

Tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homoloğu olan PTEN, PI3K yolağı aktivasyonunu negatif yönde düzenler. PIP3'ü defosforile ederek PIP2'ye dönüşümünü sağlar ve endojen folikül aktive edici RTK ligandların etkisini azaltır (Adhikari ve Reddy, 2008; Kawamura ve ark., 2015) (Şekil 2).



Şekil 1. PTEN/PI3K/AKT/FOXO3 Sinyal Yolağı Şematik Gösterimi (Adhikari ve ark., 2009)



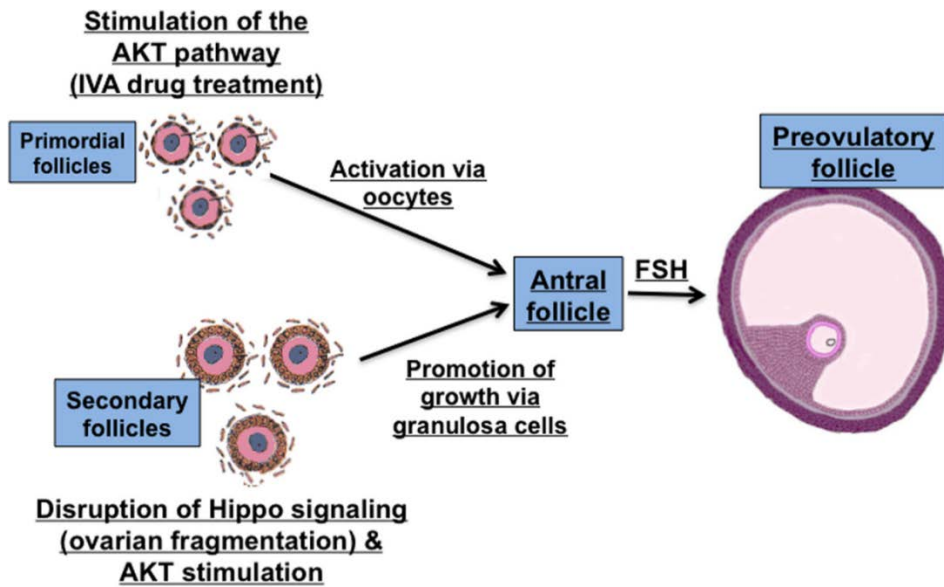
Şekil 2. PTEN / PI3K / AKT / FOXO3 Sinyal Yolağının Primordiyal folikül aktivasyonu üzerindeki etkisi. (Kawamura ve ark.,2015)

2.2. İn Vitro Folikül Aktivasyonu (IVA)

PTEN-PI3K-AKT yolağı sadece primordiyal folikülün aktivasyonunda değil, aynı zamanda antral folikülde granüloza hücrelerinin başkalaşımında, FSH stimülasyonunda da rol oynar (Zelevnik ve ark., 2003).

İnfant farelerden izole edilen sekonder foliküller PTEN inhibitörü ve PI3K aktivatörü ile kültüre edildiğinde, AKT'in stimüle edildiği ve folikül büyümesinin belirgin olarak görüldüğü belirtilmiştir. Aynı zamanda 10 günlük farelerden alınan sekonder ve daha küçük folikülleri içeren ovaryumlar kısa dönem IVA tedavisine maruz bırakıldığında, foliküller AKT stimülasyonuna cevap vermiştir (Kawamura ve ark., 2013).

IVA ilaç tedavisi ile Hippo sinyalini bozan fragmentasyon yöntemi birleştirildiğinde preantral foliküllerin gelişimi daha da artar. Bilinen şu ki, primordiyal ve sekonder foliküllerin gelişimini indükleyen mekanizmalar farklıdır. Dormant primordiyal foliküllerin aktivasyonu, oositte PTEN-PI3K-AKT-FOXO3 yolağı aktive edilerek gerçekleşmektedir. IVA'yı takiben gerçekleştirilen fragmentasyon ile Hippo sinyal yolağı üzerinden granüloza hücrelerine etki edilmekte ve sekonder foliküllerin büyümesi sağlanmaktadır (Şekil 3) (Kawamura ve ark.,2015).



Şekil 3. IVA ile fragmentasyonun folikül gelişimi üzerine etkisinin şematik gösterimi (Kawamura ve ark.,2015)

2.3. Ovaryum Dokusunun Fragmantasyonu

Polikistik Over Sendromlu (PCOS) ya da Primer Over Yetmezliği (POI) olan hastalar ve kemoterapi- radyoterapi görecek kişilerde fertilitiyi korumak amacıyla daha etkili dondurma yönteminin gerçekleştirilmesi ve ovaryumun böbrek kapsülüne ootransplantasyonun daha başarılı olması için ovaryan fragmantasyon gerçekleştirilmiş ve bu sayede sekonder foliküllerin büyümesi indüklenmiştir (Kawamura ve Hsueh 2013).

Hücre proliferasyonunda önemli olan Hippo sinyal yolağı hücre adhezyonu, şekli ve polaritesinde etkili elemanlar tarafından düzenlenmektedir (Johnson ve Halder, 2014). Hücre içerisinde önemli rolü olan aktin multifonksiyonel bir proteindir. Globüleraktin'in (G-aktin) hızlı bir şekilde polimerizasyonu ile filament formu olan F-aktin'e dönüşmesi hücre adhezyonunu, şeklinin korunmasını ve hareketini sağlar. Ovaryum fragmantasyonu ile F-aktin miktarındaki artışın Hippo sinyal yolağını bozarak YAP'ın nükleus seviyesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Wada ve ark., 2011).

Kawamura ve ark. (2013), ovaryum fragmantasyonunun G-aktin polimerizasyonunu arttırarak F-aktin'e dönüşümünü indüklediğini, bu sayede fosforile-YAP seviyesinin sitoplazmada düşerek, nükleus lokalizasyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Bunun sonucu olarak CCN büyüme faktörü ve BIRC apoptoz inhibitörü seviyesi arttırılarak folikül büyümesi gerçekleşir.

Ovaryum fragmantasyonunda verteporfin molekülü kullanılarak YAP'ın önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (Kawamura 2010). YAP, transkripsiyonel aktiviteye sahip değildir. YAP'ın işlevi transkripsiyon faktörlerinin artışına bağlıdır. Küçük bir molekül olan verteporfin, YAP ile TEAD transkripsiyon faktörü arasındaki etkileşimi kısıtlar. Çünkü fragmantasyon ile CCN ve BIRC'ın indüklenmesi sürekli değildir (Liu-Chittenden ve ark., 2012).

2.4. Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon, canlı hücre ve dokuların çok düşük sıcaklıklarda dondurulması veya soğutulması yöntemidir. Kriyoprezervasyon çalışmaları 2. yy öncesine dayanmakla beraber, 1949'da gliserol kullanılarak horoz spermi dondurulmuş ve tavuk üretilmiştir (Polge ve ark., 1949). 1950'lerde, Polge ve

arkadaşlarının çalışması geliştirilmiş, gliserol kullanarak insan sperm hücresi kuru buzda dondurulmuş ve yine aynı ekip ilk kez sıvı nitrojen içerisinde insan spermını dondurarak ilk canlı doğumun gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (Bunge ve Sherman, 1953). Dondurma yöntemi, 1970 sonlarına doğru hücre karakteristiğine (membran geçirgenliği ve hücrenin hacmi) göre modelize edilmiştir (Mazur ve ark., 1972). Takiben kriyobiyolojik çalışmalar hızla artmış ve çok düşük sıcaklıklarda tavşan sperm, oosit ve embriyosunun dondurulması, dondurulmuş fare embriyosundan canlı doğumun gerçekleştirilmesi fertilitenin korunması üzerine olan çalışmaların yolunu açmıştır (Gardner, 2006; Özkavukçu ve Erdemli, 2002;)

Düşük sıcaklıkta hücrenin donmasını sağlayan kriyoprezervasyon biyolojik saati durdurur ve hücre yıllar, hatta yüzyıllar boyunca fonksiyon ve genetik bilgisi değişmeden saklanabilir. Laboratuvarlarda dondurulan hücreler -196°C 'de sıvı azot içerisinde saklanır.

Yaklaşık olarak hücrenin %80'ini oluşturan su hücrenin yapı ve fonksiyonu bakımından en önemli bileşendir. Su molekülleri 0°C 'nin altında dondurma işlemi yapıldığında buz kristallerine dönüşür. Hücre içinde oluşan buz kristalleri ve dehidrasyona bağlı olarak tuz yoğunluğunun artması hücre için mekanik ve kimyasal stres oluşturur. Bunun sonucu olarak hücre fonksiyon kaybeder ve ölür. Bu gibi olumsuz etkilerden kaçınmak için kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Kriyoprotektanlar dondurma ve çözme işlemleri esnasında hücreyi oluşabilecek hasara karşı koruyan, toksik olabilen kimyasal maddelerdir.

Hücre canlılığını korumak için dondurma ve çözme esnasında dikkat edilmesi gereken üç temel faktör vardır:

- Dondurma/çözme hızı
- Kriyoprotektan miktarı
- Dondurulan numunenin hacmi

İşlem gerçekleştirilirken numunenin ısıya ne kadar maruz kaldığı, hücrenin membran yapısı ve buna bağlı olarak kriyoprotektanlara karşı hassasiyeti göz önüne alınmalıdır. Ayrıca, küçük yapıların dondurulup çözülmesi daha kolay gerçekleşir. Buna karşın oosit ve embriyonun daha hassas yapıda oldukları unutulmamalıdır (Özkavukçu ve Erdemli, 2002).

Kriyoprotektanlar hücre dondurulması esnasında oluşabilecek soğuk şoku zararına, intraselüler buz kristali oluşumuna ve membran stabilizasyonunun bozulmasına karşı koruyucu olarak kullanılan maddelerdir. Dondurulmadan önce, intrasellüler ve ekstrasellüler ortamın dengelenmesi için hücre bir süre kriyoprotektan içeren solüsyonlarda inkübe edilir. Kriyoprotektanların düşük moleküler ağırlıklı, en az toksisiteye ve hızlı penetrasyon gücüne sahip olmaları dondurma/çözme işlemlerinin başarılı olmasını sağlar (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

2.4.1. Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar, hücre içine nüfuz edebilen (permeabl) ve hücre içine nüfuz edemeyen (non-permeabl) kriyoprotektanlar olmak üzere ikiye ayrılır;

2.4.1.1 Hücre İçine Nüfus Edebilen Kriyoprotektanlar

Hücre membranından geçebilen maddelerdir (Gliserol, Etilen glikol, Dimetilsülfoksit (DMSO), 1.2 propanediol vb.). Bu gruptaki kriyoprotektanlar yüksek düzeyde suda çözünebilme yeteneğine ve ısı etkisine sahiptirler. Su ile hidrojen bağları kurarak ortamda ısı açığa çıkması sağlanır. Diğer bileşenlerin yüksek konsantrasyonunu azaltarak koruyucu etki gösterirler. Dondurma esnasında ortamdaki su ile yer değiştirerek hem hücre hacmi azaltılır hem de hücre içi buz kristallerinin oluşumu engellenir (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

2.4.1.2 Hücre İçine Nüfus Edemeyen Kriyoprotektanlar

Hücre içine giremeyen düşük ve yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanları içerirler. Membranların sıvı ve katyonlara karşı geçirgenliğini arttırarak, ozmotik strese karşı esneklik kazandırır ve dondurma / çözme işlemleri esnasında lipid yapısının değişimini en aza indirgerler.

Sakkaritler hücre içine giremeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlardır (Glikoz, sükroz, trehaloz vb.). Öldürücü etkisi olan intrasellüler buz kristali oluşumunu engellemek için hücreyi dehidratasyona uğratırlar. Membran fosfolipidleriyle etkileşime girerek yüzey artışı sağlar ve membran bütünlüğünün devamlılığını sağlarlar. Çözme esnasında ozmotik strese karşı koruyucu etki oluştururlar.

Makromoleküller, hücre içine giremeyen yüksek molekül ağırlığına sahip maddelerdir (Polivinil alkol (PVA), Polivinilprolidon (PVP), antifriz protein (AFP),

fikol, albümin). Dondurma/çözme esnasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak şekilde değiştirerek etki gösterirler (Bucak ve Tekin 2007; Sağırkaya ve Bağış, 2003).

2.4.2. Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Günümüzde pratik olarak iki dondurma yöntemi kullanılmaktadır.

2.4.2.1 Yavaş Dondurma (Slow Freezing)

Günümüzde pratik olarak iki dondurma yöntemi kullanılmaktadır. Geleneksel kriyoprezervasyon yöntemi olan yavaş dondurma ile hücre/doku, düşük miktarda kriyoprotektan kullanımı, daha az toksisiteye maruz bırakma ve pahalı ekipman kullanımı ile dondurulup uzun yıllar saklanabilmektedir. Dondurma işlemi yavaş ve kademeli olarak sıcaklığı hücre/doku çeşidine göre ayarlayabilen bir cihaz ile gerçekleştirilir.

Yöntem sırasıyla şu basamaklardan oluşmaktadır;

- Dondurulacak hücre/dokunun oda ısısında hücre içi kriyoprotektanlarla equilibrasyonu gerçekleştirilerek ozmotik denge sağlanır ve hücre/doku taşıyıcılara yüklenir
- 5°C ile 7°C'ye ulaşıldığında kristalizasyon tetiklenmeden kontrollü olarak buz kristali oluşumu başlatılır (seeding)
- -30°C ile -70°C' arasında bir sıcaklığa ulaşıncaya kadar dakikada 0,2°C – 2°C düşürülerek yavaş yavaş soğutulur
- Hedef sıcaklığa ulaşılnca numune –196°C sıvı azot içerisine daldırılır

Seeding olarak adlandırılan buz kristallerinin oluşumunun başlatılmasında amaç, ani ve hızlı soğutmanın etkisiyle kontrolsüz şekillenecek buz kristal oluşumunu engellemektir. Hücre için ölümcül olan küçük buz kristallerinin büyük buz kristallerine dönüşümü dakikada 2 °C'den az soğutma ile önlenir. Soğutma oranı membran yapısı, membranın suya ve kriyoprotektanlara karşı ısıya bağlı olarak geçirgenliği, numunenin hacmine bağlı olarak değişiklik gösterir (Ağca, 2000). Böylece hücrelerin dondurma süresince dehidre olmaları sağlanır (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

2.4.2.2 Hızlı Dondurma (Vitrifikasyon)

Latince “vitreous” kelimesinden türeyen vitrifikasyon, camı anlamına gelmektedir ve sıvıların kristalize olmadan katılaşması olarak tanımlanmıştır (Gardner, 2006). Çok hızlı, düşük maliyetli, yüksek konsantrasyon kriyoprotektan içeren solüsyonlar kullanılarak dondurma işlemi gerçekleştirilen bu yöntem ilk olarak fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir (Rall ve Fahy, 1985).

Başarılı bir vitrifikasyon için viskozitede yoğun bir artış gerekir. Yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan içeren vitrifikasyon solüsyonlarında bekletilen hücre/dokuda kriyoprotektanlar hızla su ile yer değiştirir ve su buz kristaline dönüşmeden doğrudan camı bir hal alır. Dondurma esnasında buz oluşumunun engellenmesi en önemli unsurdur. Farklı kriyoprotektanların su ile verdikleri etkileşimin farklı olması sebebiyle camı faz oluşturabilme özellikleri değişkendir.

