



T.C

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEKRARLANAN KÖK HÜCRE UYGULAMASININ DENEYSEL
ASHERMAN MODELİ ÜZERİNE ETKİSİ İLE İMPLANTASYON VE
GEBELİKTE GÖRÜLEN SONUÇLARI**

HAZIRLAYAN: ŞAMİL ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ AD.

DANIŞMAN

PROF. DR. MEHMET İBRAHİM TUĞLU

MANİSA-2018



T.C

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEKRARLANAN KÖK HÜCRE UYGULAMASININ DENEYSEL
ASHERMAN MODELİ ÜZERİNE ETKİSİ İLE İMPLANTASYON VE
GEBELİKTE GÖRÜLEN SONUÇLARI**

HAZIRLAYAN: ŞAMİL ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ AD.

DANIŞMAN

PROF. DR. MEHMET İBRAHİM TUĞLU	(Danışman)
PROF. DR. SEVİNÇ İNAN	(Üye)
PROF. DR. HÜSEYİN AKTUĞ	(Üye)
PROF. DR. ALTUĞ YAVAŞOĞLU	(Üye)
PROF. DR. TUNCAY VAROL	(Üye)

MANİSA-2018

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Şamil ÖZTÜRK
İmza

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her zaman yol gsteren, gstermiŐ olduğu ozveri ve katkıların ötesinde, manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU' ya,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana bilgi ve deneyimlerini aktaran ve her konuda yardımcı olan hocalarım Prof. Dr. Seda VATANSEVER, Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Prof. Dr. Sevinç İNAN ve Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER'e ve asistan arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi desteği ile yıllardır yanımda yer alan dostum, abim İbrahim KALDIRIM'a,

YaŐamım boyunca maddi manevi her koŐulda beni destekleyen ve benimle birlikte lisanüstü eğitim yapan sevgili eŐime, anneme, babama, kardeŐime ve yengeme sabrı ve fedakârlıkları için müteŐekkirim.

KISALTMA VE SEMBOLLER

AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
Bax:	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2
BH4:	Tetrahidrobiopterin
BrdU:	Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine)
CAT:	Katalaz
CD:	Hücre farklanma kümeleri molekülü
cGMP:	Siklik guanozin monofosfat
CFU-F	Colony forming unit- fibroblast
c-kit:	Reseptör tirozin kinaz proteini
c-Myc:	Hücrel miyelositomatozis
cNOS:	Yapısal nitrik oksit sentaz
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DMSO:	Dimetilsülfoksit
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF :	Epidermal büyüme faktörü
E-kaderin:	Epitelyal kaderin
eNOS:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EpCAM:	Epitelyal hücre adezyon molekülü
EPF:	Erken gebelik faktörü
E-selektin:	Endotelyal selektin
FAD:	Flavin adenin dinükleotid
Fas:	İlk apoptozis sinyali
FMN:	Flavin mononükleotid
FSH:	Folikül uyarıcı hormon
GFP:	Yeşil floresan protein
GPx:	Glutasyon peroksidaz
GSH:	İndirgenmiş glutasyon
HCl:	Hidroklorik asit
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
hCG:	İnsan koryonik gonadotropin hormonu
HSPG	Heparan sülfat proteoglikan
H&E:	Hematoksilen ve eosin boyama
H-kaderin:	Kalp kası kaderini
ICAM:	Hücrelerarası adezyon molekülü
IGF-1:	İnsulin benzeri büyüme faktörü-1
iNOS:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İP:	İntraperitoneal
IL-11:	İnterlökin-11
IVF:	İn vitro fertilizasyon
KİMKH:	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre
Klf4:	Kruppel-like factor 4
LH:	Luteinleştirici hormon
LIF:	Lösemi inhibitör faktörü
L-selektin:	Lökosit selektin

MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MKH:	Mezenkimal kök hücre
MMP:	Matriks metalloproteinazlar
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit
MCBÜ-DEHAM:	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MUC-1:	Musin-1 molekülü
NADP:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH:	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
N-kaderin:	Nöronal kaderin
nNOS:	Nöronal nitrik oksit sentaz
NOS:	Nitrik oksit sentaz
Oct3/4:	Octamer-binding transcription factor 3/4
OMI:	Oosit maturasyon inhibitörü
p53:	Protein 53
PAF:	Platelet aktive edici faktör
PCNA:	Proliferating cell nuclear antigen
PBS:	Fosfat tamponu
PGE2:	Prostaglandin E2
P-kaderin:	Plasental kaderin
qRT-PCR:	Sekans eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyon analizi
P-selektin:	Platelet selektin
RNA:	Ribonükleik asit
sLe:	Sialil lewis
SOD:	Süperoksit dismutaz
SOX2:	SRY (sex determining region Y)-box 2
Stro-1:	Stroma-1
TGF-α:	Dönüştürücü büyüme faktörü alfa
TIMP:	Doku Matriks metalloproteinaz inhibitörleri
TNF-α:	Tümör nekrozis faktör alfa
VCAM:	Vasküler hücre adezyon molekülü
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
V-kaderin:	Vasküler endotelyal kaderin
ZP:	Zona pellusida

TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 5.5.1	Grupların oluşumu ve denek sayılarının dağılımı.	70
Tablo 5.7.1	Parafin takip protokolü.	75
Tablo 5.8.1	Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.	76
Tablo 5.8.2	Masson- Trikrom boyama protokolü.	77
Tablo 5.9.1	İndirekt İmmunohistokimya Boyama Protokolü.	79
Tablo 5.10.1	TUNEL Boyama Protokolü.	80
Tablo 6.1.1	KİMKH'lerin c-kit ve Stro-1 ile boyanma sonucunda H-skorlama ile analizinde tanımlamaları.	83
Tablo 6.3.1	Alt birinci grupların inflamasyon oranı.	92
Tablo 6.3.2	Alt birinci grupların fibrozis oranları.	94
Tablo 6.3.3	Alt birinci grupların fibrozis, inflamasyon, endometriyal kalınlık ve bez sayıları.	95
Tablo 6.4.1	Alt ikinci grupların sağ ve sol hornlarına implante olan embriyo sayıları.	97
Tablo 6.4.2	Alt ikinci grupların sol horndaki implantasyon sayıları.	98
Tablo 6.4.3	Alt ikinci grupların sol horndaki implantasyon sayıları ve alt üçüncü grupların yeni doğan sayıları.	98
Tablo 6.5.1.1	Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki c-Kit dağılımına etkisi.	103
Tablo 6.5.2.1	Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki PCNA dağılımına etkisi.	105
Tablo 6.5.3.1	Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki TGF-β1 dağılımına etkisi.	109
Tablo 6.5.4.1	Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki eNOS dağılımına etkisi.	113
Tablo 6.5.5.1	Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki VEGF dağılımına etkisi.	117
Tablo 6.5.6.1	Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki TUNEL dağılımına etkisi.	121
Tablo 6.6.1.1.	Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki Laminin dağılımına etkisi.	125
Tablo 6.6.2.1.	Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki L-Selektin dağılımına etkisi.	129
Tablo 6.6.3.1.	Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki Fibronektin dağılımına etkisi.	133

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 4.1.1.1	Asherman Sendromu (İntrauterin adezyon) şematik görünüm.	7
Şekil 4.2.1	Dişi iç genital organlar.	11
Şekil 4.2.2	Dişi dış genital organlar.	12
Şekil 4.2.3.1	Uterin siklus evreleri.	19
Şekil 4.2.5.1	Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara göçü.	22
Şekil 4.2.5.2	Embriyonik gelişim 3. haftasında primordiyal germ hücrelerinin vitellus kesesindeki konumu.	23
Şekil 4.2.6.1	Ovaryumların lig. latum uteri içerisinde yerleşimleri.	25
Şekil 4.2.7.1	Ovaryumun anatomik bağlantıları.	27
Şekil 4.3.1	İmplantasyon aşamaları.	35
Şekil 4.3.1.1	İmplantasyonun moleküler düzenlenmesi.	36
Şekil 4.6.1	Oksidatif denge	56
Şekil 4.7.2.1	Apoptozisin regülasyonu	63

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>		<u>Sayfa</u>
Resim 4.2.2.1	Uterusun histolojik tabakaları, H&E	17
Resim 4.2.7.1	Ovaryum histolojisi, sıçan ovaryumu, H&E	28
Resim 5.5.1	DeneySEL Asherman modeli.	71
Resim 6.1.1	KİMKH'lerin kültür ortamında çoğalmış 4. pasajdaki inverted mikroskop görüntüleri.	82
Resim 6.1.2	KİMKH'lerin Stro-1 ile boyanmış pozitif immunohistokimya görüntüleri.	82
Resim 6.1.3	KİMKH'ler, c-kit ile boyanmış pozitif immunohistokimya görüntüleri.	83
Resim 6.2.1	Asherman sendromu modeli oluşturulan grupların vajinal yayma preparatlarının ışık mikroskop ile değerlendirilme sonuçları, H&E.	85
Resim 6.3.1	Alt birinci grupların tedavi uygulaması sonrası endometriyum görüntüleri, H&E	87
Resim 6.3.2	Alt birinci grupların tedavi uygulaması sonrası endometriyum görüntüleri, H&E.	88
Resim 6.3.3	Alt birinci grupların tedavi uygulaması sonrası endometriyum görüntüleri, H&E.	89
Resim 6.3.4	Sağ birinci alt grubun İmagJ programı ile yapılmış endometriyum kalınlığı ölçümü.	90
Resim 6.3.5	Sol birinci alt grupların İmagJ programı ile yapılmış endometriyum kalınlığı ölçümleri.	91
Resim 6.3.6	Sol birinci alt grupların histokimyasal boyamayla fibröz alanların gösterildiği görüntüler, Masson-Trikrom.	93
Resim 6.4.1	Asherman sonrası tedavi edilen gruplarındaki sağ ve sol uterin hornlara implante olmuş embriyolar, H&E.	97
Resim 6.4.2	Asherman sonrası tedavi edilen gruplardaki sağ ve sol uterin hornlara implante olmuş embriyolar.	99
Resim 6.5.1.1	Alt birinci grupların endometriyumda c-kit boyanma görüntüleri.	100
Resim 6.5.1.2	Alt birinci grupların endometriyumda c-kit boyanma görüntüleri.	101
Resim 6.5.1.3	Alt birinci grupların endometriyumda c-kit boyanma görüntüleri.	102
Resim 6.5.2.1	Alt birinci grupların endometriyumda PCNA boyanma görüntüleri.	106
Resim 6.5.2.2	Alt birinci grupların endometriyumda PCNA boyanma görüntüleri.	107
Resim 6.5.3.1	Alt birinci grupların endometriyumda TGF-β1 boyanma görüntüleri.	110

Resim 6.5.3.2	Alt birinci grupların endometriyumda TGF-β1 boyanma görüntüleri.	111
Resim 6.5.4.1	Alt birinci grupların endometriyumda eNOS boyanma görüntüleri.	114
Resim 6.5.4.2	Alt birinci grupların endometriyumda eNOS boyanma görüntüleri.	115
Resim 6.5.5.1	Alt birinci grupların endometriyumda VEGF boyanma görüntüleri.	118
Resim 6.5.5.2	Alt birinci grupların endometriyumda VEGF boyanma görüntüleri.	119
Resim 6.5.6.1	Alt birinci grupların endometriyumda TUNEL boyanma görüntüleri.	122
Resim 6.5.6.2	Alt birinci grupların endometriyumda TUNEL boyanma görüntüleri.	123
Resim 6.6.1.1	Alt ikinci grupların endometriyumda Laminin boyanma görüntüleri.	126
Resim 6.6.1.2	Alt ikinci grupların endometriyumda Laminin boyanma görüntüleri.	127
Resim 6.6.2.1	Alt ikinci grupların endometriyumda L-Selektin boyanma görüntüleri.	130
Resim 6.6.2.2	Alt ikinci grupların endometriyumda L-Selektin boyanma görüntüleri.	131
Resim 6.6.3.1	Alt ikinci grupların endometriyumda Fibronektin boyanma görüntüleri.	134

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. ASHERMAN SENDROMU (İNTRAUTERİN ADEZYON)	6
4.1.1 Tanım ve insidans	6
4.1.2. Tanı	7
4.1.3. Etiyolojik faktörler	8
4.1.4. Patolojik bulgular	8
4.1.5. Tedavi	9
4.1.6. Yardımcı Yöntemler	9
4.2. DIŞI GENİTAL SİSTEM	11
4.2.1. Uterus Anatomisi	12
4.2.2. Uterus Histolojisi	14
4.2.3. Menstrüel Siklus	18
4.2.4. Uterus Embriyolojisi	21
4.2.5. Ovaryum Embriyolojisi	21
4.2.6. Ovaryum Anatomisi	24
4.2.7. Ovaryum Histolojisi	26
4.3. İMPLANTASYON	33
4.3.1. İmplantasyonun Sinyalleşme Olayları	35
4.3.1.1. İntegrinler	37
4.3.1.3. Trofinin-Tastin-Bystin Kompleksi	39
4.3.1.4. Heparan sülfat proteoglikan (HSPG)	40
4.3.1.5 Musin-1 ve Musin-4 (MUC-1, MUC-4)	40
4.3.1.6. Selektinler	40
4.3.1.7. Sitokinler	41
4.3.1.8. Büyüme Faktörler	42
4.3.1.9. Embriyodan Salınan Sinyaller	42
4.4. RATLARDA DIŞI ÜREME SİSTEMİ	43
4.4.1. Ratlarda Uterus Yapısı	43