Kriyoprotektanların toksik zararını önlemek amacıyla hücre içine giren ve giremeyen ajanların aynı anda kullanılması başarıyı artırır. Vitrifikasyon hızı ile kullanılan kriyoprotektan miktarı ters orantılıdır. Az miktarda ancak yüksek konsantrasyonda kullanılan ajanlar oda ısısında kolay buharlaşıp hücreye zarar verebileceğinden, uygulanma süresine uyulması gerekmektedir (Herrero ve ark., 2011).

2.5. Fertilitenin Korunması

Kanser teşhisi konmuş erkek ve kadınların sayısı 2010 yılında 1,5 milyon olarak belirtilmiş ve bunların %10'unun 45 yaşından daha genç olduğu bildirilmiştir. Gelişen tekniklerle kanser hastalarının iyileşme oranları her geçen gün artmaktadır. Ancak tedavi süresince görülen radyoterapi-kemoterapi, toksik etkiye hassas olan testis/ovaryum dokuları üzerine olumsuz etki göstermekte ve infertiliteye yol açmaktadır (Jensen ve Morbeck, 2011)

Kanserin yanı sıra gonadotoksik tedavi gören hastalar, çocuk sahibi olma yaşının artması (partneri olmayan ya da çocuk sahibi olmayı erteleyen kadınlar), Turner, Fragile X sendromu gibi genetik hastalıklar, primer over yetmezliği (POI), otoimmün hastalıklarda fertilitate problemleriyle karşılaşmaktadır (Beck-Peccoz ve Persani, 2006; Gonzalez ve ark., 2012).

Kadınlar için fertilitenin korunmasında 3 yol izlenebilir:

- Oositin dondurulması
- Embriyonun dondurulması
- Ovaryum dokunun dondurulması

Oositin ve embriyonun dondurulması Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezlerinde kullanılan yöntemlerdir. İlk olarak 1986'da dondurulup çözülen oositten canlı doğum gerçekleştirilmiştir (Chen, 1986). Ancak oositin büyüklüğü, fazla su ve lipid içermesi, hassas iç ipliklerine sahip olması ve matür oositin gerekliliği (Suzuki ve ark., 2014) kriyoprezervasyonunu diğer seçeneklere göre daha zor kılmaktadır. ASRM (American Society for Reproductive Medicine) tarafından verilen sonuçlara göre her bir adet dondurulup çözülen oositlerden elde edilen klinik gebe kalma oranı %4.5-12 gibi çok düşük bir orandadır (Dolmans ve ark., 2018). Oosit kriyoprezervasyonunun diğer zorlukları zamanla yarışılan bir tedavi sürecinde (kanser, POY gibi) ovaryum stimülasyonu için zaman gerektirdiğinden veya partneri olmayan, partnerinde sperm bulunmayan ya da prepubertal dönem için bu seçenek uygun bulunmamaktadır (Salama ve ark., 2013).

Embriyo kriyoprezervasyonu klinikte oositin saklanması nazarın daha çok tercih edilmektedir. 2015 yılında Amerika'nın ulusal raporunda her dondurulup çözülen embriyo için canlı doğum oranı %48 olarak belirtilmiştir (Dolmans ve ark., 2018). Ancak oositin saklanması benzer engeller burada da karşımıza çıkmaktadır. Lösemi, lenfoma gibi akut seyreden hastalıklarda tedavinin hemen başlanması gerektiğinden embriyonun saklanması uygun seçenek olmaktan çıkmaktadır. Uygulanan hormon tedavisi ile serum düzeyinde artan östrojen hiperstimülasyona neden olmakta ve hormona duyarlı malign hücrelere sahip kanser hastaları için bu yaklaşım tercih edilmemektedir (Sonmezer ve Oktay, 2003).

2.5.1. Ovaryum Dokusunun Kriyoprezervasyonu ve Transplantasyonu

Ovaryumun korteksinde bulunan primordiyal foliküller, profaz safhasının diploten evresinde arrest olarak beklerler. Primordiyal foliküllerin sahip olduğu bazı özellikler onları kriyobiyolojik perspektiften önemli kılar;

- Boyutlarının küçük olması
- Düşük metabolizmaya sahip olmaları
- Folikül hücrelerinin az sayıda olması
- Zona pellusidanın bulunmaması
- Periferik kortikal granüllerin olmaması
- Soğuğa karşı hassas olan intrasitoplazmik lipid miktarının az olması

Primordiyal foliküllerin bu özellikleri dondurma esnasında su ve kriyoprotektanların giriş-çıkışını kolaylaştırır ve başarılı bir kriyoprezervasyonun gerçekleşmesine olanak verir (Shaw ve ark., 2000).

Ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu çalışmaları 1950'lere dayanmaktadır. Daha önceki yapılan çalışmalarda sadece kriyoprotektan olarak gliserolün kullanılması başarılı sonuçlar vermemiştir. Ancak 1960'larda etilen glikol, DMSO, propanediol gibi kriyoprotektanların kullanılması başarıyı arttırmıştır (Oktay, 2001).

Ovaryum doku kriyoprezervasyonu çok sayıda oositi korumak için yararlı bir yöntem olarak görülmektedir (Isachenko ve Rahimi, 2002). Prepubertal kız çocukları için uygun bir yöntemdir. Ayrıca sperm ve hormon tedavisine ihtiyaç duyulmaması ile birlikte genç veya evli olmayan kadınlar, ovulasyon indüksiyonu için görecekları radyoterapi-kemoterapiyi 2-4 hafta erteleyemeyecek olan hastalar tarafından tercih edilmektedir (Donnez ve ark., 2013; Sönmezer ve Oktay, 2009).

Oktay ve Karlıkaya, transplantasyon sonrasında ovaryum dokusunun endokrin fonksiyonlarının geri kazanılabildiğini raporlamıştır (Oktay ve Karlıkaya, 2000). Donnez ve ark. insan ovaryumunun ototransplantasyonu sonrası ilk canlı doğumun gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Donnez ve ark., 2004). Günümüzde 130'dan fazla canlı doğum ovaryum doku transplantasyonu ile gerçekleştirildiği raporlanmıştır.

Doku geleneksel yavaş dondurma yöntemiyle ya da vitrifikasyon yöntemiyle dondurulduğunda oositlerin sağkalım oranları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Li ve ark., 2007). Kagawa ve ark., (2009) vitrifikasyonun daha başarılı sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Fertilitenin korunmasında ümit vaat eden ovaryum dokusunun dondurulması hala deneysel bir yöntem olarak kabul edilmekte ve yöntemlerin etkinliği için daha ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir.

Ovaryum dokusunun transplantasyonunda iki yaklaşımla söz konusudur:

a) Ksenotransplantasyon; bir canlıdan alınan dokunun aynı tür ya da farklı bir tür canlıya transplante edilmesidir. Transplantasyon sonrası folikül gelişiminin belirlenmesi adına uygun bir yöntemdir. Ancak hayvan deneylerinde patojenlerin bulaşma riskinden dolayı uygun değildir (Kim ve ark., 2002).

b) Ototransplantasyon; ovaryum dokusunun aynı canlıya nakledilmesidir. Ortotopik veya heterotopik olarak gerçekleştirilir.

b1) Ortotopik: Dokunun orijinal bölgesine transplante edilmesidir.

b2) Heterotopik: Ovaryum dokusunun kolun ön kısmı, abdominal duvar, fallop tüplerin serozası, böbrek kapsülünün altı gibi farklı bölgelere transplantasyonudur (Abedalahi ve Mohammednejad, 2013).

Dondurup çözülen ovaryumun ototransplantasyonu sonrası endokrin fonksiyonların kazanıldığı birçok çalışmada belirtilmiştir. Transplantasyon sonrası %95 oranında menstrual siklusun başladığı, 4 ay sonra foliküler fonksiyonun geri kazanıldığı, ortalama 5 yıldan sonra ovaryum fonksiyonunun devam ettiği gözlemlenmiştir (Dolmans ve ark., 2018). Ayrıca doğal gebelik şansını artırması da bir avantajdır. Yang ve ark., böbrek kapsülüne transplante edilmesinin subkutan ve intraperitoneal yerleştirmeye göre daha avantajlı olduğu rapor etmişlerdir (Yang ve ark., 2006).

Ortotopik transplantasyonun avantajları;

- Ortotopik alana transplantasyon (pelvik bölge-peritoneal cep) yardımcı üreme tekniklerine gerek duyulmadan doğal gebelik şansı verir.
- Minimal invaziv bir yöntemdir.

Dezavantajı;

- Transplante edilecek fragmanle ovaryum doku sayısı kısıtlanabilir.

Heterotopik ototransplantasyonun avantajları;

- Transplante edilen dokunun tekrar eldesinde genel anesteziye gerek duyulmaz.
- Transplante edilecek doku sayısını kısıtlamaz.
- Doku ve folikül değerlendirmesi kolaylıkla yapılabilir.
- Pelviste şiddetli yapışma olması durumunda uygulanabilir bir yöntemdir.

Dezavantajı;

- Doğal gebelik şansı yoktur, IVF tedavisi gerektirir.

Genel olarak ovaryum doku transplantasyonunun iki dezavantajı bulunmaktadır. Bunlardan ilki iskemik hasardır. Vaskülarizasyon bu noktada kilit rol oynar ve vaskülarizasyonun gerçekleşmemesi folikül rezervini %60-95 oranında düşürür (Amorim ve ark., 2012). Bir diğeri ise, transplantasyon esnasında özellikle kanser hastaları için malign hücrelerin tekrar yerleştirilmesi riskidir. Lösemi hastaları için uygun bir yöntem değildir çünkü hastalığın tekrarlanma riski çok yüksektir (Donnez ve ark., 2010).

2.6. Apoptoz

Yunanca'da apo=ayrı ve ptozis=düşen kelimelerinden oluşan ve “yaprak dökümü” anlamına gelen apoptozis terimi ilk defa Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972'de kullanılmıştır (Kerr ve ark., 1972). Hücre homeostazisinin devamlılığı, hücre çoğalması ve farklılaşması esnasında hücrenin doğru sayıda, doğru yer ve zamanda olmasını sağlayan önemli bir mekanizmadır. Her saniye yaklaşık olarak 1 milyon hücre apoptoza uğramaktadır ve yerine yenileri oluşmaktadır. Apoptoz mitoz ile denge halindedir ve hastalıkların oluşması bu dengeye bağlıdır (Cummungis ve ark. 1997; Ulukaya, 2003). Doku homeostazisini korumak amaçlı olarak embriyonik dönemden itibaren tüm yaşam boyunca devamlılık gösterir. Örneğin doğumda sayıca çok fazla olan nöronlar optimum sayıda sinaps oluşturmak için apoptoza uğrarlar. Ayrıca, DNA'sı hasarlanmış (virüs etkisi veya çevresel nedenlerle) hücreler diğer hücrelerin zarar görmemesi için kendilerini öldürürler. Doku homeostazisi için (örneğin yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin “turnover”ında olduğu gibi) hücreler ortamdaki uzaklaşır. İmmün sistemde önemli rolü olan ve timusta olgunlaşan

T lenfositlerden işlevi olmayanlar veya organizmanın kendi dokularına karşı yıkıcı etkisi olanlar, menstruasyon döngüsünde proliferere olmuş endometriyum hücreleri, embriyonik dönemde fetusun parmak aralarındaki perdeler apoptoz ile ortamdan uzaklaştırılır.

Apoptoz mekanizmasının bozulduğu bazı durumlar:

Viral enfeksiyonlar: Hücre içine giren virüs kendi proteinini sentezlemeye başlar ve hücre için gerekli olan proteinin sentezlenmesine engel olur. Böyle bir durumda hücre apoptoza uğrar ve ölür. Fakat, bazı virüsler (örn., Ebstein-Barr ve Papillomavirüs) enfekte ettikleri hücrenin apoptoze gitmesine engel olurlar. Örneğin, Ebstein Barr virüsü apoptoz inhibitörü olan bcl-2'ye benzer moleküller üretmektedir. Papilloma virüs ise güçlü bir apoptozis indükleyicisi olan p53'ü inaktifleştirmektedir.

Nörodejeneratif hastalıklar: Nöronlar, bölünmeyen ömür boyu yaşayan hücrelerdir. Herhangi bir hasarda ölümler ve yeni hücrelerin gelişimi oluşmaz. Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklarda nedeni bilinmeyen bir şekilde apoptoz indüklenmekte ve nöron kaybı olmaktadır.

Organ transplantasyonları: Transplante edilen organa karşı oluşturulan immün atak nedeniyle bölgede yoğunlaşan T lenfositlerince hücreler apoptozla yok edilmektedir.

Malign hastalıklar: Organizmada aşırı proliferasyonunla birlikte apoptoz aktivitesi azaldığında hücre yaşamaya devam eder ve genomunda oluşan hasar nedeniyle malign hücreye dönüşüm gerçekleşir (Ulukaya, 2003).

2.6.1. Apoptozun Düzenlenmesi

Apoptoz 2 temel yolla başlatılır:

- Hücre dışı uyarılar
- Hücre içi uyarılar

2.6.1.1 Hücre dışı uyarılar ile apoptozun başlaması

Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR) ailesine ait transmembran protein olan hücre yüzeyi ölüm reseptörleri aracılığıyla hücre dışından gelen sinyaller ile apoptoz başlatılır. Bu reseptörler hücre dışındaki tekrar eden sisteminin fazla olduğu

kısımlarda yer alırlar. Sitoplazmanın iç kısmında 'ölüm bölgesi' (death domain) denen protein zincirleri taşırlar. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine bir uyarı bağlandığında apoptotik mekanizmayı uyarırlar ve uyarıyı hücre içine iletirler. İyi tanımlanmış TNFR ailesinden olan ölüm reseptörü FAS (CD95)'a ligandı olan FASL bağlanır. Ligandın reseptöre bağlanmasıyla hücre içinde adaptör protein FADD reseptörüne bağlanır ve FADD pro-kaspaz 8 ve 10'un çalışmasını sağlar. Pro-kaspaz 8 aktifleince kaspaz-8 oluşur ve kaspaz-8 de hedef proteinleri bölerek apoptoza yol açan kaspaz-3'ü aktive eder ve apoptoz gerçekleştirilir (Sprick, M.,R., Walczak, H., 2004). İmmün tepki sonunda aktive olan T hücrelerinin uzaklaştırılması, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin yok edilmesi gibi patolojik durumlarda hücrelerin yok edilmesinde önemli bir yolaktır (Philchenkov, 2004; Tomatır, 2003).

2.6.1.2 Hücre içi uyarılar ile apoptozun başlaması

Caenorhabditis elegans ile yapılan çalışmalarla programlı hücre ölümünde önemli rol oynayan mutasyonlar tanımlanmıştır. CED-3 veya CED-4 genlerinde fonksiyon kaybı olan kurtçukların hücrelerinde, apoptozun ortaya çıkmadığı ve hücrelerin yaşadığı görülmüştür. CED-4 proteini, proteaz aktive edici faktör olup CED-3 prekursor proteininin aktif CED-3 proteinine dönüşmesini sağlar. Aktif CED-3 de hücre ölümünü başlatır (Spector ve ark., 1997).

İnsanlarda apoptotik gen Bcl-2 genidir. İnsan Bcl-2 proteini ile C.elegans'ın CED-9 proteini homolog olup, her ikisi de apoptozu engeller. Her iki protein de mitokondri dış zarı, nükleus zarı ve endoplazmik retikulum zarlarında yer alırlar (Güneş, 2010). Bcl-2 gen ailesine ait bazı proteinler apoptozu indüklerken, bazıları da baskılar. Apoptozu düzenleyen proteinler iki sınıfta incelenir:

- Anti-apoptotik düzenleyiciler: Bcl-2, BclxL, Bcl-w, CED-9, Mcl-1, c-Abl, Rb gibi.
- Pro-apoptotik düzenleyiciler: Bax, Bad, Bak, Bcl-xS, p 53, c-Fos, c-Jun gibi.

Bu gruptaki tüm proteinler transmembran proteinlerdir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin miktarı, hücrenin yaşamının devam etmesini veya sonlanmasını belirler Apoptotik yolakta görev alan proteinler kaspazlar olarak isimlendirilir. Enzim görevi görerek, hedef proteinleri, C- uçlarında bulunan bir aspartattan keserler. Kaspazlar, inaktif olarak sentezlendikten sonra belirli bir

kısımları kesilerek aktifleştirilirler. Apoptoz yolağında, bir protein tarafından uyarılan Kaspaz-9, Kaspaz-3 ün belirli kısımlarını keserek aktifleşmesini sağlar. Aktifleşen Kaspaz-3, sitozoldeki ICAD (İnhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease)'ı inaktifleştirir. İnaktifleşen ICAD, normalde bağlı olduğu CAD (caspase-activated deoxyribonuclease)'dan ayrılır. Serbest kalan CAD nukleusa girer, kromatin yoğunlaşması ve DNA kırıklarının oluşmasına neden olur (Krajewski ve ark., 1999).

Bcl-2 gen ailesine ait proteinlerin aktivasyonu ile sitokrom c, prokaspaz -2, -3, -9, AİF (apoptoz içeren faktör), endonükleaz G, Smac/DIABLO gibi apoptozda rol alan moleküller salınır. Bütün bu faktörler Bax/Bak kanalları ya da mitokondri membrandaki porlar tarafından serbestlenir. ATP'nin varlığında Apaf-1 ve sitokrom c Prokaspaz -9'un aktivasyonunu kolaylaştırır. Sitokrom c, Apaf-1, kaspaz -9 ve dATP ya da ATP birleşerek apoptozom ile büyük bir bileşik oluşturur. Apoptozomun gelişimindeki en önemli etken mitokondriondur. Kaspaz-9 aktifleşmesi ve kaspaz-3, 6, 7 aktivasyonu ile apoptozis gerçekleşir (Philchenkov, 2004 ; Sprick ve Walczak, 2004).

Hücrelerde sitokrom C mitokondrinin zarları arasında bulunur. Pro-apoptotik düzenleyici olan Bax, sitokrom C'nin sitozole geçişini sağlar. Sitokrom C'nin sitozole geçmesi apoptozun başlamasına neden olur. Anti-apoptotik düzenleyici olan Bcl-2, sitokrom C'nin sitozole geçişini engeller ve apoptozun gerçekleşmesi engellenir (Tsujimoto, 1998).

AIF (Apoptoz İndükleyici Faktör) bir flavoprotein olup, mitokondride görevlidir. Apoptotik uyarı ile nukleusa geçer. Nukleusta kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın parçalanmasına neden olur.

Endonükleaz G, mitokondilerde bulunur ve nukleaz aktivitesiyle mitokondride transkripsiyon sırasında RNA-DNA hibritlerinin ayrılmasına neden olur. Mitokondriden nukleusa geçen endonükleaz G, DNA'nın parçacıklara ayrılmasını sağlar ve sonuçta hücre apoptoza uğrar.

p53 proteini, hücre siklusunun G1 evresinde görevlidir. Transkripsiyon esnasında hatalı yazılımı düzeltir. İşlevini gerçekleştirmediğinde Bax, Fas ve Apaf-1 proteinlerinin miktarını arttırarak Bcl-2 ve Bcl-xL'nin baskılanması sağlanır, apoptoz indüklenir (Vousden ve Lu, 2002).

2.6.2. Apoptozda Görülen Morfolojik Değişiklikler

Temel olarak apoptoz bir hücrenin komşu hücrelerle olan bağlantı bölgelerinin kopması ve büzülmesi ile karakterizedir. Hücrenin geçiş bölgeleri olan Na, K, Cl taşıyıcı sistemin çalışmaması durumunda hücre içi ve dışı arasında sıvı geçişi olmaz ve hücre büzülür. Apoptotik hücre diğer hücrelere göre daha küçüktür ve sitoplazması yoğundur. Bu yoğunluk sebebiyle organeller çok sayıda görünürler. Elektron mikroskopunda önce hücre membranında yapısal bozulmalar ve kabarıklıklar görülür. Normalde hücre membranının sitoplazmik yüzünde bulunan fosfolipidlerin, membranın dış yüzünde yerleşim gösterir ve bu fagositik hücreler için sinyal görevi görür. Apoptoza giden hücre kromatini yoğunlaştırır, parçalar şeklinde bir araya toplanır. Çekirdek şekli bozulur, porlar seçilemez duruma gelir. Sitoplazmik parçalardan oluşan organel içeren parçalar, komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından sindirilir (Cohen, 1993 ; Tomatır, 2003).

2.6.3. Apoptoz ile Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptoz ile nekroz farklı kavramlardır. Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersi küçülür. Nekrozisde kromatin normal hücre yapısındakine benzerken, apoptozda kromatin kondanse olur, parçalara ayrılır. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır (Ulukaya, 2003).

2.7. ÇALIŞMANIN AMACI

Üremeye Yardımcı Tedavi uygulamaları kapsamında, kemoterapi ve radyoterapi alacak genç hastalara, düşük ovaryan rezervine sahip hastalara fertilitte koruma amacıyla oosit veya gonad dokusu kriyoprezervasyonu uygulanmaktadır. Partneri bulunmayan veya pre-pubertal dönemde olan hastalarda ya da oosit dondurma işlemi için gerekli ovaryan stimülasyon tedavilerinin kontrendike olduğu olgularda gonad dokusu kriyoprezervasyonu tercih edilmektedir. Bu uygulamalarda başarıyı etkileyen en önemli etken, dondurma-çözme sonrası dokunun canlılığının korunmasının yanı sıra, dondurulan dokunun çözülerek hastaya tekrar transplantasyonu gerçekleştirildiğinde re-vaskülarizasyonunun gerçekleşmesi, doku

kaybının en aza indirgenmesi ve transplante edilen dokuda ovaryan folikül aktivasyonunun tekrar gerçekleşmesidir.

Ovaryum dokunun transplantasyon öncesi küçük parçalara ayrılarak (fragmente formda) hastaya transplantasyonu sonrası ovaryan folikül aktivasyonunun primordiyal folikül havuzunda azalmayı engelleyememekle birlikte, antral folikül sayısını arttırdığı bilinmektedir. Oositin mayotik aktivasyonunun tekrar başlamasını tetikleyen moleküler mekanizmalar doğrultusunda, transplantasyon öncesi ovaryan dokunun in vitro ortamda PTEN inhibitörleri ve/veya PI3-kinaz aktivatörleri ile inkübasyonu ovaryan folikül aktivasyonunda etkin rol oynadığı bildirilen çalışmalarda klinik düzeyde ovaryan foliküllerin aktivasyonu üzerine yoğunlaşmakta, deneysel modellerde hücre kaybı ve farklı gelişim evrelerindeki ovaryan foliküllerin aktivasyonu üzerine etkisi çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır.

Bu çalışmada hızlı kriyopreservasyon yöntemi olan vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan ovaryan doku örneklerinin otransplantasyonu öncesi fragmentasyon ve moleküler aktivatörlerle kültüre edilmesinin foliküler korunma ve aktivasyona etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DeneY Hayvanları ve Gruplandırma

Bu çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu tarafınca 28.06.2016 tarihli onayı alındıktan sonra yapılmıştır. Çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi DeneY Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ışık mikroskopi laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada DeneY Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden alınan Wistar Albino cinsi, 4-6 haftalık, menstrual siklusu başlamış 25 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar su ve besin kısıtlaması olmaksızın, 12'şer saatlik aydınlık/ karanlık döngüsünde kafeslerde tutuldu. Ovaryan siklusun her grupta aynı dönemde olabilmesi için uygulama öncesi vajinal smear alındı. Östrus – proöstrus evresinde iken sıçanlar genel anestezisi ile uyutularak dorsal alandan 0,5-1,0 cm'lik bir insizyon ile sağ ovaryum çıkarıldı ve emilebilir sütür ile insizyon kapatılıp, hayvan yaşatıldı. Ovaryektomi sonrasında vitrifikasyon ve çözme işlemi etilen glikol, DMSO, sükröz ve serum supplement solüsyonları ile laboratuvar ortamında hazırlanan vitrifikasyon ve çözme solüsyonlarıyla gerçekleştirildi. Vitrifikasyon sonrası dokular kriyovialler içinde -180°C'de likit nitrojende bekletildi. Dokuların çözme işlemi yapıldıktan sonra, kültüre edilen dokular genel anestezi altında dorsal alandan açılan 0,5-1 cm bir insizyon ile böbrek kapülü altına transplante edildi ve emilebilir sütür ile insizyon kapatıldı. Transplantasyon sonrası 21 gün yaşatılan sıçanlara ether anestezisi sonrası servikal dislokasyon uygulandı ve transplante edilen ovaryum dokuları çıkarılarak histolojik preparasyonu gerçekleştirildi.

Çalışma aşağıda detayları belirtilen 5 gruba ayrıldı;

Grup 1 (Kontrol grubu, n= 5); diseksiyon sonrası çıkarılan ovaryum dokusu ikiye bölünerek her iki doku örneği vitrifikasyon (hızlı dondurma) yöntemi ile donduruldu. Ovaryektomi sonrası 10. gün ovaryum dokuları çözüldü ve doku herhangi bir uygulamaya maruz bırakılmadan, aynı gün aynı sıçanın böbrek kapsülü

altına transplantasyonu gerçekleştirildi. Ototransplantasyon sonrası 21. gün ovaryum dokuları çıkarılarak histolojik preparasyonu yapıldı.

Grup 2 (Fragmant Kontrol Grubu, n= 5); diseksiyon sonrası çıkarılan ovaryum dokusu ikiye bölünerek her iki doku örneği vitrifikasyon (hızlı dondurma) yöntemi ile donduruldu. Ovaryektomi sonrası 10. gün ovaryum dokuları çözüldü ve ardından küçük parçalara ayrılan doku örneklerinin böbrek kapsülü altına transplantasyonu gerçekleştirildi. Ototransplantasyon sonrası 21. gün ovaryum dokuları çıkarılarak histolojik preparasyonu yapıldı.

Grup 3 (Deney Grubu, n= 5); diseksiyon sonrası çıkarılan ovaryum dokusu ikiye bölünerek her iki doku örneği vitrifikasyon (hızlı dondurma) yöntemi ile donduruldu. Ovaryektomi sonrası 8. gün ovaryum dokuları çözüldü ve 48 saat süreyle PI3-kinaz aktivatörü içeren DMEM medyumunda kültüre edildi (37°C'de, %5 CO2 ve %99 nem ortamında). İnkübasyonun ardından doku örneklerinin aynı sıçanın böbrek kapsülü altına transplantasyonu gerçekleştirildi. Ototransplantasyon sonrası 21. gün ovaryum dokuları çıkarılarak histolojik preparasyonu yapıldı.

Grup 4 (Deney Grubu, n= 5); diseksiyon sonrası çıkarılan ovaryum dokusu ikiye bölünerek her iki doku örneği vitrifikasyon (hızlı dondurma) yöntemi ile donduruldu. Ovaryektomi sonrası 8. gün ovaryum dokuları çözüldü ve küçük parçalara ayrıldı. Fragmantasyonu gerçekleştirilen doku örnekleri 48 saat süreyle PI3-kinaz aktivatörü içeren DMEM medyumunda kültüre edildi (37°C'de, %5 CO2 ve %99 nem ortamında). İnkübasyonun ardından doku örneklerinin sıçanların böbrek kapsülü altına transplantasyonu gerçekleştirildi. Ototransplantasyon sonrası 21. gün ovaryum dokuları çıkarılarak histolojik preparasyonu yapıldı.

Grup 5 (Deney Grubu, n= 5); diseksiyon sonrası çıkarılan ovaryum dokusu ikiye bölünerek her iki doku örneği vitrifikasyon (hızlı dondurma) yöntemi ile donduruldu. Ovaryektomi sonrası 8. gün ovaryum dokuları çözüldü ve doku örnekleri 48 saat süreyle PI3-kinaz aktivatörü içeren DMEM medyumunda kültüre edildi (37°C'de, %5 CO2 ve %99 nem ortamında). İnkübasyonun ardından doku örnekleri küçük parçalara ayrıldıktan sonra sıçanların böbrek kapsülü altına transplantasyonu gerçekleştirildi. Ototransplantasyon sonrası 21. gün ovaryum dokuları çıkarılarak histolojik preparasyonu yapıldı.

3.2. Ovaryum Dokusu Diseksiyonu ve Transplantasyonu

Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde sevofluran anestezisi ile genel anestezi altında dorsal alandan açılan 0,5-1 cm 'lik bir insizyon ile sağ ovaryum alındı ve dondurma işlemi yapıldı. Hayvanlar cerrahi müdahale sonrası yaşatıldı. Dokular çözüldükten sonra genel anestezi verilen sıçanların dorsali traşlandı, küçük bir insizyon açıldıktan sonra ekartör ile böbrek vücut dışına çıkarıldı. Böbrek serum fizyolojik (SF) ile yıkandı. Penset yardımıyla böbrek kapsülü altına ovaryum dokuları yerleştirildi. Ovaryum dokusunun kapsül altından çıkmasını engellemek için böbrek kapsülü koter ile yakılıp böbrek yerine konuldu. Cilt altı ve cilt katmanlarına uygun olarak sütürize edilip kapatıldı (Şekil 4).

Transplantasyondan 21 gün sonra eter anestezisi ile uyutulan sıçanlara perfüzyon fiksasyonu uygulandı. Perfüzyon fiksasyonunda serum fizyolojik (SF) ve fosfat tamponuyla hazırlanan %4'lük paraformaldehit fiksatif olarak kullanıldı. Herbir denek için SF'ten 50 ml, %4'lük paraformaldehitten 300 ml kullanıldı. Eter anestezisi ile denek bayıldıktan sonra sırt üstü yatırıldı ve göğüs kafesi seviyesinden ventral kesi uygulanarak kalbe ulaşıldı. Kalbin apeks kısmından iğne ile aort içine girildi. Kalbin sağ aurikulası kesildi, SF infüzyonu ile dolaşımdaki tüm kanın temizlenmesi beklendi. SF sonrası paraformaldehid verilerek ilgili dokunun fiksasyonu gerçekleştirildi (Şekil 5).