4.4.2. Ratlarda Hormonal Düzenleme ve Siklus Tayini	44
4.4.3. Vajinal Sitoloji	45
4.4.4. Ratlarda İmplantasyon	46
4.5. KÖK HÜCRE	47
4.5.1. Farklılaşma ve Plastisite Kapasitesi	47
4.5.2. Mikroçevre (Niş)	50
4.5.3. Kök Hücre �eitleri	51
4.5.3.1. Embryonik Kök Hücreler (EKH)	51
4.5.3.2. Mezenkimal Stromal (Mezenkimal Kök) Hücreler (MKH)	52
4.5.3.3. Mezenkimal Stromal Hücre Kaynakları	54
4.5.3.4. Mezenkimal Stromal Hücrelerin In Vitro �oğaltılması	55
4.6. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES	55
4.6.1. Serbest Radikal	57
4.6.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	57
4.6.1.2. Süperoksit radikalleri (O ₂)	57
4.6.1.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	57
4.6.1.4. Hidroksil radikalleri (OH)	58
4.6.2. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz	58
4.6.3. Oksidatif Stresin Etkileri	60
4.7. APOPTOZİS	61
4.7.1. Apoptozis Morfolojisi	61
4.7.2. Apoptozis Mekanizmaları	62
4.7.3. Apoptozisin Regülasyonu	64
5. GEREÇ VE YÖNTEM	65
5.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı	65
5.2. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eldesi	66
5.3. Kök Hücre Sayımı	67
5.4. Kök Hücre Karakterizasyonu	67
5.5. Deneysel Asherman Modeli ve Kök Hücre Uygulamaları	68
5.6. Vajinal Yayma İşlemi	74
5.7. Doku �rneklerinin Alınması ve Takibi	74
5.8. Histokimyasal Boyama	75
5.9. İndirekt İmmunohistokimyasal Boyama	77
5.10. TUNEL Boyaması	79
5.11. İstatistik	81

5.12. Histolojik İnceleme -----	81
6. BULGULAR -----	82
6.1. KİMKH Tanımlanması-----	82
6.2. Vajinal Yayma Bulguları -----	84
6.3. Gebelik Oluşturulmayan Grupların Histokimyasal Bulguları-----	86
6.4. Gebelik Oluşturulan Grupların Histokimyasal Bulguları -----	95
6.5. Gebelik Oluşturulmayan Grupların İmmünohistokimyasal Bulguları -----	99
6.5.1. c-Kit -----	99
6.5.2. PCNA-----	104
6.5.3. TGF- β 1-----	108
6.5.4. eNOS-----	112
6.5.5. VEGF -----	116
6.5.6. TUNEL -----	120
6.6. Gebelik Oluşturulan Grupların İmmünohistokimyasal Bulguları -----	124
6.6.1. Laminin-----	124
6.6.2. L-Selektin -----	128
6.6.3. Fibronektin-----	132
7. TARTIŞMA -----	135
8. SONUÇLAR -----	159
9. KAYNAKLAR-----	160
10. EKLER -----	188
11. ÖZGEÇMİŞ -----	191

Tekrarlanan Kök Hücre Uygulamasının Deneysel Asherman Modeli Üzerine Etkisi İle İmplantasyon ve Gebelikte Görülen Sonuçları

Öğrencinin Adı: Şamil ÖZTÜRK

Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

Anabilim Dalı: Histoloji-Embriyoloji

1. ÖZET

Amaç: Çalışmamızda kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin (KİMKH), sıçanlarda meydana getirilen Asherman sendromu modellenmesinde oluşan adezyonun ortadan kaldırılması ve blastokistin endometriyuma implantasyonunda ki rolü ile bu süreçte yer alan moleküller üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Asherman modeli kimyasal olarak oluşturularak tedavisi; besiyeri (BY), kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (KİMKH) ve 48 saatlik besiyeri (Niş) ile sağlanmaya çalışılan dört farklı grup oluşturuldu. Birinci grup (G1); Asherman+ BY, ikinci grup (G2); Asherman + Niş, üçüncü grup (G3); Asherman + KİMKH ve dördüncü grup (G4); Asherman + KİMKH + Niş olarak ayrıldı. Her bir grup kendi içerisinde üç alt gruba ayrılarak, histokimyasal olarak hematoksilin-eozin ve masson trikrom boyamaları ile immunohistokimyasal olarak ise TGF- β 1, PCNA, eNOS, VEGF, Stro-1, c-Kit, Laminin, Fibronektin, L- Selektin boyamaları yapıldı. Apoptozis için ise TUNEL boyaması yapıldı.

Bulgular: Grupların hem histolojik hemde yeni doğan sayısına göre morfolojik değerlendirmelerinde KİMKH ve KİMKH + Niş verilen gruplarda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$) saptanmıştır. KİMKH ile Nişinin uterin adezyonlarda yapışıklıkları ortadan kaldırdığı, endometriyumu implantasyon için daha uygun hale getirdiği saptandı.

Sonuçlar: Tedavi gruplarında endometriyal kalınlığın, bez sayısının ve vaskülarizasyonun artması, fibröz alanların azalması, adeziv alanlarda da embriyoların implante olması ve yeni doğan sayısının artmış olması deneysel Asherman çalışmalarının kliniğe taşınabilmesi açısından ümit vericidir. KİMKH ve Niş uygulamalarının, infertiliteye neden olan mekanizmaların içerisinde yer alan adezyon molekülleri üzerinden tedavi ile kliniğe katkı sağlayabileceği gösterildi.

Anahtar Sözcükler: Asherman, İmplantasyon, Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, Histoloji.

Title: Effects of Repeated Stem Cell Application on Experimental Asherman Model and Results in Implantation and Pregnancy

Student Name: Şamil ÖZTÜRK

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

Department: Histology-Embryology

2. ABSTRACT

Aim: In our study, it was aimed to investigate the role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMDSC) in the model of Asherman's syndrome brought to the rats, removal of adhesion from the center and the role of blastocyst in endometrium implantation and effects on the molecules involved in this process.

Materials and Method: The Asherman model is chemically formed. Therapy; four different groups were set up to be provided nutrient (BY), bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMDSC), and 48-hour nutrient (Nish). First group (G1); Asherman + BY, second group (G2); Asherman + Niche, third group (G3); Asherman + BMDSC and fourth group (G4); Asherman + BMDSC + Niche. Each group was divided into three subgroups and histochemically staining were performed hematoxylin-eosin and masson trichrome and immunohistochemical staining such as TGF- β 1, PCNA, eNOS, VEGF, Stro-1, c-Kit, Laminin, Fibronectin and L-Selectin. Also TUNEL staining was performed for apoptosis.

Results: Statistically significant difference ($p < 0,05$) was found between the groups in terms of both histologic and neonatal morphologic evaluations in BMDSC and BMDSC + Niche groups compared to the other groups. It was found that BMDSC and Niche of could remove the adhesions in uterine adhesions, making the endometrium more efficient for implantation.

Conclusion: The therapeutic properties of BMDSC's in endometrial injuries, increased thickness of the endometrium, number of glands and vascularization, reduction of fibrous areas, implantation of embryos in the adhesive areas, and increased number of newborns are promising for the transfer of experimental Asherman studies to the clinic. It has been shown that BMDSC and Niche applications may contribute to clinic through treatment of adhesion molecules in the mechanisms causing infertility.

Key Words: Asherman, Implantation, Bone marrow-derived stem cell, Histology

3. GİRİŞ

Asherman sendromu (AS), hem gebelik komplikasyonları hemde fazlaca jinekolojik operasyonlardan sonra meydana gelebilen intrauterin adezyon (İUA) durumudur. Son yıllarda artan prevalansı sebebiyle alternatif tedavi arayışları sürmektedir (Yuksel ve ark. 2014). İntrauterin adezyonlar veya AS, teşhis edilen vaka sayısının her geçen gün artması ile birlikte çok yönlü eksikliklerin ortaya çıkmasına sebep olan bir durumdur. Sıklıkla rahim kürtajından sonra ortaya çıksa da, herhangi bir rahim ameliyatı AS'a sebep olabilir. AS'lu birçok kadının amenore ya da hipomenoreası var, fakat bazılarının menstrüel düzeyi normal seyrebilmektedir. Menstrüasyon göremeyen kadınlarda endometriyumda sıkışıp kalan kan dönemine bağlı adet ağrılarına ve eşlik eden retrograd menstrüasyon, endometrioze sebep olabilir. AS'lu kadınların çoğu menstrüel bozuklukların yanında infertilite veya tekrarlayan spontan düşük ile başvururlar. Son yarım yüzyılda histeroskopi bu durumu teşhis ve tedavi etmek için standart bir tedavi yöntemi haline gelmiştir. Yapışkanlık ve skar oluşumun önlenmesi için çeşitli teknikler ileri sürülmüştür. Şunu söylemek gerekir ki mevcut şartlarda en etkili olanı, minyatür makasın adezyoliz için kullanılması ve operasyondan hemen sonra endometriyum içinde bir balon stentinin yerleştirilmesi gibi görünüyor (March 2010).

Son yıllarda ki klinik uygulamalarda AS ve İUA'lar eşanlı olarak kullanılırlar. Fakat buna rağmen AS'u için menstrüel düzensizlik, normal olmayan plasantasyon ve pelvik ağrı şikâyetlerin olmasında gerekir. AS'nun insidansı çok geniş bir asemptomatik hasta grubundan dolayı bilinmemektedir. Tesadüfen tespiti yapılan vakalardan, doğum sonrası kürtaj yapılan vakalara kadar geniş bir yelpaze düşünüldüğünde %0.3 ile %21.5 arası insidans bildirilmiştir (Deans ve Abbott 2010).

İmplantasyon, blastokist aşamasındaki zigotun annenin endometriyumuna girerek gebeliğin başlamasını sağlayan bir olaylar bütünüdür. Bu karmaşık süreçte, hem endometriyumdan hem de blastokisten kaynaklanan birçok moleküler ve hücrel mekanizmanın aktif rol oynadığı bildirilmektedir (Guzeloglu-Kayisli ve ark. 2007). Hem normal gebelik hemde in vitro fertilizasyon (İVF) ile elde edilmeye çalışılan gebelikler sırasında implantasyonun gerçekleşmemesi önemli bir sorunu beraberinde getirmektedir. Bu nedenle implantasyondaki başarısızlıklar önemli infertilite sorunlarından biridir ve başarısızlıklar bu sorunların hemen hemen %

50'sinde rol almaktadır. İmplantasyon aşamalarında hem endometriyum hem de embriyoda meydana gelen herhangi bir hasar veya moleküler düzeydeki eksiklikler, implantasyon başarısızlığına ve dolayısıyla düşüklere neden olduğu bilinmekle beraber bunun tedavisine yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir (Guzeloglu-Kayisli ve ark. 2007).

Kök hücrelerin kendi kendini yenileyebilme, farklılaşabilme, çoğalabilme, doku ve organları oluşturabilme yeteneklerinden dolayı organ nakillerinde, birçok hastalığın tedavisinde veya olumsuz yan etkileri bilinen ilaçlara alternatif olarak kullanılma olanağı bulunmaktadır. Şimdilerde tedavi amaçlı kullanılmak üzere, birçok kaynaktan kök hücre elde edilebilmektedir. Üzerinde de en fazla çalışma yapılan kaynaklar hematopoietik, embriyonik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreleri içeren kemik iliği kaynaklı kök hücrelerdir. İnsan embriyonik kök hücrelerinin, diyabet, Parkinson, kalp yetmezliği, nörodejenratif yaralanmalar, osteogenezis imperfekta gibi birçok hastalığın tedavisi amacıyla kullanıldığı çalışmalar henüz deneysel aşamdadır; çünkü embriyonik kök hücrelerin transplantasyondan önce hedef doku hücrelerine farklılaşmış olması gerekmektedir (Jiang ve ark. 2006; Kollar ve ark. 2009; Hu ve ark. 2010). Çalışmamızda, bu bilgilerin ışığı altında, farklılaşmamış kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin intraperitoneal olarak uygulanmasından sonra endometriyum reseptivitesine ve blastokistin implantasyonuna etkileri araştırılmıştır.

Kök hücreler organizmanın kendi bünyesinde bulundurduğu kolayca elde edilen ve çeşitli faktörler aracılığı ile farklılaştırılabilen progenitör hücrelerdir. İntrauterin adeyzon ya da AS teşhisi konulmuş hastalarda cerrahi ve hormonal tedaviye alternatif ve daha fazla etkili olacak yeni tedavi şekillerinin geliştirilmesi gelecek için vazgeçilmez görünmektedir. Çünkü her geçen gün kürtaj sayısı, gerek ülkemizde gerekse dünyada çok fazla artış göstermiştir. Aynı zamanda rutin jinekolojik muayeneler sırasında da uterin dokunun hasar görmesi kaçınılmaz olabilmektedir. Son on yıldaki kök hücre çalışmaları o kadar hızlı gelişme göstermiştir ki, tedavisi imkansız gibi görünen kanserden metabolik hastalıklara hatta romatizmal ve nörodejenratif hastalıklara kadar çare arayanların umutlarını artırmıştır. Çünkü bu hücreler kendilerinin dışında salgıladığı faktörler ile niş denilen bir mikro çevre oluşturarak özellikle başta kanser hücrelerinde olmak üzere diğer hücreleri olumlu

yönde etkiledikleri bilinmektedir (Oikawa 2016). Bu noktada araştırmasını yaptığımız konu üzerinden endometriyal hasarlarda cerrahi yöntemlere ve medikal tedavilere alternatif olarak kök hücre tedavisinin etkileri üzerinde duruldu. AS'da adezyonların ayrılmasında ideal bir teknik yok. Fakat amaç tamamen uterin kavitenin normalleşmesidir. Ayrıca eşlik eden semptomların düzeltilmesi ve tekrar adezyon oluşumunun önlenmesine yönelikte tedavi denenir. Çalışmada kök hücreleri kullanarak AS'nun neden olduğu epitel yapışıklığı ortadan kaldırarak doku hasarının rejenerasyonu ve infertilite engelini aşılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada sıçanlarda intrauterin adezyon oluşumunu tanımlayan AS modeli kimyasal olarak oluşturularak, aynı türün erkek sıçanların tibia ve femur kemiğinden izole edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle tedavi süreci takip edilmiş ve implantasyon ve gebelikte meydana gelen değişiklikler histopatolojik parametrelerle değerlendirilmiştir. Tedavi edici etkisi birçok çalışmada ortaya konulan kök hücrelerin Asherman üzerinde tedavi edici özelliklerinin olup olmadığı ortaya konulmuştur. Asherman sonrası endometriyum histolojisi rutin ve histokimyasal boyamalarla ve immünohistokimyasal olarak kök hücre; Stro-1 ve c-kit ile, matriks değişiklikleri; laminin ve fibronektin ile, embriyo etkisi; L-selektin ile, damarlanma; VEGF ile, hücre çoğalması; PCNA ile, rejenerasyon; TGF β -1 ile, oksidatif stres; NOS'la ve apoptoz; TUNEL ile H-score üzerinden araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