Diseksiyon sonrası böbrek kapsülü altından alınan sağ ovaryum doku örneklerine 48 saat boyunca %4'lük paraformaldehit içinde immersiyon fiksasyon uygulandı (Şekil 6)



Şekil 4. Böbrek kapsülü altına transplantasyonu gerçekleştirilmiş ovaryum doku örneklerinin görüntüsü



Şekil 5. Perfüzyon fiksasyonun uygulanması



Şekil 6. Perfüzyon fiksasyon sonrası diseksiyonu gerçekleştirilen böbrek kapsülü altında ovaryum doku örneklerinin görüntüsü

3.3. Ovaryumun Dondurulması ve Çözülmesi

Elde edilen tüm ovaryum dokularının vitrifikasyon işleminde laboratuvarında hazırlanan dondurma ve çözme solüsyonları kullanıldı.

3.3.1. Vitrifikasyon Protokolü

Vitrifikasyon işleminde iki farklı solüsyon kullanıldı

Equilibration buffer (EB);

- HEPES (Irvine Scientific #90126)
- Etilen Glikol (ET) (SIGMA E9129)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO)
- Serum Suplement (SSS) (Irvine Scientific) içeren ilk basamak dondurma solüsyonu, 0.22 µm çaplı mikrofiltreden geçirildi ve 15ml'lik Falcon santrifüj tüpünde oda sıcaklığında bekletilerek hazır hale getirildi

Vitrification buffer (VB);

- Sükroz (SIGMA #S-1888)
- HEPES (Irvine Scientific #90126)
- Etilen Glikol (ET) (SIGMA E9129)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO)
- Serum Suplement (SSS) (Irvine Scientific) içeren ikinci basamak dondurma solüsyonu, 0.22 µm çaplı mikrofiltreden geçirildi. +4 °C’de bekletildi.

15 ml’lik santrifüj tüpüne 1ml EB solüsyonu konuldu. Ovaryektomi ile alınan dokular EB solüsyonu içine konuldu ve oda sıcaklığında, 25 dakika bekletildi. Dakikada bir kez tüp ters-yüz edilerek solüsyonun dokunun tüm yüzeylerine temas etmesi sağlandı.

EB solüsyonundan alınan dokular içerisinde 1 ml’lik VB solüsyonu olan santrifüj tüpüne aktarıldı ve doku örneklerinin tüpün tabanına çökmesi gerçekleşene kadar inkübasyon işlemi sürdürüldü. Tüpün tabanına çöken dokular solüsyon içinden alındı, likit nitrojen içerisine daldırıldı. İçerisinde likit nitrojen bulunan 2ml’lik kriyoviallere konularak azot tankında likit nitrojen içerisinde saklandı.

3.3.2. Thawing (Çözme) Protokolü

Çözme işleminde üç farklı solüsyon kullanıldı.

Thawing solution (TS);

- Sükroz (SIGMA #S-1888)
- HEPES (Irvine Scientific #90126)
- SSS (Irvine Scientific #90126) içeren ilk basamak çözme solüsyonu, 0.22 µm çaplı mikrofiltreden geçirildi ve +4 °C’de 15ml’lik santrifüj tüpünde bekletilerek hazır hale getirildi

Dilution solution (DS);

- Sükroz (SIGMA #S-1888)
- HEPES (Irvine Scientific #90126)
- SSS (Irvine Scientific #90126) içeren ikinci basamak çözme solüsyonu, 0.22 µm çaplı mikrofiltreden geçirildi ve +4 °C'de 15ml'lik santrifüj tüpünde bekletilerek hazır hale getirildi.

Washing solution (WS);

- HEPES (Irvine Scientific #90126)
- SSS (Irvine Scientific #90126) karıştırılarak 15ml'lik santrifüj tüpünde steril tüpe alınıp +4°C'de bekletildi.

Çözme işleminde azot tankı içerisinde bulunan dokular; 15ml'lik santrifüj tüpünde bulunan, önceden 37°C de ısıtılmış 1ml TS içine alındı ve inkübatörde 3dk süreyle bekletildi. İnkübatörden çıkarılan dokular oda sıcaklığında santrifüj tüpündeki 1ml DS içine alındı ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme esnasında tüp dakikada bir kez ters-yüz edildi. Ardından doku örnekleri oda sıcaklığında 1ml WS içine alındı.

3.4. Ovaryum Dokusunun İnkübasyonu

Kültür solüsyonu içerisine eklenecek olan Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) için Gonal-F 450IU/0.75 ml kullanıldı. İlaç kullanma talimatında belirtildiği şekilde distile su ile hazır hale getirildi.

Kültür solüsyonu;

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- HSA (Human Serum Albumin)
- Penisilin
- FSH (Gonal-F, MerckSerono ilaç)
- 740-YP (Tocris-Fosfotidilinositol-3-kinaz aktivatörü) ile hazırlandı.

Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'te bulunan sıçanlardan ether anestezisi sonrası 0,5-1,0 cm'lik bir insizyon ile elde edilen ovaryum dokuları, vitfirikasyon (hızlı dondurma) ve çözme işlemi (thawing) uygulandıktan sonra, içerisinde kültür

solüsyonu bulunan fourwell (Falcon) kültür kabında, 37°C'de, %5 CO2 ve %99 nem ortamında 48 saat süreyle bekletildi (Şekil 7 ve Şekil 8).



Şekil 7. Fragmante ovaryum doku örneklerinin inkübasyonu



Şekil 8. Yarım ovaryum doku örneklerinin inkübasyonu

3.5. Işık Mikroskopik Preparasyon

Fiksasyon sonrası doku takibi işlemi Tablo 1’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2245) ile 5µm kalınlığında seri kesitler lamlara alındı. Morfolojik değerlendirme için, her bir doku bloğundan alınan kesitlere hematoksilen-eozin (H&E) boyaması yapıldı.

Tablo 1. Doku Takibi Basamakları

Sıra	İşlem	Süresi
1	%50’lik alkol	2 saat
2	%70’lik alkol	2 saat
3	%90’lik alkol	2 saat
4	%96’lik alkol-I	2 saat
5	%96’lik alkol-II	Gece boyu
6	Ksilen-I	1,5 saat
7	Ksilen-II	1,5 saat
8	Parafin-I	1,5 saat
9	Parafin-II	1,5 saat
10	Parafin-III	1 saat
11	Gömme	

3.6. Hematoksilin-Eosin Boyama ve Morfolojik Değerlendirme

5 µm kalınlığındaki kesitler 60°C’lik etüvde (Isokal EN 500) gece boyunca bekletildi. Ksilen ile deparafinize edildikten sonra H&E boyama işlemi uygulandı (Tablo 2).

Tablo 2. Hematoksilin & Eozin Boyama Protokolü

Sıra	İşlem	Süre
1	%96’lık alkol	3 dakika (dk)
2	%90’lık alkol	3 dk

3	%70'lik alkol	3 dk
4	Çeşme suyu	3 dk
5	Harris'in Hematoksileni	10 dk
6	Çeşme suyu	Suyun rengi şeffaf olana kadar
7	Asit alkol	1-2 dips
8	Çeşme suyu	3 dk
9	Amonyaklı su	1-2 dips
10	Çeşme suyu	3 dk
11	Eozin	2-5 dk
12	Çeşme suyu	Suyun rengi şeffaf olana kadar
13	%70'lik alkol	7 dips
14	%90'lık alkol	7 dips
15	%96'lık alkol	7 dips
16	Ksilen-I	20 dk
17	Ksilen-II	20 dk
18	Kapatma	

H&E ile boyanan kesitlerde foliküllerin morfolojik sınıflandırılması folikül büyüklüğü, zona pellusida varlığı, foliküllerdeki granüloza hücrelerin şekli ve granüloza hücre tabakasının katman sayısına göre sınıflandırıldı (Ross, 2011).

Sınıflandırmaya göre;

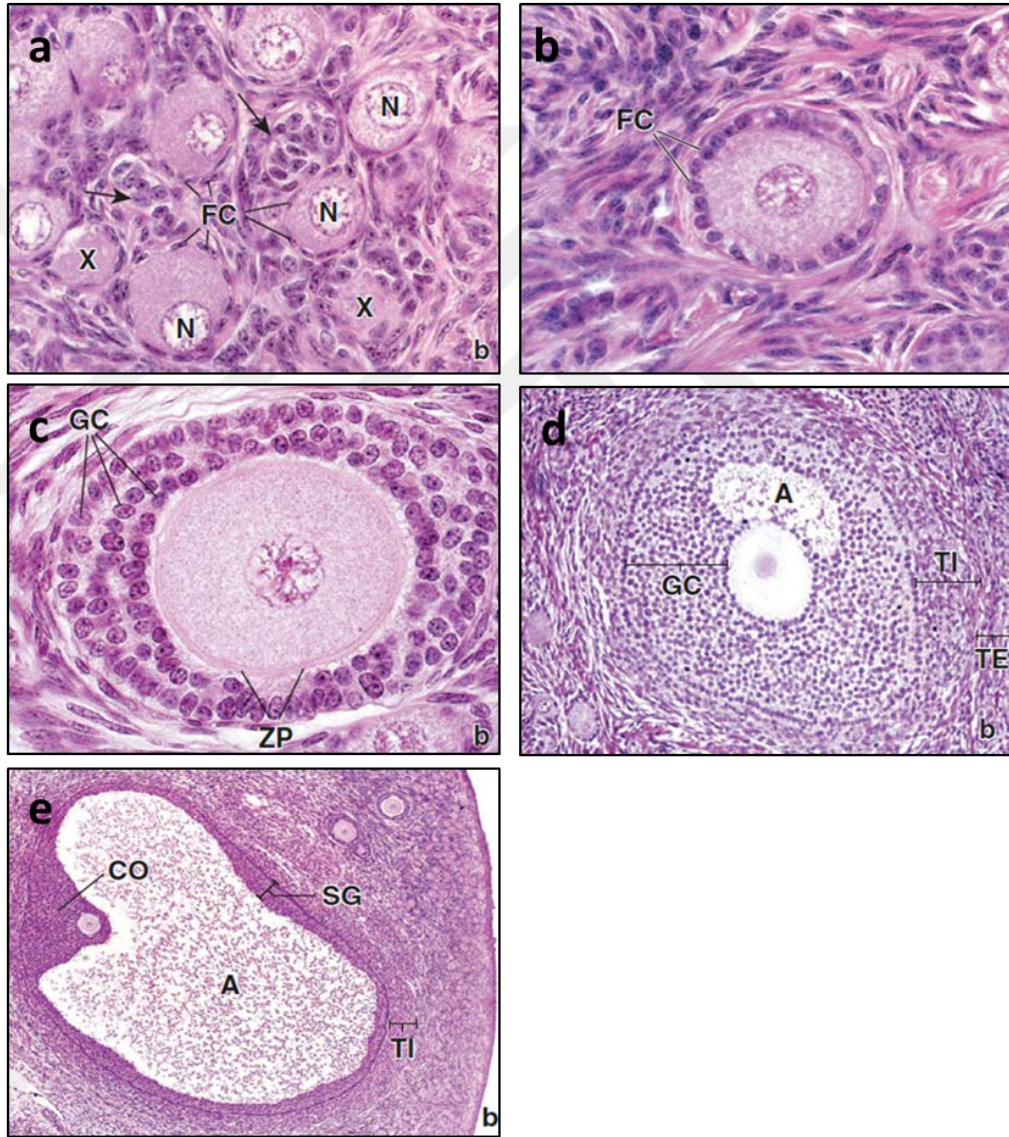
- Primordiyal folikül; primer oositi çevreleyen yassı tek sıralı granüloza hücreleri ile çevrili folikül

- Unilaminar primer folikül; zona pellusidası oluşmaya başlamış primer oositi çevreleyen tek sıra kübik granüloza hücreleri içeren folikül

- Multilaminar primer folikül; zona pellusidası gelişmiş primer oosit ve çevresinde üç sıradan fazla kübik granüloza hücre tabakası içeren folikül. Granüloza hücreleri arasında henüz folikül sıvısı birikimi başlamamış olup, teka tabakası belirginleşmeye başlayan folikül

• Sekonder folikül; primer oosit ve etrafını çevreleyen 5 ya da daha fazla sıralı kübik granüloza hücreleri, granüloza hücre tabakası içinde folikül sıvısı birikiminin görüldüğü, teka interna ve eksterna tabakalarının belirgin olarak ayırdedilebildiği folikül

• Olgun (Graaf) folikül; çap olarak en geniş olan ve folikül sıvısının tek bir antral boşluk içinde toplandığı, primer oositin antrum içinde eksantrik yerleşim gösterdiği (kenara itilmiş), primer oositi çevreleyen korona radiata ve kumulus ooforus hücrelerinin belirginleştiği folikül (Şekil 9) (Ross, 2011)



Şekil 9. a) Primordiyal folikül b) Unilaminar primer folikül c) Multilaminar primer folikül
d) Sekonder folikül e) Graaf folikül (Ross,2011)

Kesitlerin histolojik değerlendirmesi Olympus BX-FLA Reflected Light Flourescence Attachment adapte edilmiş Olympus BX50 mikroskopla 10X-20X-40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD renkli kamera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinden gerçekleştirildi.



4. BULGULAR

4.1. Ovaryum Dokusunun Morfolojik Değerlendirilmesi

Kontrol gruplarını oluşturan Grup 1 ve Grup 2'deki Wistar Albino cinsi, 4-6 haftalık, menstrual siklusu başlamış sıçanlardan alınan sağ ovaryum dokuları ikiye bölünüp vitrifikasyon (hızlı dondurma) yöntemiyle donduruldu. Vitrifikasyondan 10 gün sonra dokulara Thawing (çözme) işlemi uygulandı. Çözme sonrasında Grup 1'i oluşturan numuneler yarım ovaryum dokusu şeklinde, Grup 2'yi oluşturan numuneler ovaryum dokusu fragmente edildikten sonra, kültür medyumunda bekletilmeden, aynı hayvanın böbrek kapsülü altına ototransplantasyonları gerçekteşirildi.

Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'i oluşturan sıçanlardan elde edilen sağ ovaryum dokuları ikiye bölünüp vitrifikasyon (hızlı dondurma) yöntemiyle donduruldu. Vitrifikasyon sonrası 8. gün ovaryum dokuları çözüldü.

Grup 3'teki hayvanlara ait dokular yarım ovaryum halinde 48 saat süreyle PI3-kinaz aktivatörü içeren DMEM medyumunda kültüre edildi. Ovaryum dokuları kültüre edildikten sonra böbrek kapsülü altına ototransplantasyonu gerçekteşirildi.

Grup 4'teki hayvanlara ait yarım ovaryum dokuları fragmente edildikten sonra 48 saat süreyle PI3-kinaz aktivatörü içeren DMEM medyumunda kültüre edildi. Ovaryum dokuları kültüre edildikten sonra böbrek kapsülü altına transplante edildi

Grup 5'teki hayvanlara ait dokular yarım ovaryum şekilde 48 saat süreyle PI3-kinaz aktivatörü içeren DMEM medyumunda kültüre edildi. Ovaryum dokuları kültüre edildikten sonra fragmente edilip böbrek kapsülü altına transplante edildi.

21 gün sonra Kontrol ve Deney gruplarına ait ovaryum dokularına doku takibi ve ışık mikroskopik preparasyon prosedürleri uygulandı. H&E ile boyanan preparatlarda ovaryum dokularının genel görünümleri değerlendirildi.

4.1.1. Yarım Ovaryum Dokusunun Ototransplantasyonu Sonrası Histomorfolojik Bulguları (Grup 1)

Yarım ovaryum dokularının hem böbrek kapsülüne ototransplantasyonu hem de histolojik preparasyonu (özellikle doku takibi, bloklama ve kesit alma aşamaları), doku büyüklüğünün preparasyona daha rahat izin vermesi nedeniyle, kolay gerçekleştirildi. Histolojik preparasyonu sonrası parafin bloklardan kesit alma aşamasında kesit bütünlüğünün daha iyi korunduğu görüldü. Ovaryum dokuları ile böbrek parankiması arasında devamlılık belgindi (Şekil 10a ve Şekil 10b). Ovaryumun periferinde tek katlı yassı ve/veya kübik hücrelerden oluşan germinal epitel seçilebilmekle beraber, yer yer döküldüğü görüldü (Şekil 11a). Korteks ve medulla ayırımının yarım ovaryum dokularında yapılması mümkün oldu. Medulla tabakasında daha yoğun olmak üzere vaskülarizasyonda belirgin artış gözlemlendi (Şekil 10a ve Şekil 10b). Doku örneklerinde kronik inflamasyona bağlı olarak yaygın lenfositik ve monositik infiltrasyon görüldü (Şekil 11b).

Ovaryumun korteks tabakasında gelişiminin farklı aşamalarında normal ve atretik ovaryan foliküller izlendi. Erken gelişim aşamasında olan foliküllerin tüm kesitlerde daha yoğunlukta olduğu gözlemlendi (Şekil 12a ve Şekil 12b). Fragmente gruplarla karşılaştırıldığında (Grup 2, Grup 4 ve Grup 5) foliküller bütünlüğün ve stromal yapıların daha iyi korunduğu, doku sınırlarının belirgin olduğu görüldü (Şekil 10a ve Şekil 10b). Kontrol grubunda dokunun bütünlüğünün korunması ve germinal epitelin tanımlanması mümkün olduğu için, germinal epitel altında yerleşik olan tek sıra yassı folikül hücreleri ile çevrili primer oositten oluşan primordiyal foliküllerin dağılımı diğer gruplara göre daha net gözlemlendi (Şekil 12a). Primordiyal folikül benzeri, folikül hücre sayılarının azaldığı atipik foliküller tüm gruplarda olduğu gibi kontrol grubunda da görüldü. Gelişmekte olan foliküller arasında tek tabakalı kübik folikül hücreleri ile çevrili primer oositten oluşan unilaminar primer folikül ve çok tabakalı kübik folikül hücrelerinin oluşturduğu granüloza tabakasına sahip multilaminar primer foliküller kontrol grubunda yaygın olarak gözlemlendi (Şekil 12a ve Şekil 12b). Morfolojik özelliklerine göre gelişimsel aşamasının değerlendirilmesi mümkün olan foliküller dışında, oosit içermeyen juksta pozisyonunda yerleşmiş granüloza hücrelerinin olduğu folikül benzeri dejenerasyon bulgusu veren yapılar gözlemlendi (Şekil 12a ve Şekil 12b). Foliküllerde oosit seviyesinden geçen kesitlerde oositlerde piknotik çekirdek, ooplazmik vakuoller,

sitoplazma bütünlüğünde bozulmalar gözlemlendi. Fragmente ovaryum dokularında daha yoğun olmakla birlikte, kontrol grubunda da stromadan ayrılmış foliküller görüldü.

Korteks tabakası içinde az sayıda sekonder folikül görüldü. Folikül sıvısının birikmeye başladığı sekonder foliküllerde normal morfolojili, folikül çevresinde bulunan stroma hücrelerinin düzenlenmesiyle oluşan teka interna ve teka eksterna tabakalarının ayırt edilebildiği foliküllerin yanında, granüloza tabakasında ayrılmaların olduğu, pikotik çekirdeğe sahip granüloza tabakası ile çevrili, primer oositin normal morfolojisinin gözlenmediği dejenerasyona giden foliküller gözlemlendi. Graaf foliküllerde büyük bir antrum, folikülün bir kenarında konumlanmış oositi çevreleyen korona radiata hücreleri ve granüloza hücreleri ile oosit arasındaki köprüyü oluşturan korona ooforus hücreleri izlendi. Kontrol gruplarında teka lutein ve soluk boyanmış granüloza lutein hücrelerinin ayırt edici özelliği ile korpus luteum yapıları belirgin gözlemlendi (Şekil 13a). Erken aşamada ve preantral aşamada atretik foliküller, dejenere görünümde oosit, belirsiz zona pellusida ve piknotik görünümde dökülmüş folikül hücreleri ile ayırt edildi (Şekil 14a ve Şekil 14b).

4.1.2. Fragmente Ovaryum Dokularının Ototransplantasyonu Sonrası Histomorfolojik Bulguları (Grup 2)

Yarım ovaryum dokuları dondurulup çözüldükten sonra fragmente edildi. Perfüzyon fiksasyon sonrası fragmente ovaryum dokularının böbrek kapsülü altından diseksiyonu sırasında ve doku takibi sonrasında, dehidratasyona bağlı olarak daha da küçülmesi nedeniyle bir kısmının kaybı gerçekleşti.

Fragmente doku örneklerinin böbrek parankiması ile devamlılığı kontrol grubuna göre daha azdı (Şekil 10c ve Şekil 10d). Doku bütünlüğünün iyi korunamadığı ve kesitlerde ağırlıklı olarak izole foliküller gözlemlendi. Ovaryumun periferinde tek katlı yassı ve/veya kübik hücrelerden oluşan germinal epitel dokunun küçüklüğü sebebiyle yer yer seçilebildi. Doku bütünlüğü korunamadığı için korteks ve medulla ayırımı çok belirgin değildi. Yassı granüloza hücreleri ile çevrili primordiyal foliküller yer yer gözlenmekle birlikte, kortekste genel olarak gelişmekte olan foliküller (tek tabakalı kübik hücre tabakası ile çevrili unilaminar folikül ve 2-4 sıra halinde granüloza hücre tabakasıyla çevrili multilaminar foliküller) ayırt edildi

(Şekil 10c ve Şekil 10d). Granüloza hücreleri arasındaki folikül sıvısı ile dolu olan boşluklarla karakterize sekonder foliküllerde yer yer hücre kayıpları görüldü. Granüloza hücrelerinin farklılaşmasıyla oluşan bağ dokusundan zengin teka interna ve teka eksterna tabakaları izlendi. Az sayıda görülen graaf foliküllerde nükleus seviyesinden geçmemiş kesitlerde primer oositi çevreleyen korona radiata ve folikül hücreleri ile bağlantıda bulunan kumulus ooforus hücreleri seçilebildi. Normal morfolojideki farklı gelişim aşamalarında bulunan foliküllere ek olarak, hücre kaybı yaşayan atipik foliküller yarım ovaryum dokusu bulunduran gruplara göre daha fazla görüldü (Şekil 12c ve Şekil 12d). Stromadaki vaskularizasyon artışı belirgindi.

4.1.3. Yarım Ovaryum Dokusunun IVA Uygulaması Sonrası Histomorfolojik Bulguları (Grup 3)

Bu grupta yarım ovaryum dokusunun doku preparasyonunun kolaylığı ve doku bütünlüğünün korunması nedeniyle histomorfolojik değerlendirilmesi, kesit sınırlarının belirlenmesi daha kolay oldu. Böbrek parankimasıyla ovaryum dokusunun devamlılığı izlendi. Germinal epitel fragmente doku örneklerine göre daha belirgindi, korteks ve medulla ayrımı kolaylıkla yapıldı (Şekil 10e ve Şekil 10f). Kortekste bulunan yassı hücre tabakasıyla çevrili primordiyal foliküllerin ve gelişimin erken aşamasındaki foliküllerin yoğunluğu gözlemlendi (Şekil 12e). Normal morfolojili unilaminar ve multilaminar foliküllerin yanısıra dejenere ve atretik folikül sayısındaki artış dokunun büyüklüğü ile korelasyon gösterdi. Dejenerasyon ve atreziye giden foliküller primer oosit sitoplazmasında vakuoler görünüm, belirsiz zona pellusida ve piknotik görünümde çekirdeğe sahip, yer yer dökülmüş granüloza hücreleri ile ayırt edildi. Normal ve dejenere korpus luteum yapıları belirgindi (Şekil 13b)

4.1.4. Fragmente Edilen Ovaryum Dokusunun IVA Uygulaması Sonrası Histomorfolojik Bulguları (Grup 4)

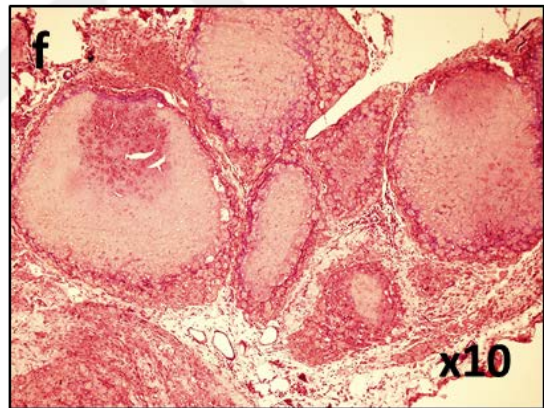
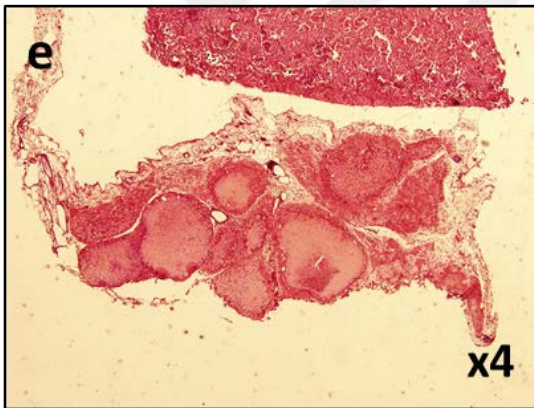
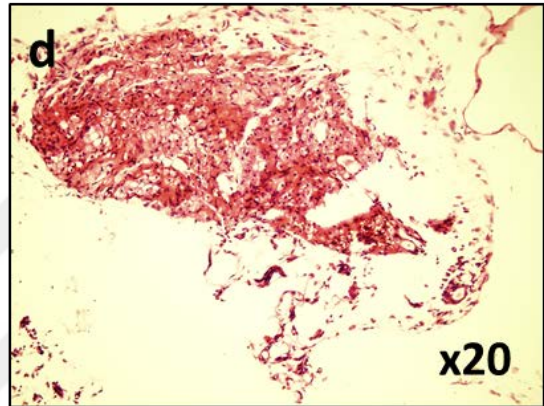
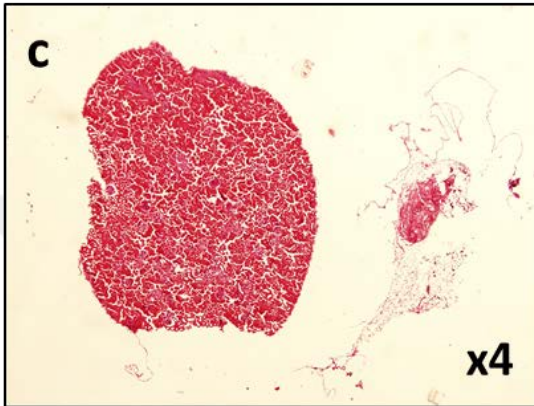
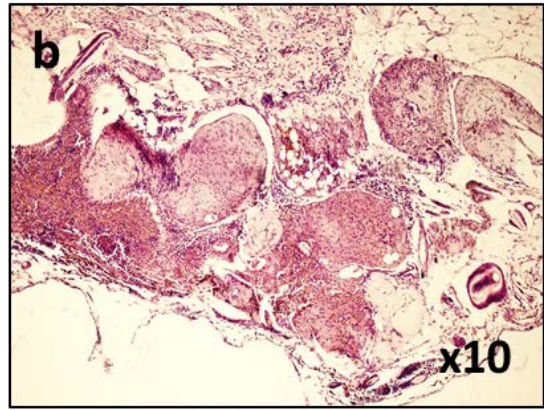
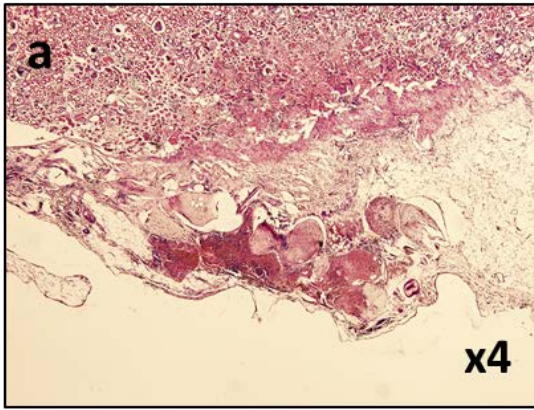
Doku diseksiyonu esnasında fragmentler halinde olan ovaryum dokuları böbrek ayrımı yapılamadı. Doku bütünlüğünün korunamaması ve küçük alanlarda ovaryum kesitlerinin gözlemlenmesi nedeniyle doku kesitlerinde korteks ve medulla ayrımı

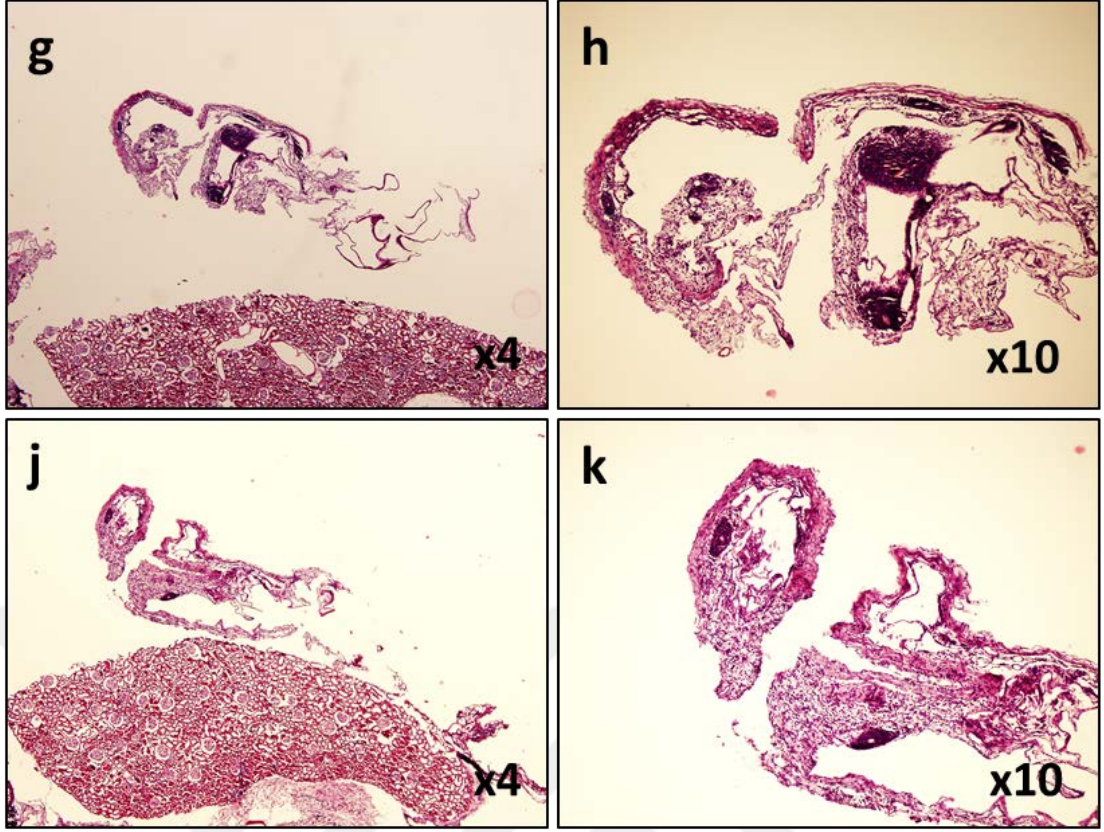
tam yapılamadı. Fakat folikül yerleşiminin görüldüğü korteks olarak tanımlanabilecek alanlarda gelişiminin farklı aşamalarında foliküller izlendi (Şekil 10g ve Şekil 10h). Erken gelişim aşamasında olan foliküller (unilaminar ve multilaminar foliküller) diğer fragmente ovaryum dokusu bulunduran gruplarda olduğu gibi (Grup 2 ve Grup 5) daha fazlaydı. Kronik inflamasyona bağlı olarak yaygın lenfositik ve monositik infiltrasyon görüldü. Diğer deney gruplarıyla benzer şekilde primer oositte vakuolizasyon, granüloza hücre kaybının görüldüğü atipik atretik foliküller görüldü (Şekil 12g ve Şekil 12h).