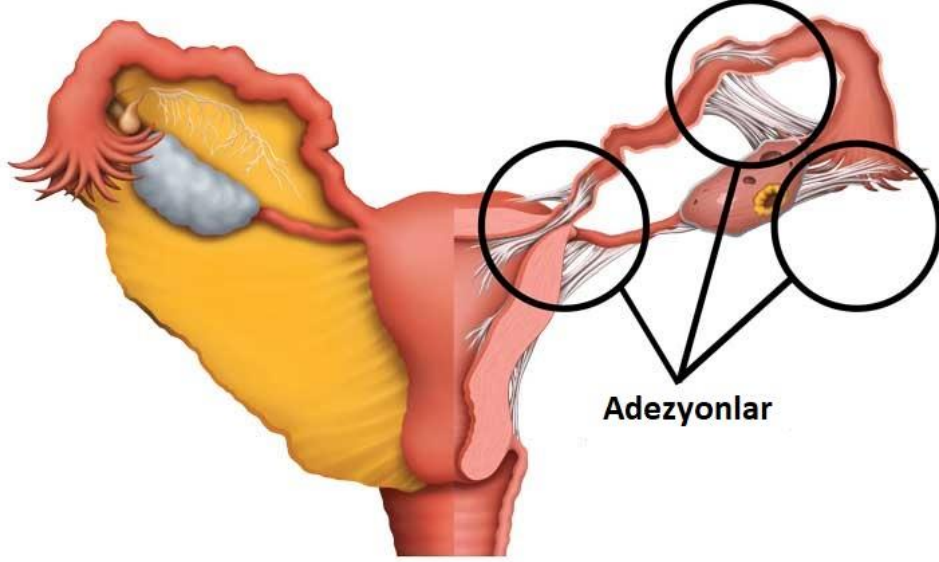
4.1. ASHERMAN SENDROMU (İNTRAUTERİN ADEZYON)

4.1.1 Tanım ve İnsidans

İntrauterin adezyon (IUA veya Asherman Sendromu) 1894 yılında Fritsch tarafından tanımlanmıştır (March 1995). Hastalık tablosunu ilk kez “travmatik amenore” olarak tanımlayan Dr. Joseph G. Asherman’ın olduğu için Asherman Sendromu (AS) olarak ifade edilmektedir (Asherman 1948). Bazı yazarlar, 'Asherman sendromu' terimini, amenore hastaları, uterusları tamamen tıkanmış olanlar veya yakın zamanda sezeryanla (cerrahi operasyonla) doğum yapan hastalar için tanımlamayı öngörmüşlerdir. Bazıları ise 'intrauterin adezyon (IUA)' terimini kullanır; bu terim daha açık ve daha açıklayıcıdır, ancak uterus duvarları arasında lifli köprüler olmaksızın endometriyumun yüzey eksikliğine sahip olan hastalar istisnai durumdur. Böyle durumu olan kadınlar benzer şekilde adet kanamaları, infertilite, tekrarlayan gebelik kaybı, rahimde büyüme kısıtlaması, implantasyonda sorunlar ve yapışıklıkları olan diğer gebelik komplikasyonlarını geçirmektedirler (March 2010). AS, gebelik komplikasyonlarına veya pek çok jinekolojik ameliyatlardan sonra da meydana gelebilen uterin yapışıklık soru olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsidansındaki artış nedeniyle alternatif tedavi arayışları sürmektedir (Yuksel ve ark 2014). İUA veya AS, teşhis edilen sayının her geçen gün artması ile beraber çok yönlü eksikliklerin ortaya çıkmasına sebep olan bir tabloyu ortaya çıkarmaktadır. Genellikle rahim kürtajından sonra ortaya çıksa da, herhangi bir jinekolojik ameliyat AS'a neden olabilir. AS'lu pek çok kadının amenore ya da hipomenoreası olmakta, ancak bazılarının adet seyirleri normal olabilmektedir. Adet göremeyen kadınlarda sıkışıp kalan kan dönemine bağlı adetsel pelvik ağrılara ve eşlik eden retrograd menstrüasyon endometriozise neden olabilir. Menstrüel bozukluklara ek olarak, AS'lu kadınların çoğu infertilite veya tekrarlayan spontan düşük ile başvururlar.

İUA'ların gerçek insidansı geniş bir hasta grubunun olmasından dolayı bilinmemektedir. Tesadüfen tespit edilen vakalardan, doğum sonrası kürtaj yapılan vakalar ve diğer çok geniş bir spektrumlar değerlendirildiğinde, %0,3-21,5 arası insidans bildirilmiştir (Yu ve ark. 2008). İUA'ların obstetrik tipi olmayan sebepleri içerisinde, küretaj (%1,6), uterin septum rezeksiyonu (%6,7), histeroskopik

myomektomi (%31-45), abdominal myomektomi (%1,3) bulunmaktadır. Bunların dışında çok az sebepler; pelvik radyoterapi, uterin arter embolizasyonu ve pelvik tüberkülozdur (Deans ve Abbott 2010; Roman ve ark. 2005).



Şekil 4.1.1.1 Asherman Sendromu (İntrauterin adezyon) şematik görünüm. (<http://planbwellness.com/adhesion>. Erişim; 04.11.2018)

4.1.2. Tanı

Küretaj işleminden sonra daha önceden herhangi bir yakınması olmayan bir kadında aşağıdaki bulguların ortaya çıkması durumunda AS'ü ilk olarak düşünülmelidir.

- Adetsizlik (amenore %42)
- Menstüel kanama miktarının azalması
- İnfertilite (%63)
- Tekrarlayan abortus

Yukarıdaki durumların varlığında ve daha önce küretajın öyküde saptanması durumunda AS'ü akla gelmelidir. Bazen jinekolojik muayenede hiçbir bulguya rastlanmayabilir. Klasik ultrasonografide endometriyum normale yakın izlenebilir. Ancak uterus içine sıvı verilerek incelenen ultrasonografide uterus boşluğunda yapışıklıklar izlenebilir. Teşhis konulurken sonohisterografi, ultrasonografi, histerosalpingografi (HSG) ve histeroskopi kullanılmaktadır. Kesin tanısı rahim filmi HSG ile rahatlıkla konulabilir (Magos 2002).

4.1.3. Etiyolojik faktörler

İUA sebebi, endometriyuma hasar verecek her olay olabilir. 1856' da İUA olgusunu içeren araştırmalarındaki vakaların %67'sinin düşük veya erken gebelik kaybıyla ilişkili küretaj sonrası geliştiği belirlenmiştir (Schenker ve Margalioth 1982). Bu çalışmaya göre missed abortus vakaları %31 inkomplet abortus vakaları % 6,4 oranında İUA'ların nedenleridir. İnkomples abortus olgusunda tıbbi ve cerrahi tedaviler olacak şekilde rastgele bölerek tedavi ettikleri çalışmada ise medikal tedavi olgularının 6. Ayın sonunda histeroskopik izlenimlerinde yapışıklık saptanmamışken, cerrahi tedavi uygulanan olguların (%7,7) adeziv yapıyla karşılaşmıştır (Tam ve ark. 2002). Tekrarlayan düşüklerde de %39' lara varan oranda İUA tespit edilmiştir (Ventolini ve ark. 2004). Friedler ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, küretaj sayısındaki artışın adezyon sıklığının ve adezyonların ciddiyetinin artırdığını rapor etmişlerdir (Friedler ve ark. 1993). Enfeksiyonların oluşturduğu ortamın adezyon oluşumuna etkisi tartışmalı olsada, adezyon oluşum sürecini arttırabileceği konusundaki görüşü daha baskındır (Kodaman ve Arıcı 2007).

Sezeryanlarında %2 oranında İUA'lara sebep olduğu tespit edilmiştir. Postpartum kanamalar %9 civarında İUA'lara neden olabilmektedir. Doğumdan sonraki küretaj uygulanan vakalarda ise bu oran %40'lara kadar yükselmektedir. Özellikle doğumdan sonra ilk dört hafta çok önemlidir. Bu haftalar arasında uygulanan küretajlar daha ciddi ve daha çok sıklıkla İUA'a yol açarken, doğumdan sonraki ilk 48 saat içerisindeki küretaj olgusunda, bu dönemdeki yüksek östrojen seviyesi nebebiyle daha az yapışıklık meydana gelmesine neden olmaktadır (Schenker ve Margalioth 1982).

4.1.4. Patolojik bulgular

AS patolojisinde endometriumda fibrozis hakimiyeti çok fazladır. Bezlerde tipik olarak inaktif kübokolumnar epitel izlenir. Stratum fonksiyonalis ve bazalis tabakası birbirini içerisine geçmiştir. Fonksiyonel tabaka; hormonal uyarıya cevapsız kalan bir katmanlı bir yapıya bürünür. Avaskülarizasyon artar ve fibrozis nedeniyle miyometriyum kontraktilitesinde azalma ve damarlanmada azalma görülür. Bundan dolayı cinsiyet steroidleri endometriyum dokusuna etkisini gösterememektedir.

4.1.5. Tedavi

Son 40 yıldır histeroskopi bu durumu teşhis ve tedavi etmek için standart bir yöntem haline gelmiştir. Yapışkanlaştırma ve skar oluşumun önlenmesi için çeşitli teknikler öne sürülmüştür. Mevcut şartlarda en etkili olanı, minyatür makasın adezyoliz için kullanılması ve ameliyattan hemen sonra rahim içinde bir balon stentinin yerleştirilmesi gibi görünüyor. Ayrıca postometrik östrojen tedavisi, endometriyum yeniden büyümesini teşvik etmek için verilir. Hastaların hamile kalmaya çalışmadan önce servikal yetersizlik, plasenta akretası ve intrauterin büyüme kısıtlamasını dikkatle izlenmesi ve takip çalışmaları zorunludur (March 2010).

İUA'ların tedavisinde histeroskopi en önemli tedavi yöntemini oluşturur. Operatif histeroskop yardımıyla mikro makasların kullanımı endometriyumdaki hasarı azaltır. Ayrıca endometriyal harabiyet durumunda yüzeysel yaralanma riski, diğer adezyolizis yöntemlerine kıyasla daha az olması sebebiyle öncelik verilir. Adezyon açma işlemi merkezden ve aşağıdan başlanır ve ince yapışıklıklar her zaman öncelik sahibidir. Daha derinlerde ueterin kavitenin iyice açılması sağlanır ve son olarak perforasyon görülme oranı oldukça yüksek olan lateral adezyonlar açılır. Böylece uterus kavitesi normalleştirilir (Thomson ve ark. 2007). Histeroskopik adezyon açılması esnasında %2-5 oranında perforasyon, hemoraji %6-27 görülürken, operasyondan sonra sıvı-elektrolit dengesindeki bozukluk nedeniyle servikal yetmezlik benzeri klinik tablolarda bildirilmiştir (Friedler ve ark. 1993). Adezyolizis işleminden sonra erken gebelik kayıpları %20 olup normale yakın oranda bulunmuştur. Süresi uzayan durumlarda da intrauterin gelişme geriliği, plasentasyon anomalileri, erken doğum (%40-50) ve uterin rüptür komplikasyonları görülebilmektedir. Rüptürler işlem esnasında perforasyonlu vakalarda daha sık görülmektedir (Yasmin ve Adeghe 2004; Shiau ve ark. 2005). Öyküsünde AS'undan dolayı histeroskopik cerrahi operasyon geçirmiş hamilelikler yüksek riskli kabul edilmeli, üçüncü trimester özellikle yakından takip edilmelidir.

4.1.6. Yardımcı Yöntemler

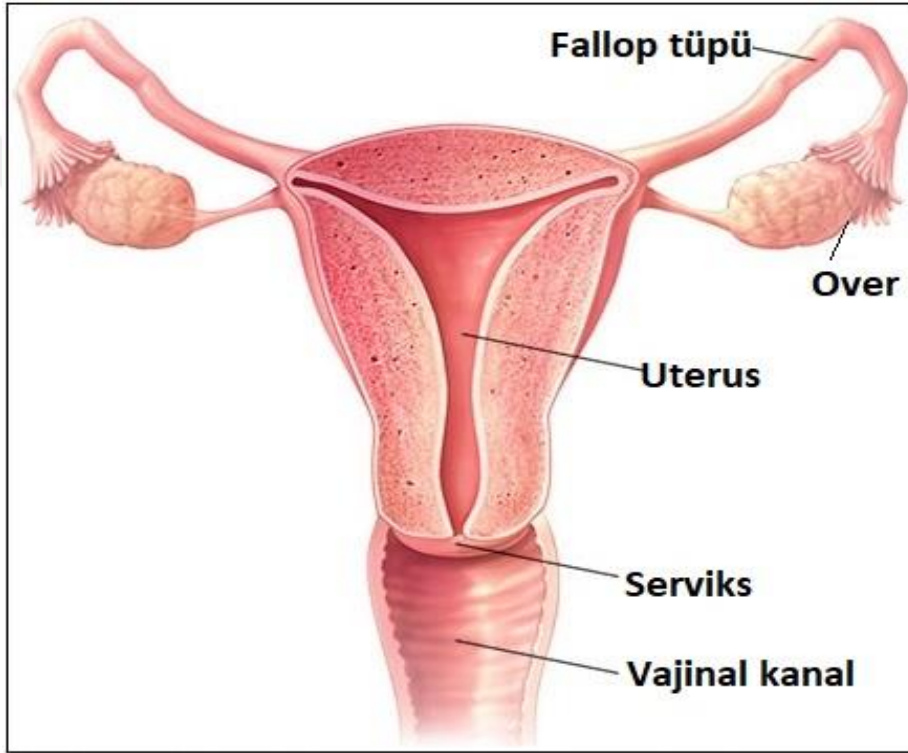
İUA veya AS tedavisinde tekrar adezyon oluşumları operasyon başarısını gölgeler ve lezyon ciddiyetiyle direkt ilişkilidir. Bütün vakalar için %3.1- 23.5, ciddiyeti daha ciddi vakalar için %20-62.5 tekrarlayan adezyon rapor edilmiştir.