4.1.5. IVA Uygulaması Sonrası Fragmente Edilen Ovaryum Dokusunun Histomorfolojik Bulguları (Grup 5)

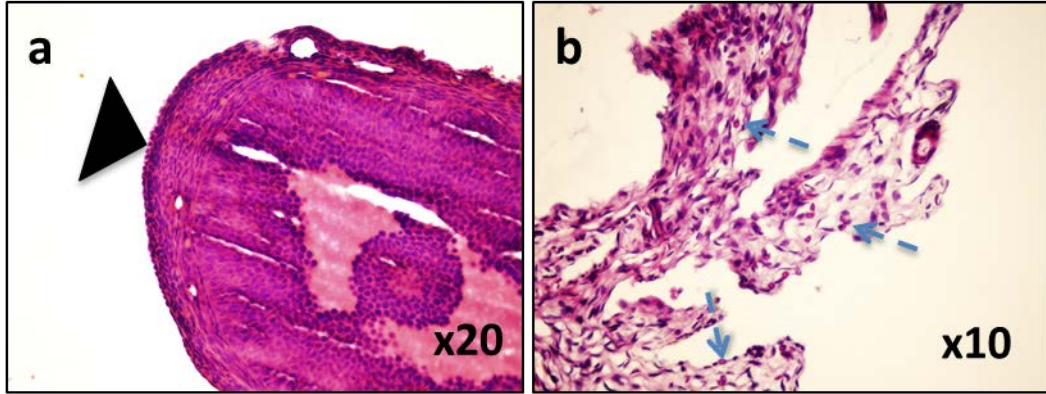
Grup 2 ve Grup 4'teki dokulara benzer şekilde bu grupta bulunan fragmente ovaryum dokularında doku bütünlüğünün korunmadığı görüldü. Dokuların küçük oluşu histolojik preparasyonu ve mikroskopik değerlendirmeyi güçleştirdi.

Doku sınırlarının belirgin olmayışı nedeniyle foliküler bütünlük ve stromada bulunan yapıların analizi her kesitte mümkün olmadı. Böbrek kapsülü ile fragmentler arasında gerçekleşen penetrasyon yer yer görüldü (Şekil 10j ve Şekil 10k). Tek katlı yassı ve/veya kübik hücrelerden oluşan germinal epitelin büyük miktarda döküldüğü izlendi. Tek sıra yassı folikül hücre tabakasıyla çevrili primordiyal foliküller, tek sıra kübik folikül hücreleriyle çevrili unilaminar primer folikül ve iki veya daha fazla hücre tabakasıyla çevrili multilaminar primer foliküller her grupta olduğu gibi bu grupta da daha yoğun görünen folikül gruplarıydı (Şekil 12j ve Şekil 12k). Bu grubu oluşturan kesitlerde sekonder ve graaf folikül görülmedi, ancak korpus luteum yapılarına yer yer rastlandı (Şekil 13c). Bu grupta da hücre sayısında azalma ile karakterize primordiyal ve unilaminar primer folikül benzeri atipik foliküller belirgindi (Şekil 12j). Unilaminar foliküllerde folikül sayılarında azalma olmakla birlikte, zona pellusidanın geliştiği gözlemlendi. Diğer gruplarla benzer morfolojik özellikte ve yoğunlukta gelişiminin erken aşamasında atretik foliküller görüldü.

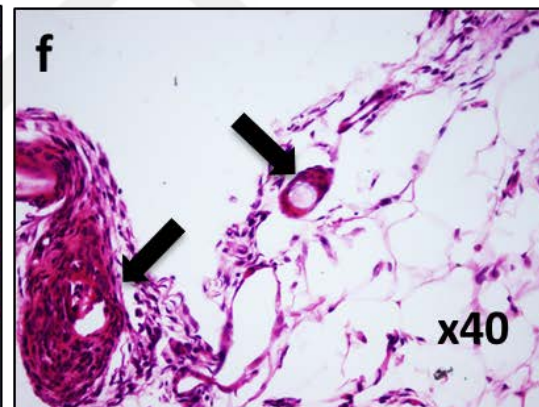
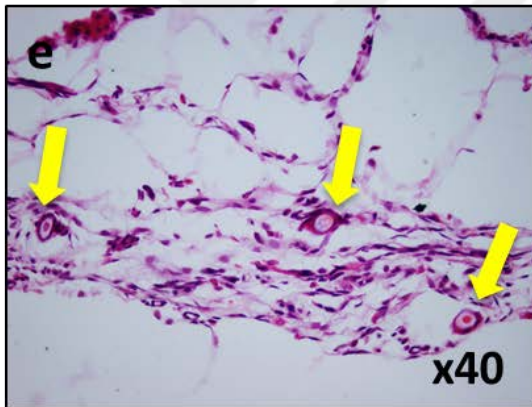
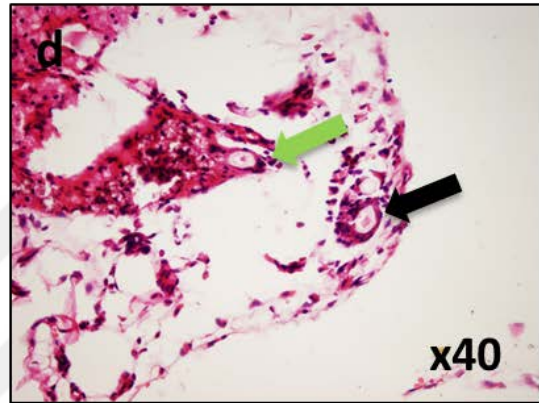
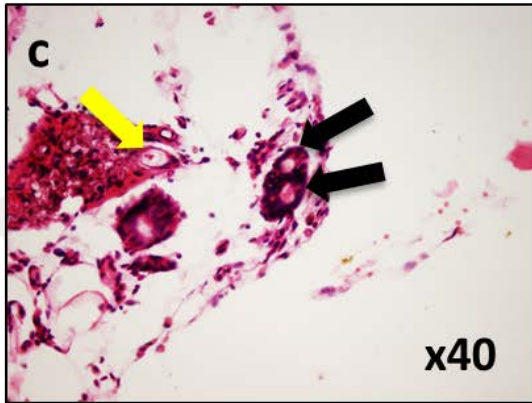
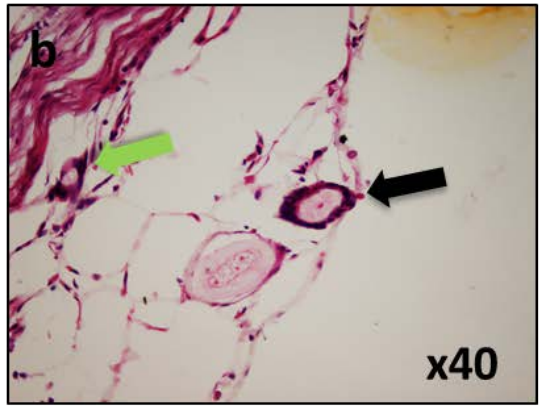
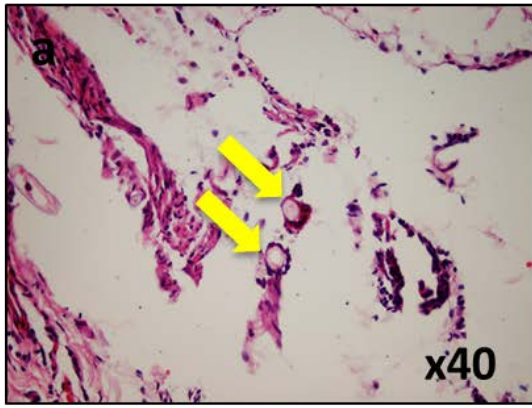


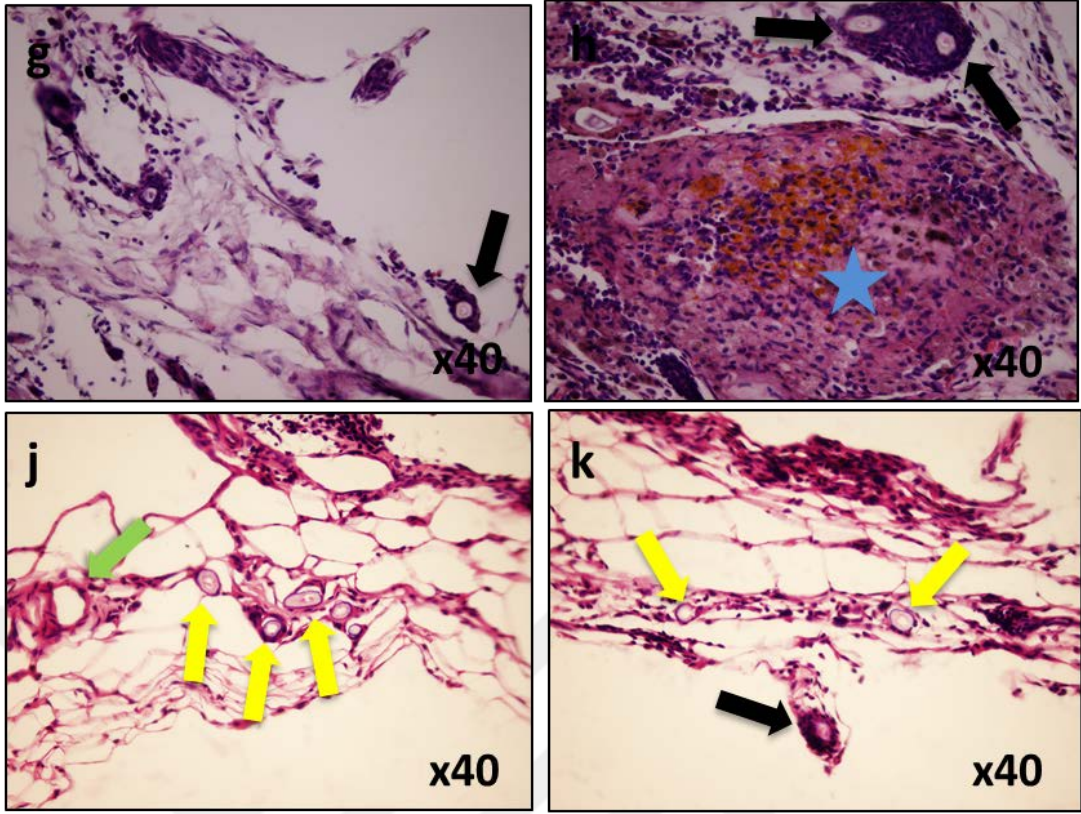


Şekil 10. a) Grup 1 genel görünüm, x4. b) Grup 1 genel görünüm, x10. c) Grup 2 genel görünüm, x4. d) Grup 2 genel görünüm, x20. e) Grup 3 genel görünüm, x4. f) Grup 3 genel görünüm, x10. g) Grup 4 genel görünüm, x4. h) Grup 4 genel görünüm, x10. j) Grup 5 genel görünüm, x4. k) Grup 5 genel görünüm, x10.

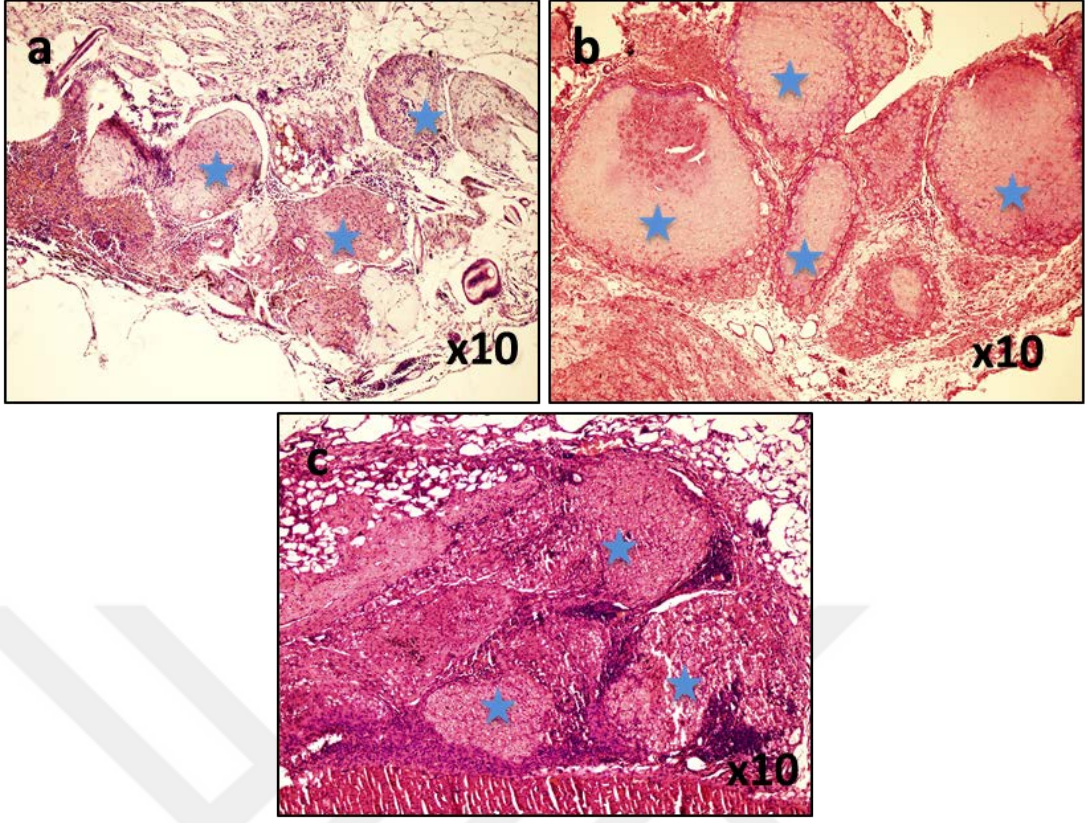


Şekil 11. a) Germinal epitel (siyah ok başı). b) Lenfosit infiltrasyonu (mavi-kesikli ok)

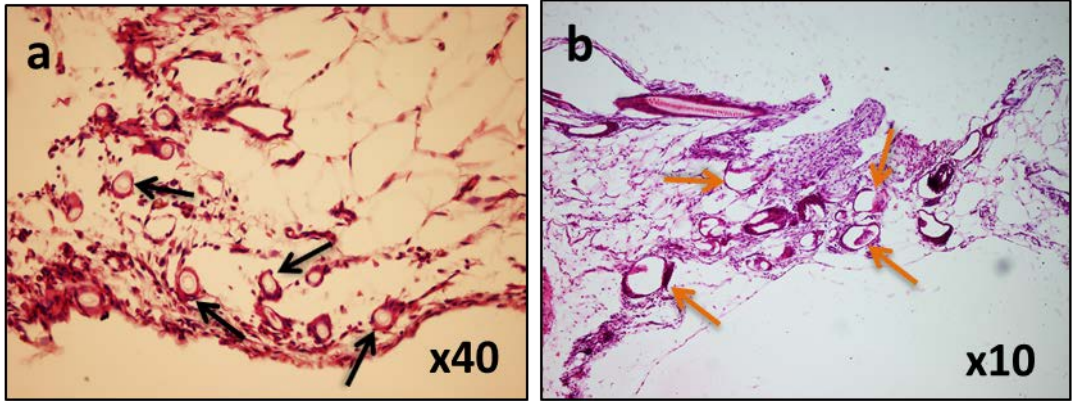




Şekil 12. Grup 1 (a ve b), Grup 2 (c ve d), Grup 3 (e ve f), Grup 4 (g ve h), Grup 5 (j ve k)
Primordiyal folikül (sarı ok), Unilaminar primer folikül (yeşil ok), Multilaminar primer folikül (siyah ok), Korpus luteum (mavi yıldız)



Şekil 13. Grup 1 (a). Grup 3 (b). Grup 5 (c). Korpus luteum (mavi yıldız)



Şekil 14. a) Gelişimin erken evresindeki atretik foliküller (siyah-ince ok). b) Preantral foliküller (turuncu-ince ok)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada ‘vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan ovaryum dokularının böbrek kapsülü altına ototransplantasyonu öncesinde dokunun fragmantasyonu ve/veya PI3-kinaz aktivatörü ile kültüre edilmesi foliküler aktivasyonu artırır’ hipotezinden yola çıkılarak; tek taraflı ovariyektomi yapılan deneklerde vitrifiye edilip çözülen ovaryum dokuları sadece ikiye bölünerek ya da küçük parçalara ayrılarak ve/veya PI3-kinaz aktivatörü içeren medyum içerisinde kültüre edilerek aynı deneğin böbrek kapsülü altına ototransplantasyonu gerçekleştirildi. Böbrek transplantasyonu ardından ovaryum dokularının histomorfolojik değerlendirmesi yapılarak, fragmantasyon ve/veya moleküler aktivatörün foliküler aktivasyona etkisi değerlendirildi. Doku fragmantasyonu ve/veya moleküler aktivatör uygulamasının ototransplantasyon sonrasında foliküler korunmaya farklı bir etkisinin olmadığı, fakat gelişimin erken aşamasındaki normal ve atipik morfolojide ovaryan foliküllerin artışına neden olduğu görüldü.

Çocuk, adolesan ve genç yetişkinlerde kanser hastalığının görülme sıklığı 1970’lerden itibaren artmış olup, tedavi yaklaşımlarındaki gelişmeler doğrultusunda 0-19 yaş aralığındaki hastalarda ölüm oranı düşmüştür. Mevcut 5 yıllık süreçte çocukluk çağındaki sağkalım oranı %83’ü geçmiştir. Bilinen şu ki çoğu kanser tedavisi (kemoterapi, radyoterapi veya kemoterapi-radyoterapi) gonadlar için yüksek toksisite içermektedir. Bu da prepubertal kız çocukları ve kadınlar için POI riski oluşturmakta ve infertiliteye neden olmaktadır (Dolmans ve ark., 2018). Özellikle erişkin hasta grubunda oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu fertilitenin korunması amacıyla en çok tercih edilen yöntemlerdir. Oosit kriyoprezervasyonu kanser hastası veya POI olan prepubertal dönemde kız çocukları için de uygun bir seçenektir. Ayrıca sperm gerektirmemesi partneri olmayan veya henüz çocuk sahibi olmayı düşünmeyen kadınlar içinde uygulanabilir bir yöntemdir. Ancak hormonal tedavi süresi gerektireceğinden ve kanser tedavisinin ertelenemeyeceği durumlarda uygunluğunu yitirmektedir (Taylan ve Oktay, 2017). Embriyo kriyoprezervasyonu partneri olmayan kadınlar ve prepubertal dönemde kız çocukları için uygun bir yöntem değildir. Oosit dondurma yönteminde olduğu gibi IVF tedavisinin 2-4 hafta

gibi bir süre gerektirmesi ve kanser tedavisinin ertelenememesi bu yöntemi olumsuz kılmaktadır (Fisch ve Abir, 2018)

Ovaryum dokusunun dondurulması ve transplantasyonu endikasyonu özellikle çocuk, adolesan, partneri olmayan ve diğer fertilitte koruma yöntemlerini kabul etmeyen hastalar için uygundur. Ayrıca benign ovaryan şartlarda (ovaryan tümör veya bükülme ve endometriyozis), genetik ve endokrin hastalıklarda (Turner sendromu, galaktozemi), otoimmün hastalıklarda ovaryum dokusunun dondurularak saklanması fertilitteyi korumak adına uygulanabilir bir yöntemdir. Klinikte rutin uygulanan bir işlem olmayıp, deneysel bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Dünya çapında 130'u aşkın canlı doğum ovaryum dokusunun dondurulması ve transplantasyonu ile sağlanmıştır (Amorim, 2018; Suzuki, 2019). Fakat bu canlı doğumların ikisi hariç (Kawamura, 2017) olmak üzere, diğerlerinde gebeliğin geliştiği oositin kaynağının dondurulup-çözülüp transplante edilen ovaryum dokusu kaynaklı mı yoksa çıkarılmayan ovaryum dokusu kaynaklı mı olduğu bilinmemektedir. Dolayısıyla ovaryum dokusunun total çıkarıldığı olgular dışında dondurma-çözme sonrası ovaryum transplantasyonunun etkinliği halen tartışmalı ve bu nedenle deneysel bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir.

Ovaryum dokusunda farklı büyüklükte hücrelerin bulunması kriyoprezervasyon yönteminin önemini ortaya çıkarmaktadır. Henüz dokuyu dondurmak için optimal bir prosedür bulunmamaktadır. Çoğu merkez geleneksel dondurma yöntemi olan yavaş dondurma yöntemini (slow freezing) uygulamaktadır. Ancak hızlı dondurma yöntemini benimseyen ve uygulamaya koyan merkez sayısı da gün geçtikçe artmaktadır. Bazı araştırmacılara göre vitrifikasyonun slow freezing yöntemine göre daha yüksek konsantrasyonda kriyoprotektanlar içermesi ovaryum dokusunda bulunan foliküller ve hücreler için toksik etki yaratmaktadır (Amorim ve ark, 2018). Ancak çeşitli kriyoprotektan ajanların beraber kullanılması bu toksisiteyi düşürmüştür. Meiorow ve ark., Suzuki ve ark., ovaryum fragmentlerindeki primordiyal foliküllerin dondurma ve çözmeden sonraki sayılarını belirlemek için iki kriyoprezervasyon yönteminden hangisinin daha başarılı olduğunun söylenemeyeceğini, bunun için yeterli hayvan çalışmasının bulunmadığını belirtmişlerdir (Meiorow ve ark, 2015; Suzuki ve ark, 2015).

Çözme işlemi esnasında hidrasyon sebebiyle dokudaki şişme hücrelerde bulunan organel zarlarının bütünlüğünü bozabilmektedir. Doku içerisinde oluşabilecek buz

kristali formu sebebiyle oosit ve granüloza hücre nukleuslarında piknotik görünümü arttırmaktadır. Hücreler arası bütünlüğün ve iletişimin kopması nedeniyle apoptotik hücre sayısında artış görülebilmektedir (Nawroth F. ve ark., 2005)

Ovaryum dokusunun büyüklüğü, kriyoprotektanların dokuya nüfuzunu ve dokudan izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Bütün olarak dokunun dondurulması yöntemi hala gelişim aşamasındadır. Kriyoprezervasyonun daha başarılı olması ve transplantasyon sonrası vaskülarizasyonun artması sebebiyle ovaryum dokusunun fragmentler halinde transplante edilmesi görüşü önerilmiştir. Dokular fragmente edilip dondurulduğunda foliküler kayıp ve görecekları hasar en aza indirgenir (Silber, 2012; Cho ve ark., 2019). Bu çalışmada BUÜTF Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nde fertilitte koruma amacıyla insan ovaryum dokularının kriyoprezervasyonunda uygulamakta olduğumuz ve doku morfolojisini-viabilitesini değerlendirerek güvenilirliğini test ettiğimiz vitrifikasyon protokolü kullanılarak deneklerin ovaryum dokuları donduruldu. Bu nedenle çalışma planlanırken deney gruplarına kriyoprezervasyon uygulanmayan bir kontrol grubu dahil edilmedi. Çalışmanın hipotezi dışında, deney grupları dokunun büyük ya da küçük parçalar halinde dondurulup-çözülüp transplante edilmesinin avantaj ve dezavantajları açısından bir değerlendirme fırsatı sundu. Fragmente edilip transplante edilen dokuların diseksiyon esnasında tamamının elde edilememesi nedeniyle deney gruplarında kantitatif olarak foliküler kaybın değerlendirilmesi mümkün olmamakla birlikte, dokuların büyük ya da küçük parçalar halinde ototransplantasyonunun doku korunmasında fark oluşturmadığı görüldü.

Dondurulup-çözülen dokunun transplantasyonu sonrası folikül sağkalımındaki en önemli etken iskemi ve hipoksi durumudur. Anjiyogenez bu noktada kilit rol oynamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda iskemik hasarın en fazla transplantasyon sonrası ilk günlerde gerçekleştiği belirtilmiştir (Lee, 2019) Anjiyogenezin başlama süresi cinslere göre farklılık gösterir. Sıçanlarda bu süre 48 saat olarak belirtilmiştir (Dissen, 1994). Bu çalışmada ototransplantasyon sonrası denekler 21 gün yaşatıldı. Tüm kontrol ve deney gruplarında yoğun vaskülarizasyon görüldü. Korteks-medulla ayırımı yapılabilen yarım ovaryum dokusunun transplante edildiği numunelerde vaskülarizasyonun medullada ve dokunun böbrek parankimasi ile devam ettiği alanlarda daha yoğun olduğu gözlemlendi. Fragmente doku örneklerinde vaskülarizasyonun yoğun olduğu alanları tanımlamak mümkün olmadı. Fragmente

doku örneklerinde izole ovaryan foliküller yoğun vaskülarizasyon görülen alanlarda saptandı.

Hücre içi sinyal yollarından PI3K-Akt-FOXO3, primordiyal folikül aktivasyonunda önemli rolü olduğu transjenik hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Primordiyal foliküller dormant fazda bekleyen foliküllerdir. In vitro aktivasyon (IVA) çalışmalarında PTEN inhibitörü ve PI3K stimülatörü fosfopeptid ile Akt aktive edilmiş, FOXO3'ün nuklear seviyesi arttırılmış bu sayede primordiyal foliküllerin dormant fazdan çıktığı belirtilmiştir (Kawamura 2016). Ayrıca fare ve insan çalışmalarında ovaryum dokusunun fragmantasyonu ile Hippo sinyal yolağı bozularak gelişmekte olan sekonder foliküllerin aktivasyonu sağlanmıştır. Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak doku fragmantasyonu sonrasında ve/veya PI3K aktivatörü uygulamasıyla özellikle gelişimin erken aşamasındaki ovaryan foliküllerde (unilaminar primer ve multilaminar primer foliküller) artış gözlemlendi. Fakat genel anlamda tüm foliküler aşamalarda atrezide artış görüldü. Tüm gruplarda korpus luteum yapılarının varlığı ovaryan siklusun devamlılığının, foliküler gelişim periyodunun gerçekleştiğinin göstergesi olarak yorumlandı.

Sonuç olarak çalışmamız; primer over yetmezliği olgularında, kemo-radyoterapi alacak prepubertal kız çocuklarında fertilité koruma amacıyla uygulanabilir deneysel bir yaklaşım olan ovaryan doku kriyoprezervasyonu ve ototransplantasyonunda, sağlıklı dokunun eldesi, primordiyal folikül rezervinin aktivasyonu açısından dokunun ototransplantasyon öncesi fragmente edilerek ve/veya moleküler aktivatörlerle uyarılmasının olumlu etkinliğini göstererek, klinik pratikte uygulanabilirliği konusunda literatüre katkı sağlamıştır.

6. KAYNAKLAR

- Accili D, Arden KC. (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*;117:421–426.
- Adhikari, D. and K. Liu (2009) Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev*, 30(5): p. 438-64.
- Agca, Y., (2000) Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. *ILAR J*. 41, 207–220
- Abedelahi A, Rezaei-Tavirani M, Mohammadnejad D. (2013) Fertility preservation among the cancer patients by ovarian tissue cryopreservation, transplantation, and follicular development. *Iran J Cancer Prev. Summer*;6(3):123-32.
- Amorim CA, Dolmans MM, David A, Jaeger J, Vanacker J, Camboni A. et al. (2012) Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertil Steril*; 98:1291–8.e1–2.
- Arden, K.C., Biggs III, W.H. (2002) Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 403, 292–298
- Beck-Peccoz P, Persani L. (2006). Premature ovarian failure. *Orphanet J Rare Dis.* 1:9.
- Benjamin Fisch and Ronit Abir (2018) Female fertility preservation: past, present and future *Reproduction* 156 F11–F27
- Besmer, P., Manova, K., Duttlinger, R., Huang, E.J., Packer, A., Gyssler, C., Bachvarova, R.F. (1993). The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Development Suppl.*, 125– 137
- Bucak N., Tekin N. (2007) Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 54, 67-72,
- Bunge RG, Sherman JK. (1953) Fertilization capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*; 172:767–768.
- Cantley LC. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655–1657
- Cate RL., Mattaliano RJ., Hession C. et al. (1986) Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in the animal cells. *Cell.* 45:685–696
- Chen C. (1986) Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet.*;1(8486):8846.
- Cho, Kim ve ark. (2019) A new possibility in fertility preservation: The artificial ovary *J Tissue Eng Regen Med.*;1–22.
- Christiani A. Amorim ve ark. (2018) Cryostorage and retransplantation of ovarian tissue as an infertility treatment *Best Practice & Research Clinical Endocrinology&Metabolism* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.09.002>
- Clara González, Montserrat Boada, Marta Devesa, Anna Veiga Concise (2012) Review: Fertility Preservation: An Update *Stem Cells Translational medicine* ;1:668–672
- Cohen J J. (1993) Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract.*15: 35- 43
- Cummings M.C., Winterford C.M., Walker N.I. (1997) Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 21: 88- 101
- Dissen, G.A., Lara, H.E., Fahrenbach, W.H., Costa, M.E., Ojeda, S.R. (1994) Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology*, 134, 1146–1154.