Histeroskopik işlem sonrasında rahim içi araç (RİA), uterin yüzeylerin temasını engelleyen fiziksel engelleme yapar. RİA'lar adezyolizizden sonra yeniden adezyon formasyonunu önlediğini bildiren çok sayıda makale olmasına rağmen birinci sınıf bir çalışma henüz bulunmamaktadır. RİA'nın kullanılan tipi araştırmalarla önemi ortaya çıkarılmıştır. Copper T modelleri için uterusta inflamatuvar yanıt tetikleyebilecekleri bildirilmiştir. Ayrıca küçük oldukları için uterin yüzeylerin temasını engelleyemedikleri ileri sürülmüştür (Yu 2008; Deans ve Abbott 2010). RİA'lar arasında loop en iyi model gibi görülsede bir çok ülkede kullanılmamaktadır. Baskılayıcı etkilerinden dolayı içeriğinde Levonorgestrel bulunan sistemler endometriyumda kullanılmamalıdır. Uterin kavite içinde Foley balon kateterinin şişirilerek 3-10 gün durduğunda bazı çalışmalar tarafından İUA'un tekrar oluşmasını önlemede etkili olduğu bildirilmiştir. RİA ile Foley balon kateteri kıyaslandığında Foley balon RİA uygulamasına göre normal menstrüasyonu düzenlemede daha etkili bulunmuştur (Orhue ve ark. 2003). Fakat Foley kateterin servikal kanalda asendan enfeksiyona yol açabildiği ve şişmiş balonun basınç yaparak endometriyum rejenerasyonu üzerine olumsuz etkisinin olacağıda unutulmamalıdır.

Yapılan çalışmalardan bir başkasında yeni çıkarılmış amnion zarının bir foley kateter balonunun etrafında sarılı şekilde uterus kavitesinde iki hafta tutulduğunda %48 oranında hafif derecede adezyonlar görülmüştür (Amer ve Abd-El-Maeboud 2006). Başka bir çalışmada ise Hyaluronik asit jelin endometrial yüzeyleri 72 saatte birbirinden uzak tutabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca operasyon sonrası jel uygulanan hastaların (%14) ve kontrol grubunda ise (%32) oranında operasyon sonrası tekrar adezyon geliştiği bildirilmiştir (Tsapanos ve ark. 2002). Küretaj sonrasında östrojen tedavisinin endometrial üzerine olumlu etkisi gösterilmiş olmasına rağmen bu olumlu etkilerin gebelik ve tekrar adezyon oluşup oluşmadığını gösteren bir çalışma yoktur. Dört hafta süresince Estradiol valerat 4 mg/gün ve son 10 gün 10mg/gün medroksiprogesteron asetat eklenmesi önerilen uygulama şeklidir. Histeroskopik adezyolizizler ile operasyon sonrası erken dönemlerinde de tekrar fertilitate oluştuğunu gösteren sonuçlar bildirilmiştir. Uterin perfüzyonu arttırabilecek tedaviler denenmiş olmakla birlikte, özellikle aspirin, nitrogliserin, sildenafil gibi ilaçların etki mekanizması dışında kullanılması ve advers etkileri düşünüldüğünde günümüzde kullanımları tavsiye edilemez (Deans ve Abbott 2010).

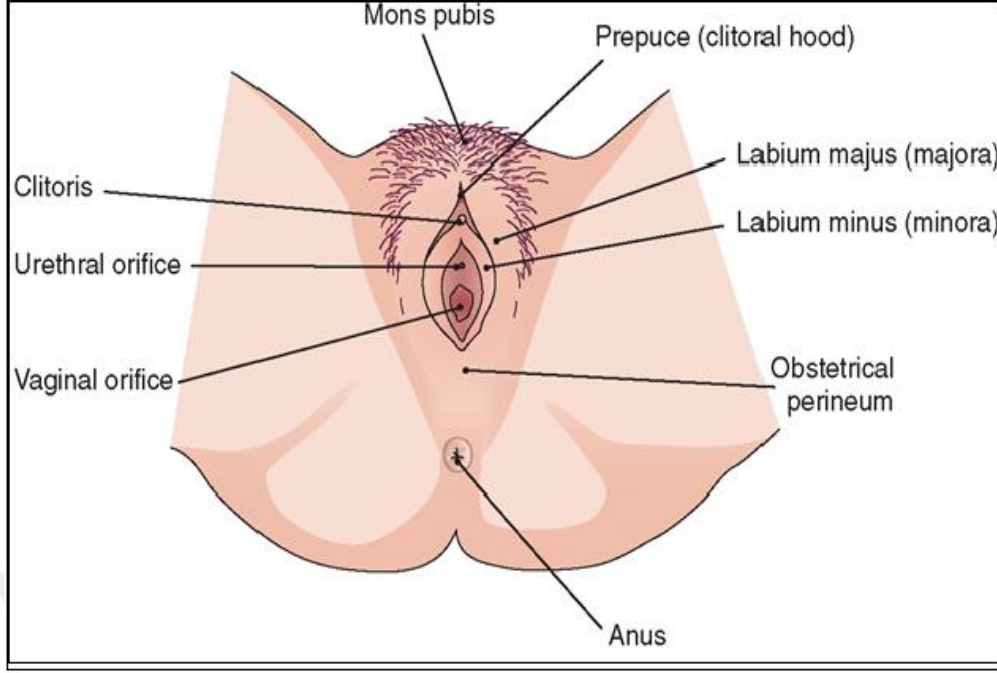
4.2. DIŞI GENİTAL SİSTEM

Dişi üreme sistemi, internal genital organlarından ve eksternal genital yapılarından oluşmaktadır. Dişi internal üreme organları pelviste yer almaktadır. Dış genital organlar ise perineumun vulva adı verilen anterior bölgesinde yer almaktadır (Ross ve Pawlina 2014). Dişi iç üreme organları, vajina, uterus, tuba uterinale ve ovaryumlardır (Şekil 4.2.1). İç genital organlar, oositin ovulasyonu, fertilizasyonu, implantasyonu ve son olarak gelişen embriyonun doğumunun meydana gelmesini sağlayacak yapıdadır (Kierszenbaum 2006).



Şekil 4.2.1. Dişi iç genital organlar (<https://www.mayoclinic.org>, Erişim tarihi: 09.05.2018).

Dış genital organlar, labium majuslar ve minuslar, klitoris, vestibul, vajinal açıklık, himen, mons pubis, ve dış uretral orifistir (Şekil 4.2.2). Meme bezlerinde gebelik sonrası doğan yavrunun beslenmesinde önemli rolünün bulunması ve üreme sisteminin hormonal kontrolü altında bulunması dişi üreme sistemi içerisinde yer almasına neden olmaktadır (Ross ve Pawlina 2014, Kierszenbaum 2006).



Şekil 4.2.2. Dişi dış genital organlar (<http://what-when-how.com/nursing>, Erişim tarihi: 10.08.2018).

4.2.1. Uterus Anatomisi

Uterus, döllenmiş ovumun doğuma kadar gelişmek üzere yerleştiği, mesane ile rektum arasında yer alan, armut şeklinde kastan oluşan bir organdır. Perineal uçta vajina ile devam eder, üst yan kısımlarda tuba uterinalar ile bağlantısı vardır. Uterusun uzunluğu yaklaşık 7,5 cm'dir. Ağırlığı 30-40 gram, kalınlığı 2,5 cm ve genişliği 5 cm kadardır. Üç kısımda incelenir: 1) Korpus uteri, 2) İsthmus uteri, 3) Serviks uteri.

Korpus uteri; uterusun yaklaşık 2/3 kısmını oluşturan en geniş bölümüdür. Korpus uterinin en üst kısmındaki kubbe şeklinde bölgeye fundus uteri denir. Üzeri periton ile örtülü Fundus uterinin ince bağırsak ve sigmoid kolonla komşuluğu bulunur. Uterusun korpusu aşağıya doğru daralır ve serviks uteri olarak devam eder. Bu iki kısım arasındaki bölüme isthmus uteri denir. Korpus uterinin facies anterior (ön yüz) ve facies posterior (arka yüz) olmak üzere yüzleri vardır. Facies anterior korpus uterinin mesaneye komşuluğunun olduğu yüzüdür ve üzeri peritonla örtülüdür. Periton isthmus uteriye kadar indikten sonra mesaneye atlar. Uterusun mesane ile arasındaki periton zarı çıkmazına excavatio vesicouterina adı verilir. Facies posterior: corpus uterinin sigmoid kolon ile komşu olan yüzüdür. Bu yüz periton ile örtülüdür. Periton serviks uteriye kadar uzanır ve vajinanın üst kısmından

rektuma geçiş yapar. Uterusun rektumla arasında bulunan periton çıkmazına excavatio rektouterina adı verilir (Cumhur 2001; Netter 2012).

Serviks uteri, uterusun en alt kısmıdır. Portio supravaginalis cervicis ve portio vaginalis cervicis olarak iki kısma ayrılır. Supravajinal parça üstte; vajinal parça ise altta, vajina içinde yer alır. vajinal parçanın alt ucunda ostium uteri yer alır. Serviks önden arkaya basık bir kanaldır, bu nedenle canalis cervicis uteri adını alır. Üstte cavitas uteriye, altta vajinaya açılır. İç yüzünde plicae palmatae isimli mukoza kalıntıları vardır (Cumhur 2001).

Normal olarak kadınların çoğunda uterusun uzun ve kısa eksenleri ile vajinanın uzun eksenini arasında açıklık bulunur ve öne doğru olan bu açıklık 90° 'lik bir açı oluşturur. Bu durum anterversio uteri olarak adlandırılır. Ayrıca corpus uterinin uzun eksenini ile serviks uterinin uzun eksenini de açıklığı öne bakan geniş bir açı oluşturur. 170° olan bu açı ile antefleksiyon uteri konumu tamamlanır. Bu nedenle ayakta duran ve mesanesi boş olan kadınlarda uterus hemen hemen yatay durumdadır (Snell 1998). Uterusun geniş, yuvarlak ve utero sakral bağları vardır. Bu bağların tümü çifttir. Lig. Teres Uteri (Yuvarlak Bağ) düz kas hücreleri ve bağ dokusundan yapılmıştır. Uterustan başlar canalis inguinalis'te seyrederek ve lifleri labium majusta gevşek bağ dokusuna karışır (Sancak ve Cumhur 1999). Lig. latum uteri uterusun yan kenarlarında pelvik duvara doğru uzanır. Yuvarlak bağ tarafındaki ucunun vertikal kesiti üçgendir ve uterin damarlar bu bağın geniş tabanında yayılırlar. Alt kısmı büyük oranda serviksle yan yana duran bağ dokusuna bağlanmıştır ve parametrium olarak adlandırılır. Üst kısmı tuba uterinaları örten üç kıvrımdan oluşur. Utero sakral bağlar ise rectum ile uterus arasında uzanırlar ve bağ dokusundan yapılmışlardır. Bağ dokusu bir miktar kas dokusu içerir ve periton ile kaplıdır (Roos ve Kaye 2003; Cunningham ve ark. 2001). Uterusun beslenmesini sağlayan en önemli kaynak a.iliaca internanın bir dalı olan a.uterinadır. Lig. latum uterinin tabanından iç yana doğru seyreden bu arter ureteri üstten dik açı ile çaprazlar ve orificium internum düzeyinde serviks uteriye ulaşır. Daha sonra lig. latum uteri içinde uterusun yan kenarında yükselen arter, sonunda a. ovarica ile anastomoz yapar. A. ovarica da uterus beslenmesine katkıda bulunur. Diğer yandan a. uterina, serviks uteri ile vajinayı besleyen bir dal verir. Uterusun venleri kalındır ve arterleri izleyerek lig. latum uteri içine girerler. Serviks uterinin yanlarında plexus venosus

uterinus'u oluştururlar. Bu pleksustan çıkan venler (v.uterinae) v.iliaca internaya bağlanır. Endometriyumda bol miktarda lenf dolaşımı izlenmekle birlikte gerçek lenfatik damarlar çoğunlukla bazal katmanda yayılmış haldedirler. Miyometriyumun lenf damarları perimetriyuma gidildikçe sayıca artar ve serozanın hemen altında, özellikle uterusun arka ve daha az oranda da ön duvarında bir lenfatik pleksus meydana getirirler (Cunningham ve ark. 2001). Uterus sınırları pleksus hypogastricus inferior ve büyük çoğunluğu pleksus utero vaginalis'in n ve orta bölümlerinden gelir (Snell 1998).

4.2.2. Uterus Histolojisi

Uterus pelvis boşluğunda bulunan içi boş ve kalın duvarlı bir organdır. Armut şeklinde nden arkaya yassılaşmış bir görünümü mevcuttur ve st kısmı kesik bir koni şeklinde dir. Uterus, korpus uteri ve serviks uteri olarak iki kısımda incelenir. Korpus uteri ve serviks uteri arasında kalan ve çok belirgin olmayan dar kısma isthmus uteri denir

Korpus uteri; Uterusun 2/3 st kısmını oluşturur. n yüzü mesane, arka yüzü bağırsaklarla komşudur. st dış köşelerine tuba uterinalar açılır. Tuba uterinaların açıldığı köşeleri birleştiren hattın üzerinde kalan korpus kısmına fundus uteri denir.

Serviks uteri: Uterusun 1/3'lk alt bölümüdür. İsthmus uteri ile vagina arasında uzanır. Portio supravaginalis vajinanın üstünde kalan bölümüne, portio vaginalis vajinanın içerisinde bulunan bölümüne denir. Uterusun vaginaya açılan deliğine ostium uteri denir. Ostium doğurmamış kadınlarda yuvarlak doğurmuş kadınlarda transvers bir yarık şeklinde dir. Bu yarığın önündeki kısma labium anterius, arkasındaki kısma labium posterius denir (Unur ve ark. 2009).

Uterus duvarı histolojik  tabakadan oluşur. Bu tabakalar tunika mukoza (endometriyum), tunika muskularis (miyometriyum) ve tunika seroza (perimetriyum) olarak adlandırılır (**Resim 4.2.2.1**). Endometriyum uterus mukozasıdır. Endometriyum, fetusun yerleşip geliştiği uterusun en iç katmanıdır. Histolojik açıdan yapısı tubuler organların yapısına benzer ve submukoza tabakası bulunmaz. Bölümlerine göre endometriyum dokusu uterin kavitenin bulunduğu içten dışa doğru üç ana kattan oluşur:

➤ **Korpus uteri;**

1. Endometrium: Embiryonun implantasyonu için elverişli ortam meydana getirmek, maternal plasentayı oluşturmak, doğum olana kadar embiryoya ev sahipliği yapar ve embiryonun korunması ve beslenmesi gibi görevleri üstlenir. Puberteden menapoza kadar düzenli şekilde aylık sikluslarla ovaryumdaki gelişmelere ayak uydurur ve değişimlere uğrar. Endometriyum önce proliferatif olarak kalınlığı artar, bez sayısı ve salgıları çoğalır, stromal hücreleri glikojen depolamaya başlar. Bu değişimler sonucunda fertilizasyon meydana gelmezse yeniden eski durumuna dönemeyeceği için biraz kanla dökülür ve dışarı atılır. Buna menstruasyon ya da regl denir. Bu olayın ardından tekrar değişimler başlar. Over hormonları menstrual siklusu kontrol eder ve düzenler.

Endometrium'un iki alt katmanı bulunur:

a. Lamina epitelyalis: Epiteli tek katlı prizmatik epitel hücrelerinden oluşur. Bazı epitel hücreleri apikal yüzlerinde kinosilyalar bulundurlar. Silyaların hareketi vajina yönünde gerçekleşir. Ancak bazı sillerin ovaryum yönünde de hareket yaptığı bildirilmiştir. Silyasız epitel hücrelerinin sitoplazmalarında salgı granülleri bol miktarda bulunur (Kierszenbaum 2006; Tekelioğlu 2002).

b. Lamina propriya: Özel bir bağ dokusu olup bol miktarda kan, lenf damarları ve hücre bulundurur. Hücreleri mekik ve yıldız benzeyen stromal hücrelerdir. Retiküler bağ dokusundan zengindir. L. propriyanın özelleşmiş bu bağ dokusu içinde uterus bezleri (gll. uterinae) bulundurur. Bu bezler basit prizmatik silyasız hücrelerden oluşur ve yapısı basit tübülerdir (Gartner ve Hiatt 2007; Eroschenko 2008). Bezler miyometriyuma kadar uzanırlar ve bazen dip kısımları çatallanıp iki kısımdan oluşur. Siklusa bağlı değişimler bezlerin sayısını ve aktivitesini değiştirir. Yaşlandıkça endometriyum atrofi olur ve kalınlığı giderek azalır. Bezlerin ağız kısımları bir miktar kapanarak salgısının birikimi sonucu küçük kistler oluşturabilir. L. propriyanın bazal 1/3 kısmı fibröz bağ dokusundan meydana gelir. Bu kısım siklik değişimlere katılmaz ve stratum bazale adını alır. Siklik değişimlere katılan 2/3 üst kısımdır ve stratum fonksiyonalis denilir. Aylık sikluslar sonucunda bu kısım altındaki bazal tabaka hücrelerinin rejenerasyonu ile onarılır. Fonksiyonalisteki bezlerin dar olan boyun kısımlarının bulunduğu tabakasına stratum kompaktum, altta

kalan ve bazal tabakaya komşuluğu bulunan geniş kısmına da stratum spongiosum adı verilir (Kierszenbaum 2006).

Endometriyumun menstrual döngüde dışarı atılan fonksiyonals tabakasındaki bezlerde; proliferatif, salgı, silyalı ve bazal hücreler olmak üzere epitel kökenli toplam 4 tip hücre bulunur. Bazal ve proliferatif hücrelerin yoğun kromatinli nükleusları ve belirsiz nükleolusları vardır. Proliferasyon evresinde hücreler çoğalınca çekirdekler bez epiteline yalancı çok katlı görüntüsü verirler (Sternberg 1997). Sekretuar hücrelerde müsinöz olmayan bir salgı mevcuttur. İlk olarak salgı nükleusun altında birikmeye başlar. Üç farklı tip salgı hücresi ayırt edilir. Bu hücreler; vakuolsüz, vakuollü ve tuba uterinalardaki hücelere benzeyen salgı hücreleridir. Vakuolsüz hücrelerin çekirdekleri veziküllü ve yuvarlaktır, homojen dağılmış kromatin içerirler. Nükleolusları belirgin ve sitoplâzmaları eozinofiliktir. Vakuollü hücrelerin nükleusları ise proliferatif hücrelerinkine benzer (Sternberg 1997). Proliferasyon evresinde silyalı hücreler daha belirgindir. Genç silyalı hücreler bazal laminaya yakındırlar ve piramit şeklinedirler. Açık renk sitoplâzmalara sahiptirler. Bezleri döşeyen hücelerde erken sekretuar evrede ultrastrüktürel düzeyde dev mitokondriler ve çekirdeklerinde kanal sistemi görülür (Sternberg 1997; Klaus 2000).

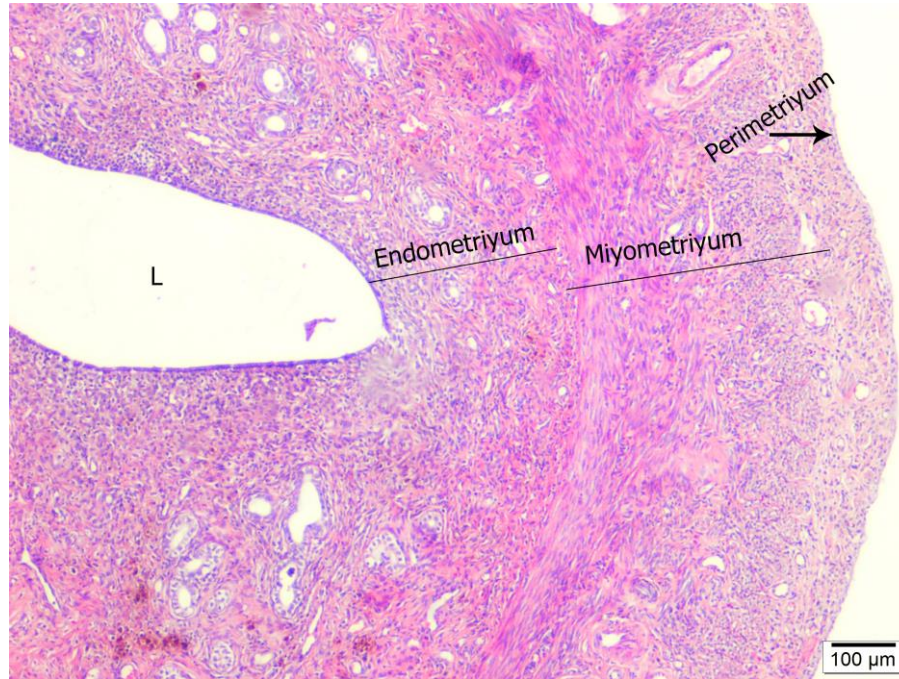
Uterus gelip beslenmesini sağlayan a. uterina myometriyumda a. arkuata adını alır. Arkuat arter endometriyumun bazal tabakasinda a. basilaris, fonksiyonalsinde ise a. spiralis adını alır. Aa. spiralis yüzeye yakın tarafta zengin kapiller yataklar oluştururlar (Ross ve Kaye 2003).

2. Miyometriyum: Uterusun en kalın katmanı miyometriyumdan oluşur. Memelilerde burada bulunan düz kas lifleri organizmanın en uzun liflerini içerir. Gebelikte bu uzunluk maksimum seviyeye ulaşır. Düz kas liflerinin keskin sınırlarla ayrılamayan 4 ayrı tabakadan oluştuğu görülür.

- a. Stratum submukoza: Endometriyumla temas eder, longitudinal seyirlidir.
- b. Stratum vaskulare: Sirküler veya spiral seyirli olabilen, bol damarları kısmıdır.
- c. Stratum supravaskulare: İnce bir tabakadır. Sirküler/longitudinal seyirli kas tellerinden oluşur.
- d. Stratum subserozum: Serozaya komşu olan, uzunlamasına yerleşmiş kaslardır. (Ross ve Kaye 2003; Erdoğan ve ark. 1996; Gartner ve Hiatt 2007).

Hamilelikte kas lifleri hipertrofiyle ya da kas liflerinin mitozuyla yükselir. Doğumdan sonra, çoğalan kas liflerinin bir kısmı küçülür, bir kısmı ölür ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Endomysium artışın ana sebebi kollajen ipliklerdeki enzimatik yıkımdır, sonuçta uterus yeniden eski haline dönmeye çalışır. Gebe olmayanlarda kontraksiyonlar hissedilemeyecek kadar azdır. Kasılmalar cinsel uyarı veya menstrüasyon esnasında artar ve kramp benzeri ağrı ortaya çıkarabilir. Progesteron ve özellikle relaksin gebelikte myometriyum kontraksiyonlarını baskılar. Bu baskının gebelik sonunda azalıp yok olması doğumu başlatır. Doğumda kantraksiyonlar nörohipofizden salgılanan oksitosin ile artar. Östrojen ise myometriyumun hacmini normal olarak sürdürmesi için gereklidir, yokluğunda uterus atrofiye olur. Gebelik olmayan rahimde düz kas hücreleri hemen hemen 50 µm uzunluğundadır. Uterus büyümesi esas olarak bulunan düz kas hücrelerinin hipertrofisi ile olur ve düz kas hücreleri 500 µm uzunluğa erişirler (Kierszenbaum 2006; Tekelioğlu 2002; Ross ve Pawlina 2014).

3. Perimetrium: Uterus en dıştan saran, mezotel ve gevşek bağ dokusundan oluşan peritonun visseral yaprağıdır. Peritonsuz bölgede bu tabaka tunika adventisya olarak adlandırılmaktadır. Lateralde ligamentum latum'a karışır ve uterusun mesaneyle komşuluğunda bulunmaz (Kierszenbaum 2006; Gartner ve Hiatt 2007).



Resim 4.2.2.1. Uterusun histolojik tabakaları, H&E, L: Lümen, Bar: 100 µm. (Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı arşivi).

Serviks Uteri; Bu bölgenin yapısı diğer bölümlerinden farklılık gösterir:

➤ **Perimetriyum:** , Serviks üzerinden kolayca sıyrılır çünkü periton altında submüköz bir doku bulundurur.

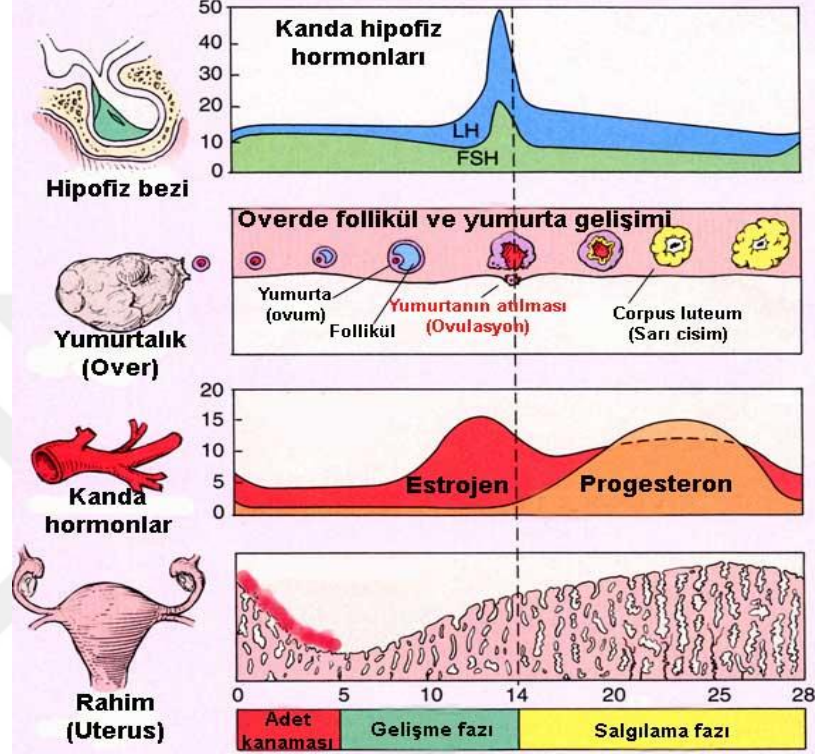
➤ **Myometriyum:** Düz kas yerini kollagen ve elastik iplikler fazlaca alır. Kas miktarı artarsa klinikte "yetersiz serviks" tablosu oluşur.

➤ **Endometriyum:** Spiral arter bulunmaz, çok az sıklık değişim olur, menstrüasyonda epitel dökülmez. Ayrıca bezler az sayıdadır ve obliktirler. Serviks kanalı mukozası 1/3 alt kısmında mukoza çok sayıda kıvrım yapmıştır. Serviks epiteli primaztik tek katlıdır. Portio vaginalis çok katlı yassı epitelden oluşur. Pirizmatikden çok katlı yassıya geçiş keskindir. Farklı iki tip epitelin geçiş yerleri kansere meyilli bölgelerdir. L. propriya içsi hücrelerden zengin spiral arter bulunmayan sıkı bağ dokusudur. Mukus salgılayan serviks bezleri vardır. Bazen bez ağzları tıkanır ve kistik oluşumlar gözlenir (Nabothi kistleri). Gebelikte ise bu bezler oldukça koyu kıvamlı bir müküs salgıyla serviks kanalını tıkayan bir tıkaç oluşturur. Oluşan tıkaç bakterilerin ve spermin girişini engeller (Kierszenbaum 2006).

4.2.3. Menstrüel Siklus

Endometriyum, etkisinde kaldığı ovariyal steroid hormonları östrojen ve progesteronun kontrolünde 28 günde bir tekrarlayan bir döngüde çoğalma, farklılaşma ve doku yıkımı geçiren dinamik bir dokudur. Eğer gebelik meydana gelmezse endometriyum dökülür ve tekrar yenilenir. Menstrüasyon, endometriyum üst 2/3'lik kısmının (işlevsel tabaka) döküldüğü ve daha sonra tekrar yenilediği bir süreçtir. Sonuç olarak endometriyum fizyolojik hasarın ve tamirin meydana geldiği bir alandır. Menstrüel siklus süresi değişkenlik gösterebilir ortalama 28 günde bir tekrarlanır (Dey ve ark. 2004). Menstrüel sikluslar genellikle 12-15 yaşlar arasında başlar ve 45-50 yaşına kadar devam edebilir. Menstrüel sikluslar, yumurta üretimi ile bağlantılı ovaryum değişimlerinin sonucu olarak ortaya çıkar. Bu yüzden dişi sadece menstrüasyon gördüğü yıllar boyunca fertil kalır. Bu durum seksüel aktivitenin menopozla sonlanması anlamına gelmez, sadece fertilité sona erer. Pratikte menstrüel siklusun başlangıcı kanamanın görüldüğü gün olarak alınır. Akıntı damarlardan gelen kanın dejenerasyon olan endometriyumla yapısıyla karışımından ibarettir. Menstrüasyonda menstrüel faz siklusun ilk dört günü olarak tanımlanır. Proliferatif faz 5 ile 14'üncü günler arasını kapsar. Sekretuar faz ise 15 ile 28'inci günler

arasını kapsar. Her fazın süresi değişebilir. Belirtilen aralıklar sadece ortalama değerlerdir. Menstrual sıklusta bir proliferatif faz, bir sekretuar ya da luteal faz ve bir menstrual faz bulunmasına karşın siklus süresince görülen yapısal değişiklikler kademeli olarak gerçekleşir (Şekil 4.2.3.1). Burada bahsedilen fazlar arasındaki belirgin ayrımlar gerçekte eğitici olması amacıyla yöneliktir.