Donald G. McKay, Arthur T. Hertig, Eleanor C. Adams And Sara Danziger (1953) Histochemical Observations On The Germ Cells Of Human Embryos

Donnez, J. et al. (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 364(9443): p. 1405-10.

Donnez, J., et al., (2013) Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril*, 99(6): p. 1503-13

Durlinger, A.L., J.A. Visser, and A.P. Themmen (2002) Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*, 124(5): p. 601-9.

Durlinger, A.L.L., Gruijters, M.J.G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Nachtigal, M.W., Uilenbroek, J.T.J., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P.N. (2002a) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143, 1076–1084.

Enes Taylan, Kutluk H Oktay (2017) Current state and controversies in fertility preservation in women with breast cancer *World J Clin Oncol* June 10; 8(3): 241-248

Seido Takae ve Nao Suzuki (2019) Current state and future possibilities of ovarian tissue transplantation. *Reprod Med Biol.*; 18:217–224.

G.A. Dissen, C. Garcia-Rudaz, S.R. Ojeda (2009) Role of neurotrophic factors in early ovarian development, *Semin. Reprod. Med.* Jan;27(1):24-31. doi: 10.1055/s-0028-1108007

Gardner D.K (2006) *In Vitro Fertilization: A Practical Approach* Colorado Center for Reproductive Medicine Englewood, Colorado, U.S.A.

George B. John, Teresa D. Gallardo, Lane J. Shirley, and Diego H. Castrillon (2008) Foxo3 is a PI3K-Dependent Molecular Switch Controlling the Initiation of Oocyte Dev Biol. Sep 1;321(1):197-204.

Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP. (2003) Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function *Mol Cell Endocrinol.* Dec 15;211(1-2):85-90.

Güneş H.V. (2010) *Moleküler Hücre Biyolojisi*. İstanbul Tıp Kitabevi.

Hakan Sağırkaya ve Haydar Bağış (2003) Memeli Embriyolarının Kriyoprezervasyonu *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 22, 1-2-3: 127-135

Halder, G. & Johnson, R.L. (2011) Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138, 9–22.

Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y. et al (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev*; 36:1–24.

J.M Shaw G.Jenkin J.M.Shaw S., L.Cox A.O.Trounson G.Jenkin (2000) Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications *Mol Cell Endocrinol.*

Jensen JR, Morbeck DE Coddington CC (2011). 3rd. Fertility preservation. *Mayo Clin Proc.* 86:45-49.

Junqueira LC, Carneiro J (2009) (ed. Aytekin Y., Solakoğlu) *Temel histoloji text and atlas*. Nobel tıp kitap evleri. S:449-469

Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. (2009) Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*;18:568

Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho C, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh AJ. (2013) Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *PNAS* 110(43). *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 22;110(43):17474-9

Kawashima I, Kawamura K. (2017) Disorganization of the germ cell pool leads to primary ovarian insufficiency. *Reproduction.* Jun;153(6):R205-R213

- Kerr J.F.R. Wyllie A.H. Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26: 239-257
- Kezele PR, Nilsson EE and Skinner MK (2002b) Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 192,37–43.
- Kierszenbaum AL (2006). (Çeviri editörü: Demir R.) *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Palme yayıncılık ISBN: 9944-341-02-9, Sayfa: 23-35.
- Kim SS, Soules MR, Battaglia DE (2002). Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fertil Steril*. 78:77-82.
- Kissel, H., Timokhina, I., Hardy, M.P., Rothschild, G., Tajima, Y., Soares, V., Angeles, M., Whitlow, S.R., Manova, K., Besmer, P. (2000) Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. (1999) Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 96: 5752- 5757
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73, 585–596
- La Marca, A. et al. (2009) Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod*, 24(9): p. 2264-75.
- Langman Medikal Embriyoloji (2005). 11. Baskı. Çevirmen: Başaklar A.C.
- Lapante M, Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* 122: 3589–3594. doi: 10.1242/jcs.051011 PMID: 19812304
- Leyre Herrero, Mo'nica Mart'nez and Juan A. Garcia-Velasco (2011) Current status of human oocyte and embryo cryopreservation *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 23:245–250
- Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hueh JW. (2010) Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *PNAS*, 107(22).
- Li YB, Zhou CQ, Yang GF, Wang Q, Dong Y. (2007) Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues. *Chin Med J*. ;120:110–4.
- Liu K, Rajareddy S, Liu L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G, Reddy P (2006) Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Dev Biol* 299:1–11.
- Liu-Chittenden Y, et al. (2012) Genetic and pharmacological disruption of the TEADYAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev* 26(12):1300–1305
- Manova, K., Huang, E.J., Angeles, M., De Leon, V., Sanchez, S., Pronovost, S.M., Besmer, P., Bachvarova, R.F. (1993). The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev. Biol.* 157, 85– 99.
- Margaret A. Lawlor and Dario R. Alessi (2001) PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?
- Marie-Madeleine Dolmans and Diego D. Manavella (2018) Recent advances in fertility preservation. *Japan Society of Obstetrics and Gynecology* doi:10.1111/jog.13818
- Massague J. (1990) The transforming growth factor- β s. *Annu Rev Cell Biol*.6:597– 641
- Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. (1972) A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*; 71:345–355
- McGee EA, Hsueh AJ (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21:200–214

- Meirow D, Roness H, Kristensen SG & Andersen CY. (2015) Optimizing outcomes from ovarian tissue cryopreservation and transplantation; activation versus preservation. *Human Reproduction* 628; 30:2453-2456.
- Michael K. Skinner (2005) Regulation of primordial follicle assembly and development *Human Reproduction Update*, Vol.11, No.5 pp. 461–471
- Nawroth, F. et al. (2005) Cryopreservation in assisted reproductive technology: new trends. *Semin Reprod Med*, 23(4): p. 325-35.
- Oktay K & Karlikaya G. (2000) Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med*; 342: 1919
- Oktay, K., et al. (1997) Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril*, 67(3): p. 481-6.
- Oktay, K. (2001) Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. *Hum Reprod Update*, 7(6): p. 526-34.
- Oktem, O. and Oktay K. (2008) The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci*, 1127: p. 1-9.
- Özkavukçu S. ve Erdemli E. (2002) Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects *Journal Of Ankara Medical School* Vol 24, No 4
- Pan D. (2007) Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev*; 21:886–897
- Philchenkov, A. (2004), Caspases: potential targets for regulating cell death, *J. Cell. Mol. Med.*, 8(4):432-444.
- Polge, C., A.U. Smith and A.S. Parkes (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172): p. 666.
- Rajkovic, A., et al. (2004) NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*, . 305(5687): p. 1157-9
- Rajpert-De Meyts, E., Jorgensen, N., Graem, N., Muller, J., Cate, R.L., Skakkebaek, N.E.(1999) Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:3836–3844.
- Rall WF, Fahy GM (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 313(6003): 573-5.
- Reddy, P., et al. (2008) Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 319(5863): p. 611-3.
- Ross MH (2011) *Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molacular Biology*. 6th edition ed. Vol. LWW: 6th edition.
- Salama M, Winkler K, Murach KF, Seeber B, Ziehr SC, Wildt L (2013). Female fertility loss and preservation: threats and opportunities. *Annals*
- Sanghoon Lee, Ki-Jin Ryu, Boram Kim, Dahyeon Kang, Yoon Young Kim and Tak Kim (2019) Comparison between Slow Freezing and Vitrification for Human Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3346; doi:10.3390/ijms20133346
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*. 53:59-72.
- Silber, S.J. (2012) Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Mol Hum Reprod*, 18(2): p. 59-67.
- Sonmezer, M. and Oktay K (2004) Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update*, . 10(3): p. 251-66

- Sönmezer M. and Ozkavukcu S. (2009) Fertility preservation in females with malignant disease-1: causes, clinical needs and indications. *Turkish Journal of Hematology*; p. 26.
- Spector MS, Destroyers S, Haepener DJ, Hengartner MO. (1997) Interaction between the C Elegans cell death regulators ced-9 and ced-4. *Nature*; 3;385(6617):653-6.
- Sprick, M.,R., Walczak, H. (2004) The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta* 1644:125-132.
- Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sigishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y & Kawamura K. (2015) Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Human Reproduction*; 30:608-615
- Tomatır, A.,G. (2003) Apoptoz: Programlı hücre ölümü, *T. Klin. Tıp Bilimleri* 23:499-508
- Tsujimoto Y. (1998) Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria? *Genes Cell*; 3: 697-707
- Ulukaya E. (2003) Apoptozis ders notları. Erişim: <http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisersnotu>
- V. Isachenko, E. Isachenko, G. Rahimi, A. Krivokharchenko, JL Alabart, and F. Nawrot (2002) Cryopreservation Of Human Ovarian Tissue By Direct Plunging Into Liquid Nitrogen: Negative Effect Of Disaccharides In Vitrification Solution *Cryo Letters*. Sep-Oct;23(5):333-44.
- Visser JA, Themmen AP. (2005) Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*; 234:81–86
- Visser, J.A., Themmen, A.P. (2014) Role of anti-Mullerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. *Mol. Cell Endocrinol.*382, 460-465.
- Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: the cells response to p53. *Nat Rev Cancer* 2:594-604
- Wada K, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H (2011) Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 138(18):3907–3914.
- Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. (2004) Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*; 10:77–83
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*; 124:471-484
- Yang HY, Cox SL, Jenkin G, Findlay J, Trounson A, Shaw J. (2006) Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. *Reproduction.*; 131:851-9.
- Yang, Q. and Guan, K.L. (2007) Expanding mTOR signaling. *Cell Res.*,17, 666–681
- Zelevnik AJ, Saxena D, Little-Ihrig L. (2003) Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 144:3985–3994.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
µm	: Mikrometre
AFP	: Antifriz Protein
AİF	: Apoptoz İçeren Faktör
AKT	: Protein Kinaz B
AmH	: Anti-Müllerian Hormon
ASRM	: American Society for Reproductive Medicine
BIRC	: Baculoviral Inhibitors of Apoptosis Repeat Containing
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
cm	: Santimetre
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DS	: Dilution solution
EB	: Equilibration Buffer
EG	: Etilen Glikol
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
F-aktin	: Fibröz Aktin
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
Foxo3	: Forkhead Box
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
G-aktin	: Glomerüler Aktin
H&E	: Hematoksilen ve Eozin
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-Piperazineetansulfonik Asit
HSA	: Human Serum Albumin
IGF1	: İnsuline-Benzer Büyüme Faktörü 1
IVA	: In Vito Aktivasyon
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü

KL	: Kit Ligand
LH	: Luteinizan Hormon
LIF	: Lökemi İnhibitör Faktör
MIS	: Mullerian-Inhibiting Substance
mm	: Milimetre
mRNA	: Mesajcı RNA
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	: Mammalian Target of Rapamycin Complex 1
mTORC2	: Mammalian Target of Rapamycin Complex 2
Nobox	: Newborn Ovary Homeobox-Encoding Gene
Nrf	: Nerve Growth Factor
°C	: Santigrad Derece
OMI	: Oosit Matürasyon İnhibitörü
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PDK	: Fosfoinositol Bağımlı Kinaz
PI3K	: Fosfotidil İnositol-3 Kinaz
PIP2	: Fosfotidilinositol-4,5-Bifosfat
PIP3	: Fosfotidilinositol-3,4,5-Trifosfat
POI	: Primer Over Yetmezlik
PTEN	: Phosphatase and Tensin Homolog
PVA	: Polivinil Alkol
PVP	: Polivinilprolidon
RTKs	: Reseptör Tirozin Kinaz
SF	: Serum Fizyolojik
Sohlh1	: Spermatogenesis and Oogenesis Spesifik Basic Helix-Loop-Helix 1
SSS	: Serum Supplement
TAZ	: Transcriptionalcoactivatorwith-PDZ Binding Motif
TEAD	: Transcriptional Enhanced Associate Domain
TNFR	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
TS	: Thawing Solution
TSC1	: Tuberoz Skleroz Kompleks 1
TSC2	: Tuberoz Skleroz Kompleks 2
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

WS : Warming Solution
YAP : Yes Associated Protein
ZP : Zona Pellusida



8. EKLER

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	<i>Siçan ovaryumunun vitrifikasyon sonrası fragmantasyonu ve matürasyon aktivatörleri içeren invitro kültürünün ootransplantasyon sonrası follikül korunmasına etkisi</i>
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Doç. Dr. Berrin AVCI UÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Merve EREMRE YANIK Uzm. Dr. Işıl KASAPOĞLU Prof. Dr. Gürkan UNCÜ
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Merve EREMRE YANIK'ın Yüksek Lisans Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.06.2016 – 01.06.2017
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	25 Adet Dişi Siçan
	DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	-

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	17.06.2016

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2016 - 09 / 02	Tarih : 28.06.2016
	<p>Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deneysel hayvanlar üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi. 	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK Başkan	Tıp- Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Levent BÜYÜKUYSAL Başkan Yardımcısı	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR Üye	Tıp - Anatomi	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN Üye	Vet- Patoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Ayşe TOPAL Üye	Vet- Cerrahi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Sibel TAŞ IŞIK Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Sema ÖZKAN Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Makine Mühendisi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Taner GÜLER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ziraat Yüksek Mühendisi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	UÜ-DEHYUAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			

* Araştırma ile ilişkisi

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile her daim yol gösteren, tez çalışmamın hazırlanması ve değerlendirmesinde büyük emeği olan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi danışmanım Sayın Doç. Dr. Berrin Avcı'ya teşekkür ederim.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 'nın kıymetli hocaları Sayın Prof. Dr. Semiha Ersoy'a, Prof. Dr. Şahin A. Sırmalı, Prof. Dr. İlkin Çavuşoğlu, Prof. Dr. Zeynep Kahveci, Prof. Dr. Zehra Minbay ve Prof. Dr. Özhan Eyigör'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkez Sorumlusu Prof. Dr. Gürkan Uncu ve tez çalışmam süresince cerrahi aşamalarda yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Işıl Kasapoğlu'na teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Uzm. Dr. N. Pınar Çimen'e, kıymetli çalışma arkadaşlarıma ve arkadaşım Aysun Önal'a, laboratuvar tekniklerindeki desteklerinden dolayı Biyo. Ayşe Akbaş'a, tezimin deney ve yazım aşamasında desteğini ve yardımlarını eksik etmeyen değerli arkadaşlarım Seda Sarıbal Saygı'ya, Gökay Pala'ya ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm asistan arkadaşlarıma ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak her zaman en büyük destekçim olan başta değerli eşim Ömer Yanık'a ve aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

22 Haziran 1988'de İstanbul'da doğdu. İlkokulu 60. Yıl Anadolu İlköğretim Okulu'nda, ortaokulu Mihriban Suat Bedük İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Lise eğitimini Fernerbahçe Lisesi'nde 2006 yılında tamamladı. 2006 - 2011 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimini tamamladı. 2012-2015 yılları arasında Kalamış Tüp Bebek Merkezi'nde çalıştı. 2015'te Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2018'den itibaren Bursa A.RT. Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nde çalışmaktadır.