Şekil 4.2.3.1. Uterin siklus evreleri (<https://komencoj.files.wordpress.com>, Erişim tarihi: 23.05.2018).

➤ **Proliferatif Faz:** Menstrual fazdan sonra, uterus mukozası bezlerin bazal kısımlarını içeren küçük bir lamina propriadan ibarettir. Proliferatif faza ovaryum foliküllerinin geliştiği ve östrojenlerin üretildiği dönemle çakışması sebebiyle foliküler fazda denilir. Tüm proliferatif faz boyunca hücresel çoğalma devam eder. Böylece hem bezler hem de endometriyumun yüzey epiteli yenilenir. Ayrıca, bağ dokusu hücreleri çoğalır ve lamina propria içinde temel madde birikir. Bu da endometriyumun bir bütün olarak büyümesine sebep olur (Ross ve Kaye 2003; Junqueira ve Carneiro 2006; Kierszenbaum 2006).

Proliferatif fazın sonunda, endometriyum 2-3 mm kalınlığa ulaşır. Tek katlı prizmatik epitel hücreleri içeren bezler dar lümenli düz tübüller oluştururlar. Bu faz esnasında, epitel hücrelerinde kaba endoplazmik retikulum sisterna sayısında ve

golgi kompleksi boyutlarında giderek bir artış izlenir ve bu şekilde hücreler salgılama aktivitesi için hazırlık yapar. Spiral arterler yenilenmekte olan stroma içine doğru ilerler.

➤ **Sekretuar ya da Luteal Faz:** Bu faz ovulasyondan sonra başlar. Korpus luteum tarafından salgılanan progesteron hormonunun etkisi altındadır. Östrojenin etkisi ile gelişmiş olan bezler, progesteron etkisiyle glikoproteinleri salgılar. Bu glikoproteinler implantasyondan önce embriyonun en büyük beslenme kaynağı olacaktır. Bezler fazlasıyla kıvrıntılı, spiral bir hale gelir ve epitel hücreleri nükleuslarının altında glikojen depolamaya başlar. Daha sonra, glikojen miktarında düşme olur. Glikoprotein salgı ürünleri, bezlerin lümenini genişletir. Bu fazda endometriyum, salgı ürünlerinin birikmesi ve stromadaki ödemin bir sonucu olarak maksimum kalınlığa (5 mm) ulaşır. Mitozlara sekretuar faz esnasında nadir olarak rastlanır. Spiral arterlerin uzaması ve kıvrılması devam eder ve endometriyumun yüzeysel kısmı içine uzanır. Progesteron miyometriyumun düz kas hücrelerinin kontraksiyonunu inhibe ederek embriyonun implantasyonu tehlikeden korur.

➤ **Menstrual Faz:** Ovaryum tarafından serbest bırakılan ovumun döllenişi ve implantasyonu gerçekleşemediği zaman, korpus luteumun fonksiyonu yaklaşık 14 gün sonra kendiliğinden durur. Bu durumda kandaki progesteron ve östrojen düzeyleri süratle düşer. Bu hormonların etkisiyle gelişmiş olan endometriyumda gerileme başlar ve endometriyum kısmi olarak dökülür. İmplantasyon gerçekleştiği takdirde gelişmekte olan embriyo tarafından insan koryonik gonadotropini (hCG) sentezlenmeye başlar. Bu hormonun etkisiyle korpus luteum yaşamına devam eder ve menstruasyon oluşmaz. Sekretuar fazın sonunda, spiral arterlerin duvarları kasılır, kan akımı engellenir ve oluşan iskemi damar duvarının ve endometriyumun fonksiyonalis tabakasının nekrozuna neden olur. Bu esnada kasılan damarların yukarısında bulunan kan damarları yırtılır ve kanama başlar. Endometriyum kısmen ayrılmış bir hale gelir. Dökülen miktar farklı kadınlarda hatta aynı kadında farklı dönemlerde bile değişkenlik gösterir. Menstrual fazın sonunda endometriyumdan geriye, endometriyum bezlerinin bazal uçlarını içeren bazal tabakadan başka bir şey kalmaz, buradan bez hücrelerinin çoğalması ve bunların yüzeye göç etmeleri ile proliferatif faz ve siklus tekrar başlar (Ross ve Kaye 2003; Junqueira ve Carneiro 2006; Kierszenbaum 2006).

4.2.4. Uterus Embriyolojisi

Dişilerde ana genital kanallar paramezonefrik kanallardan gelişir. Başlangıçta her kanalda tanımlanabilen üç kısım vardır.

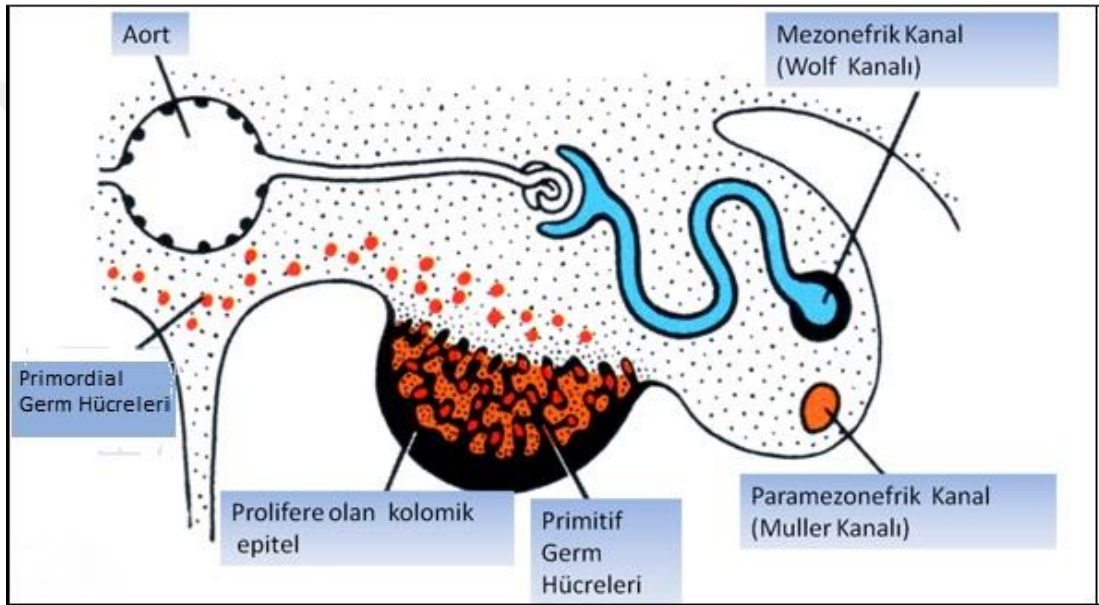
- a) Karın boşluğuna açılan kranial vertikal kısım,
- b) Mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal kısım ve
- c) Karşı taraftan gelen eşiyile birleşen kaudal vertikal kısım.

Overlerin aşağı inişiyile birlikte ilk iki kısımdan uterus tüpleri gelişir. Kaudal parçalarda uterus kanalını oluşturmak üzere kaynaşırlar. Uterusun korpus kısmı ile serviks, kaynaşan paramezonefrik kanallardan şekillenir. Bunların etrafı uterusun miyometriyum ve perimetriyum tabakalarını meydana getiren mezenşim ile çevrilidir. Paramezonefrik kanalın solid ucunun ürogenital sinusa ulaşmasından hemen sonra sinusun pelvik parçasından iki solid çıkıntı belirir. Sinovajinal bulbus adı verilen bu çıkıntılar hızlıca proliferer olur ve solid vajinal plağı oluştururlar. Plağın kranial ucunda proliferasyon devam etmesi neticesinde uterusla ürogenital sinus arasındaki mesafeyi uzatır. Vajina beşinci ayda tamamen kanalize olur. Paramezonefrik kanalların ikinci kısımlarının mediokaudale doğru yer değiştirmesiyle ürogenital sırtlar giderek daha transvers bir düzleme oturur. Kanallar orta hatta birleştikten sonra pelvis içinde enli bir transvers katlantı oluşur. Birbiriyile kaynaşmış paramezonefrik kanalların lateralinden pelvis duvarına doğru uzanan bu katlantı uterusun broad ligamentini oluşturur. Bu ligamentin üst sınırında uterus tüpleri arka yüzünde de overler yer alır. Uterus ve broad ligamentler, pelvisi uterorektal poş ve uteroservikal poş şeklinde ikiye böler. Uterusun son kısmı etrafında yer alan kanat şeklindeki vajinal forniksler paramezonefrik kökenlidir. Yani vajina, üst kısım uterus kanalından, alt kısım ise ürogenital sinustan olmak üzere iki yerden köken alır: Vajina lümeni ürogenital sinustan himen adıyla bilinen ince bir bağ doku plağıyla ayrılmıştır. Himen sinus epiteli ve ince bir vajinal hücre tabakasından ibarettir (Sadler 2011).

4.2.5. Ovaryum Embriyolojisi

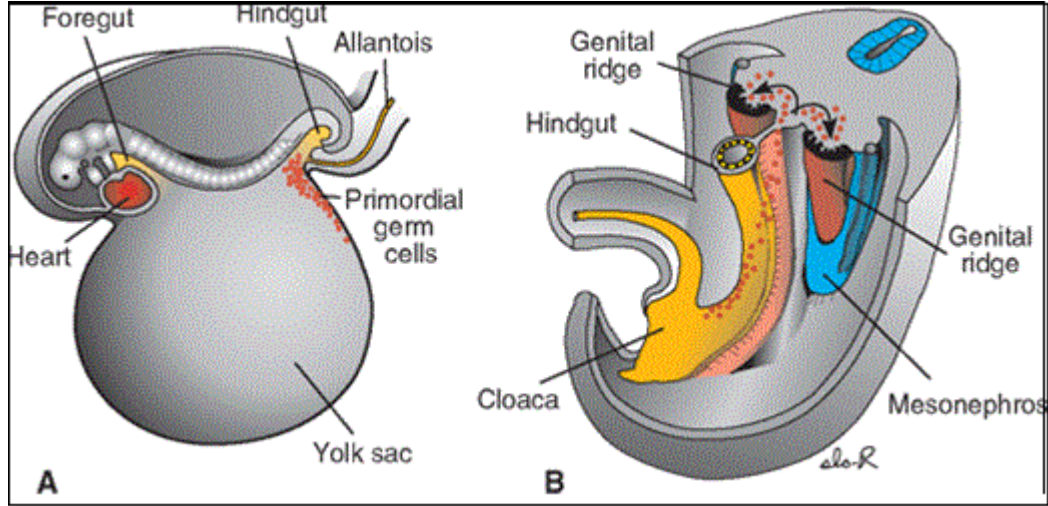
Embriyolojik gelişim sırasında cinsiyet farklanması, bazıları otozomal olan birçok genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Seksüel dimorfizimin anhtarı, kısa kol üzerindeki (Yp11) SRY genini (Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyen bölge = sex- determining region on Y) taşıyan Y kromozomudur. Bu genin protein

ürünü rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteini testis belirleyici faktördür (TDF). Fetusun cinsiyeti bu faktöre varsa erkek yoksa kız tipinde gelişir. Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan henüz fertilizasyon sırasında belirlenmiş olur fakat, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar dişi veya erkeğe benzer morfoloji sergilemezler. Gonadlar ilk önce sölomik epitelin çoğalması ve hemen altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla bir çift uzunlamasına oluşmuş genital veya gonadal sırtlar şeklinde meydana gelir (Şekil 4.2.5.1) ve bu aşamada henüz germ hücrelerini içermezler (Sadler 2011).



Şekil 4.2.5.1. Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara göçü (<http://www.tjodistanbul.org>, Erişim tarihi: 24.01.2018).

Primordiyal germ hücreleri epiblastan kökenlenir, primitif çizgide göç eder ve üçüncü haftada yolk kesesinin allontoise yakın dorasal duvarındaki endoderm hücreleri arasına yerleşirler, dördüncü haftada ameboid hareketlerle son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşırlar. Altıncı haftada ise genital sırtları işgal ederler (Şekil 4.2.5.2). Bu hücreler genital sırtlara ulaşmadığı durumda gonad gelişimi gerçekleşmez (Sadler 2011).



Şekil 4.2.5.2. A. Embriyonik gelişimin 3. haftasında primordiyal germ hücrelerinin vitellus kesesindeki konumu. B. Primordiyal germ hücrelerinin genital sırta doğru göç yolları (Sadler 2011).

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmadan önce ve ulaştıkları sırada, genital sırttaki epitel hücreleri proliferasyon olarak altlarındaki mezenşim içine girerler ve burada primitif cinsiyet kordonlarını oluştururlar. Erkeklerde dişide de embriyolarında bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır. Bu dönemde cinsiyet ayrımı yapmak mümkün değildir. Y kromozomu olmayan XX cinsiyet kromozomlarına sahip olan diş embriyolarında, primitif kordonlar düzensiz hücre kümelerine ayrılır. Primitif germ hücreleri grupları ovaryumun medulla bölgesinde yerleşim gösterirler. Medulladaki bu hücre grupları bir süre sonra yerini ovarian medullaya bırakırlar. Dişi gonadların yüzey epiteli çoğalmaya devam eder ve 7. haftada bu epitelden kortikal kordonlar gelişir. Kortikal kordonlar dördüncü aydan itibaren primitif germ hücrelerini çevreleyen izole hücre grupları haline gelirler. Primitif germ hücreleri zamanla oogonyuma dönüşür; yüzey epitel hücreleri ise folikül hücrelerine farklılıklar. Folikül hücreleri oogoniumla birlikte primer folikülü oluşturur (Sadler 2011).

Oogonyumların çoğunluğu bölünmeyi sürdürürken, bir kısmı bölünmesini I mayoz bölünmenin profaz aşamasında durdurarak primer oosit haline dönüşür. Bundan sonraki birkaç ay içinde germ hücre sayısı fetüsün beşinci ayında tahminen 7 milyona ulaşır. Üçüncü aydan itibaren oogonyumlar I mayozun profaz evresine girmeye başlar ve diploten evresinde beklerler. Bu duraksama puberteye kadar devam eder. Yedinci aya gelindiğinde yüzeye yakın olanların dışındaki oogonyumların çoğu dejenerer olur, geri kalanlar ise primer oositlere dönüşürler.

Ancak primer oositlerin çoğu rezorbsiyon ve atreziye uğrayarak sayıları azalır ve doğumda yaklaşık 600.000-800.000 primer oosit bulunur (Sadler 2011; Junqueira ve Carneiro 2006).

4.2.6. Ovaryum Anatomisi

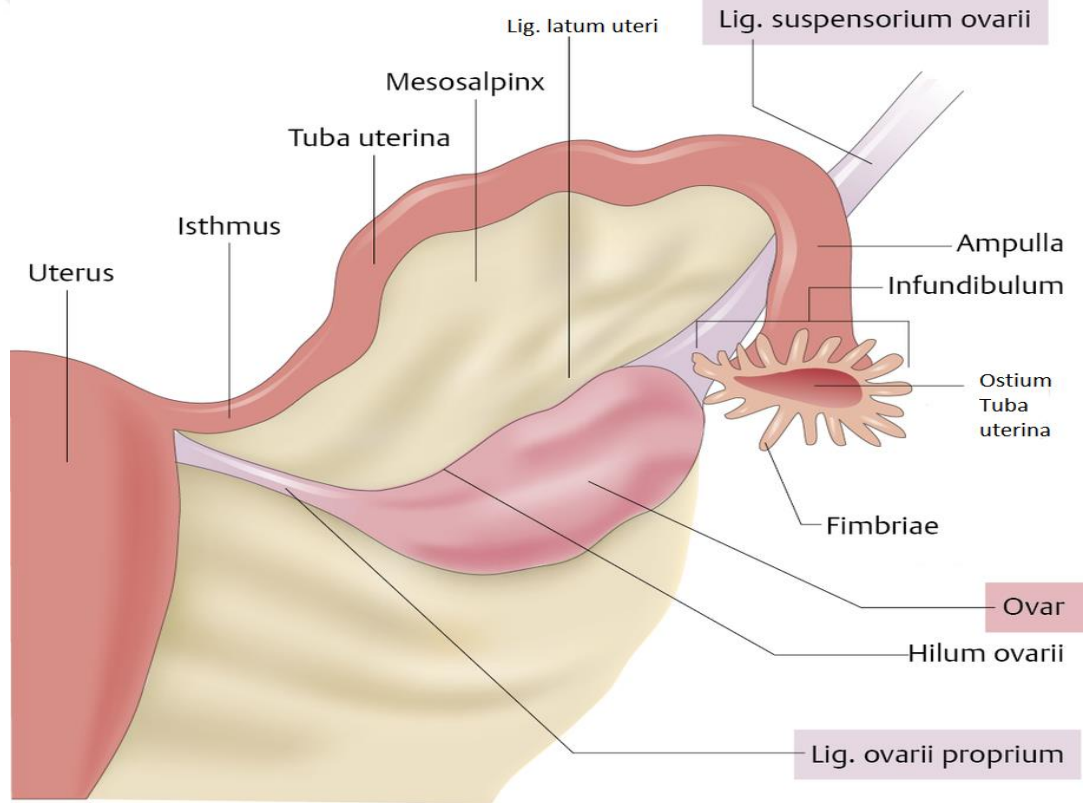
Kadın üreme hücresi, ovumu yapan ovaryumlar pelvis minörün lateral duvarındaki fossa ovarica denilen çukurda yerleşir. Sağ ve sol olmak üzere bir çift olan ovaryumlar bademe benzer şekilleri vardır. Ağırlık 4-6 gr, uzunluk 3 cm, genişlik ise 1,5- 2 cm'dir. Ovaryum gri-pembe renklidir ve erkekteki testisin karşılığıdır (Netter 2012).

Ovaryumun facies medialis ve facies lateralis adı verilen farklı yüzleri vardır, extramitas tubaria ve extramitas uterina olan iki ucu, margo mesovaricus ve margo liber olarak iki kenarı mevcuttur. Medialinde pelvis boşluğu, ince bağırsak ve kolon sigmoideum ile komşulukları vardır. Dış yüzü ise fossa ovarica'yı örten peritonla komşuluk eder. Ovaryum büyük periton boşluğunda yer almasına rağmen yüzleri periton ile örtülü değildir. Fimbria ovarica ve lig. Suspensorium üst ucuna tutunur. A. ovarica, v. ovarica ve plexus ovaricus'tan çıkan dallar bu ligament içerisinde bulunur. Periton katlantısı şeklinde adutis pelvis' ten başlar ve m. psoas major, a. iliaca eksterna, v. iliaca eksterna ve üreteri önden çaprazlar; ovaryumun üst ucunda sonlanarak ovaryumu pelvisin duvarına sabitler. Ovaryumun alt ucu pelvis yatağına doğru uzanır. Buradan başlayan lig. ovarii proprium uterusun dış köşesine tutunur. Ön kenarı ise lig. mesovarium ve lig. latum uteri'nin arka üst yüzüne tutunur. Ön kenarındaki damar ve sinirler hilum ovariden girip çıkarlar (Cumhur 2001; Netter 2012).

Ovaryumlar embriyonik gelişim esnasında başlangıçta intraabdominal bölgede yerleşim gösterirken, üçüncü aydan itibaren pelvis boşluğuna (descensus ovarii) doğru inerler ve pelvis minor duvarının sağ ve soldunaki fossa ovarica denilen (Krause çukuru) çukurlarına yerleşirler (Netter 2012). Çocuk doğurmuş kadınlarda ovaryumun konumu çok değişiklik gösterir. Gebelik sırasında lig. latum ovarii ve ovaryumlar, uterusun genişlemesi ile çok yukarıya karın içine doğru yükselirler. Doğumdan sonra tekrar geri inerler. Ama çoğunlukla ilk orijinal yerlerini bulamazlar. Ovaryumlar zaten sürekli hareket halindedirler. Bağırsak hareketlerinde bile hareket edebilirler. Ovaryumlar tuba uterina'nın arka-alt kısmında bulunan lig.

latum uteri içinde bulunurlar (Şekil 4.2.6.1). Ayakta duran bir kadının ovaryumların uzun eksenini vertikaldir (Gövsa 2003).

Arterleri: Ovaryumlar, aorta abdominalis'ten çıkan a. ovarica'lerden beslenir. İntrauterin hayatta ovaryumlar karın boşluğundadırlar. Daha sonra pelvise inerler. Bu nedenle a. ovarica'lar aorta abdominalisten karın boşluğu içerisinde ayrılır ve aşağıya doğru seyrederek ovaryumlara ulaşırlar. A. ovarica'lar L2 vertebra hizasında aorta abdominalisten ayrılır. Hilum ovarii'den ovaryuma girerek medulla-korteks sınırında pleksus oluşturur. Pleksustan çıkan dallar da foliküllerin çevresini saran zengin kapiller ağları meydana getirir. Menstruel siklus sırasında damarların çapı değişiklik gösterir; folikül gelişiminde damarlar genişken ovulasyondan sonra daralma görülür (Gövsa 2003; Netter 2012).



Şekil 4.2.6.1. Ovaryumların lig. latum uteri içerisinde yerleşimleri. (<https://viamedici.thieme.de/learnmodule/anatomie>, Erişim tarihi: 30.11.2017).

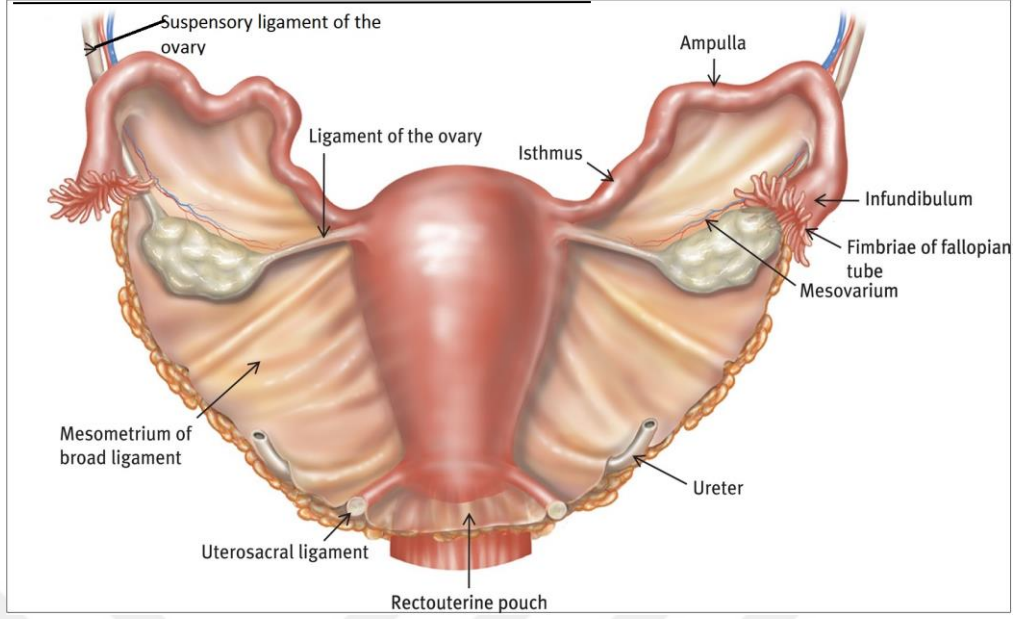
Venleri: Ovaryumun venleri ise, arterler ile birlikte plexus panpiniformis adıyla hilum ovarii'den çıkar. Daha sonra ven pleksusu v. ovarica'yı oluşturur. Soldaki v. ovarica ise v. renali'e sağdaki v. ovarica v. cava inferiora boşalır.

Sinirleri; Plexus ovaricus tarafından sağlanır. Parasempatik lifleri n. vagus'tan sempatik lifleri ise medulla spinalisin T 10-11 segmentlerinden gelir (Cumhur 2001; Netter 2012).

4.2.7. Ovaryum Histolojisi

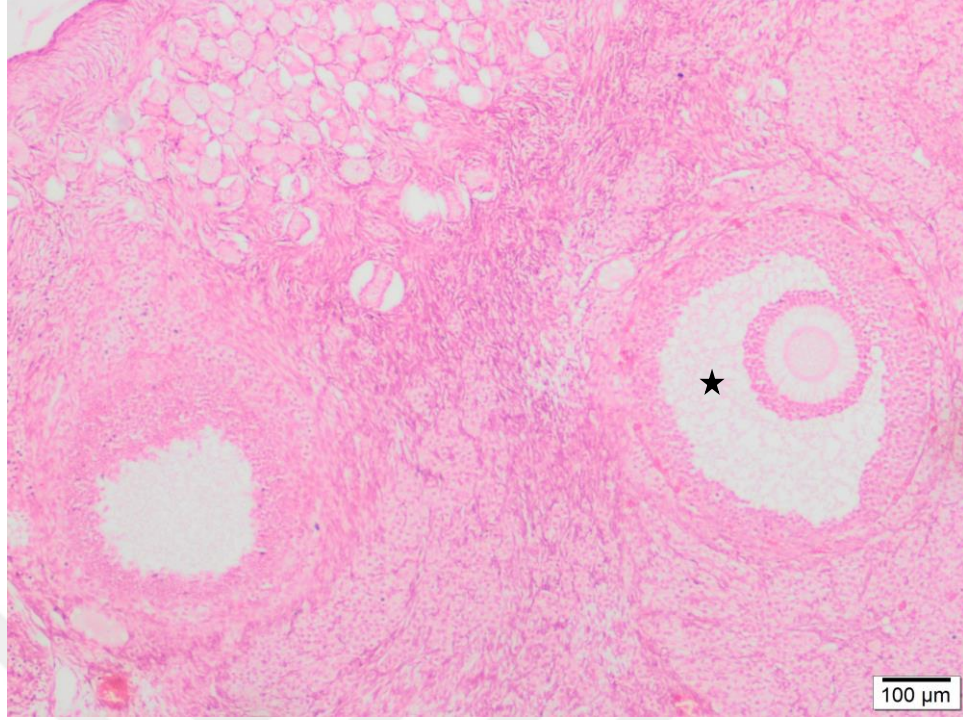
Nulliparlarda ovaryumlar bir çift, badem şekilli, pembemsi, yapılardır. Her ovaryum, mezovaryum denilen peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin posterior yüzüne bağlanır. Ovaryumun superior kutbu, ovaryumun sinirlerini ve damarlarını taşıyan suspensor ligament tarafından pelvis duvarına bağlanır (**Şekil 4.2.7.1**). ovaryumun inferior kutbu ise ovarian ligament tarafından uterusu bağlanır. Bu ligament gelişmekte olan gonadı pelvisin tabanına bağlayan embriyonik fibröz kordon olan gubernakulumun kalıntısıdır. Puberteden önce ovaryum yüzeyi düzgün iken, üreme çağında tekrarlanan ovulasyonlarla skarlı ve düzensiz olur (Junqueira ve Carneiro 2006; Ross ve Pawlina 2014).

Ovaryum bir korteks ve bir medulladan oluşmaktadır. Medulla ya da medullar bölge ovaryumun merkezi bölgesinde bulunmaktadır ve gevşek bağ dokusu, nispeten büyük, kıvrımlı kan damarları, lenf damarları ve sinirler içermektedir. Korteks ya da kortikal bölge, medullayı çevreleyecek şekilde ovaryumun periferik bölgesinde yer almaktadır. Korteks, zengin bir şekilde selüler bağ dokusu içine gömülü ovaryum folliküllerini içermektedir (**Resim 4.2.7.1**). Folliküllerin çevresindeki stromada dağınık düz kas lifleri bulunur. Medullasıyla korteksi arasındaki sınır belirsizdir (Ross ve Pawlina 2014).



Şekil 4.2.7.1. Ovaryumun anatomik bağlantıları (<https://www.cambridge.org>, Erişim tarihi: 24.01.2018).

Ovaryumu mezotelyum yerine ‘germinal epitel’ kaplamaktadır. Ovaryum yüzeyi tek katlı kübik ve bazı bölgelerde yassı epitel ile döşelidir. Germinal epitel olarak bilinen bu selüler tabaka mezovaryumu kaplayan mezotelyum ile devamlılık gösterir. Germinal epitel terimi geçmişte yanlış olarak embriyonik gelişim sırasında germ hücresi oluşum bölgesi olarak bilinmesinden kaynaklanan terimdir. Şimdi primordial germ hücrelerinin (hem dişide hem erkekte) ekstragondal kökenli olduğu ve embriyonik vitellüs kesesinden embriyonik gonadın korteksinin içine göç edip burada farklılaşarak ovaryumun farklılaşmasını indükledikleri bilinmektedir. Germinal epitel ile korteksin arasında, sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer almaktadır (Ross ve Pawlina 2014).



Resim 4.2.7.1. Ovaryum histolojisi, sıçan ovaryumu, H&E, Yıldız: Graaf follikülü, Bar: 100 µm. (MCBÜ, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı arşivi).

➤ **Korteks ve Ovaryum follikülleri:** Ovaryumun fonksiyonel bölümünü oluşturur. Bu nedenle zona parenşimatozada denir. Medulla için de zona vaskuloza adı kullanılır. Kortekste iğsi hücreler epiteloïd karakterde interstisyel hücrelere dönüştüklerinde (folliküllerin teka kılıfı içinde) östrojen gibi hormon da salgılayabilirler. Korteks içinde farklı folikül evrelerinde bulunan ovaryum follikülleri yerleşmiştir. Bu folliküller hem fütal dönemde hemde doğumdan sonra yapısal bazı değişiklikler geçirirler (Gartner ve Hiatt 2007).

Fütal dönemde: Overde etrafını follikül epiteli adı verilen yassı epitel hücrelerinin sardığı germ hücrelerine oogonium denir. Fütal dönemde oogonium'lar 5-6. aya kadar çoğalırlar (çoğalma evresi) ve her iki overdeki oogonium sayısı yaklaşık 7 milyona ulaşır. Oogonium'ların çoğalıp, büyümesi ile oluşan foliküle **primordial folliküller** denir. Primordial folliküllerin ortasında Oosit I (primer oosit) ve etrafında tek sıra yassı epitel kuşatması görülür. Oosit I'ler Mayoz I bölünmenin profaz evresinin diploten aşamasında bekletilir ve uzun yıllar sürecek dinlenme evresine girerler (12-50 yıl kadar). Bu sırada primordial folliküllerin bir kısmı büyüyüp gelişirken bazıları da dejenere olur ve ölürler. Bu olaylar sayesinde sayıları doğumda 2 milyon, ergenlikte ise 400 bin seviyesine kadar iner (bazı yazarlara göre; doğumda

600-800 bin, ergenlikte 40-50 bin kadardır). Primordial foliküller tunika albugineanın hemen altında gruplar halinde bulunurlar. Bu folliküllerin 25-30 mikron çapı, ortasında oosit I (20 mikron çapında) ve çevresinde tek katlı yassı (7-10 adet) folikül epiteli bulunur. Oosit I'nin nükleusu ve nukleolus'u büyük, nukleus biraz eksentrik konumlu ve ince kromatin içerir. Oositin ooplazma adı verilen sitoplazması bir Balbiani cisimciği içermektedir. Balbiani cisimciği Golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun, birçok mitokondrinin ve lizozomların birlikte oluşturduğu kümedir. Ek olarak, insan oositleri anüler lameller içerirler ve küçük, küre şeklinde mitokondriyonlarla çok sayıda vezikül sitoplazma içerisinde dağılmış halde bulunurlar. Anüler lameller bir nükleer zarf kesitler dizisidir. Dizideki her tabaka por yapıları içerir ve bunlar morfolojik olarak olarak nükleer porların yapısıyla özdeşleşir. Bazen iki tane oosit I içeren poliovular folliküllere de rastlanır. Follikül epitelleri oosit I'i hem korurlar hem de kapillerlerden aldıkları besleyici maddelerle beslenmelerini sağlarlar (Ross ve Pawlina 2014; Gartner ve Hiatt 2007; Tekelioğlu 2002).

Doğumdan sonra: Primordial folikül sayısı 2 milyon civarına iner. Puberteye kadar ya da daha uzun sürecek bir dinlenme sürecindedirler. Diğer taraftanda dejenerasyon hızla devam eder. Ergenlikte sayıları 400 bin civarına düşer. Bu dönemden itibaren her ay foliküllerden 5-15 tanesi hormonların (başlıca FSH) etkisiyle mayoz bölünmeyi dolayısıyla olgunlaşmalarını tamamlarlar. İlk kez gebe kalacak bir kadında yılda en fazla 13 kez ovulasyon yapma şansı bulunduğundan yaklaşık 40 yıl süren seksüel hayatı boyunca 500 civarında primordial follikül olgunlaşma şansı bulur, geriye kalan kısım dejenere olur. Her siklusta primordial folikülün gelişmesi sırasıyla: tek katlı yassı folikül epitelleri önce kübik, sonra prizmatik olur. Böylece tek katlı primer folikül (unilaminar primary follicle) gelişir. Mitozla folikül epiteli çoğalıp çok katlı olunca, çok katlı primer folikül (multilaminar primary follicle) veya henüz antrum (folikül boşluğu) oluşmadığından preantral folikül adı verilir. Artık çok katlı folikül epitelleri granüloza hücreleri olarak adlandırılır. Bu evresinde, Oosit I gelişip 60-80 mikronluk bir çapa ulaşır. İlk sıra granüloza hücrelerinin salgıladığı glikoprotein tabaka oosit I'in etrafını kuşatır. Homojen, asellüler olan bu tabakaya zona pellusida denir. Bu tabaka oositi korur ve besler ayrıca varlığını geç blastokist evresine kadar sürdürür ve daha sonra kaybolur.

Zona pellusida oosit ile folikül hücreleri arasında ortaya çıkar. İnsandaki zona pellusida sülfatlı üç asidik zona pellusida (ZP) glikoproteinleri sınıftan meydana gelmektedir ve bu glikoproteinler ZP-1 (80-120 kilo dalton), ZP-2 (73 kilo dalton), ZP-3 (59-65 kilo dalton) olarak adlandırılmaktadır. Bu üçü arasında en önemlisi ZP-3'tür. ZP-3, spermatozoa- bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyonu indükleyicisi olarak fonksiyon görmektedir. ZP-2'nin sekonder spermatozoa- bağlanma reseptörü olduğuna inanılmaktadır. ZP-1'in henüz tam olarak işlevi bilinmemektedir. Çok katlı primer folikülde bu gelişmeler olurken, folikülü saran ovaryum stroması da folikül etrafında teka folikülü adı verilen bir kılıf oluşturur. Folikül geliştikçe bu kılıf; teka interna ve teka eksterna olarak ikiye ayrılır (Ross ve Pawlina 2014). Foliküle bitişik teka interna içsi hücrelerden ve kapillar damarlardan zengindir. Teka interna hücrelerinin hücre membranlarında LH reseptörleri bulunur. LH salınımıyla faaliyete geçen bu hücreler androstenoidin hormonu sentezlerler, bu hormon granüloza hücrelerine geçer ve orada östrodiol dönüştürülür. Teka eksterna ise fibröz bağ dokusundan oluşur. Kollojen demetler, düz kas hücreleri, stromal hücreler ve kan damarları içerir, belirgin bir sınır olmadan ovaryum stromasına karışır. Primer foliküllerde gelişme ilerledikçe; folikülün çapı 200 mikron, granüloza hücrelerinin kalınlığı 6-12 sıraya ulaştığında, granüloza hücreleri arasında erimeler başlar ve antrum adı verilen boşluklar oluşur. Boşluk granüloza hücrelerinden salgılanan bir folikül sıvısı (likör folikülü; başlıca östrojen olmak üzere progesteron, androjenler gibi steroid hormonlar, FSH, LH, inhibin, aktivin, follükülostatin, OMI gibi steroid yapıda olmayan hormonlar ve çeşitli glikozaminoglikanlar içerir) birikir. İlk antrum sonra folikülün adı **sekonder follikül olur** (ya da; antral follikül, veziküler follikül). Gelişme ilerledikçe antrumlar birleşir ve tek bir boşluğa (kavum follikülü) dönüşür. Oosit I prizmatik olan ilk sıra hücre grubuyla adı korona radiata olan, antruma doğru sarkar. Buraya kumulus ooforus adı verilir. Bu şekilde gelişen sekonder folliküllerden birkaçı ileri gelişme göstererek olgun foliküle (**Graaf folikülü**) dönüşür. Ovulasyonda bu graaf foliküllerinden sadece birtanesi atılır. Diğer folliküller ise bu aşamada atreziye uğrar ve atretik foliküllere dönüşürler. Bu dönemde oosit duvarını döşeyenlerine mural granüloza hücreleri adı verilir. Oosit salgıladığı maddelerle mural hücrelerin farklanmasını baskılayıp kumulus hücrelerinin gelişmesini sağlayarak kendi mikroçevresini kontrol altında tutar. Graaf folikülünün

eksentrik konumlu nükleusuna vesikula germinativa, koyu boyanan iri nukleolusuna da makula germinativa denir. Graaf folikülleri büyüyerek 2,5 cm 'lik bir çapa ulaştıklarında ovaryum yüzeyine doğru stigma adı verilen çıkıntı yaparlar. Bundan sonra ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyondan 24-36 saat önce teka interna hücreleri gibi granüloza hücrelerinde de LH reseptörleri belirir, LH artışına bağlı olarak lokal bir faktör olan mayoz bölünmeyi uyaran madde salınır. Oosit I bu maddenin etkisi altında, birinci mayotik bölünmesini tamamlar, böylece oosit II ve I. kutup hücresi (polar body) meydana gelir. Ardından Oosit II hemen ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde kalır. Graaf folikülünün baskısıyla stigma bölgesi iskemiye uğrar, buradaki doku zayıflar ve yırtılma olur. Bununla beraber folikül sıvısının artışı da bu noktaya yaptığı basınçla yırtılmasına sebep olur (Kierszenbaum 2006; Ross ve Pawlina 2014; Junqueira ve Carneiro 2006; Tekelioğlu 2002) .

Ovulasyon: Ovulasyon, hormon aracılı bir işlemdir ve sekonder oositin serbestleşmesi ile sonuçlanır. Olgun folikülün rüptüre olması ve Graaf follikülünden sekonder oositin atılmasıdır. Dışide ovulasyon zamanında ovaryumdan çoğunlukla sadece bir oosit serbest bırakılır, ancak aynı zaman diliminde iki ya da daha fazlası da atılabilir. Ovulasyonla oositin atılması menstrual siklusun ortalarında, yani 28 günlük bir siklusun yaklaşık 14. günü civarında meydana gelir. Uyarımı oluşturan, ön hipofiz bezinden salgılanan luteinizan hormondaki (LH) bir dalgalanmadır. Kanda LH'daki artıştan sonra birkaç dakika içinde ovaryumun kanlanması artar ve plazma proteinleri kapiller venüllerden sızarak ödeme sebep olur. Lokal olarak, prostaglandinler, histamin, vazopressin ve kollajenaz salınır. Granüloza hücreleri daha fazla hyaluronik asit üretirler ve gevşek bir hal alırlar. Kollajen yıkımıyla iskemi oluşur ve folikül dış duvarında bir zayıflamaya yol açar. Bununla beraber antral sıvı basıncının artması ve teka eksternanın düz kaslarının kasılması, folikül dış duvarında rüptüre olması ovulasyona neden olur. Zona pellusida ve etrafındaki korona radiata ve kumulus ooforus hücreleriyle birlikte oosit ve çok az antral sıvı ovaryumu terk eder ve tubaların fimbriyaları tarafından nazikçe süpürülerek abdominal ostiumuna alınır. Kas kontraksiyonu ve silyalı hücrelerin aktivitesinin oluşturduğu itici güç ile ovum, döllenebileceği yere, oviduktun infundibulumuna girer. Böylece kumulus kütesinin peritoneal geçişi engellenir. Döllenmiş ovuma zigot ismi verilir. Zigot yarıklanmaya başlar ve yaklaşık 5 gün sürecek bir yolculukla

uterusa taşınır. Ovum ovulasyondan sonraki ilk 24 saat içinde döllenen II. mayotik bölünmeyi tamamlamaz dejenerasyona uğrar ve fagosite edilir ve menstrüasyon ile dışarı atılır

Korpus Luteum: Ovulasyon tamamlandıktan sonra, ovaryum içinde kalan granüloza ve teka interna hücreleri korpus luteumu oluşturur. Ovaryumun korteks bölgesinde yerleşen korpus luteum, progesteron ve östrojen hormonlarını salgılayan endokrin bez görevi görür. Progesteron yeni ovaryum foliküllerinin gelişmesini engelleyerek ovulasyona engel olur. Folikül sıvısının boşalması ile folikül duvarı büzülür ve katlantılı hale gelir. Folikül boşluğunda bir miktar kanama olur. Bu kan burada koagüle olur ve daha sonra yerini bağ dokusuna bırakır. Bu bağ dokusu ile giderek ortadan kaldırılmakta olan kan pıhtısı artıkları korpus luteumun en iç kısmına yerleşir.

Ovulasyonun ardından granüloza hücreleri bölünmez fakat büyüklüklerinde büyük bir artış görülür. Bunlar korpus luteum parenkimasının büyük bölümünü oluşturur ve granüloza lutein hücreleri ismini alır. Bunlar steroid salgı yapan hücrelerin özelliklerine sahiptirler. Teka interna hücreleri de teka lutein hücrelerini oluşturarak korpus luteumun oluşumuna katılırlar. Bu hücreler granüloza lutein hücrelerine benzer yapıdadır, ancak daha küçüktür ve daha koyu boyanırlar. Bu hücreler korpus luteum duvarının katlantılarında yerleşirler. Korpus luteumun ürettiği progesteron, LH üretimi üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahiptir. Gebelik meydana gelmediği zaman, korpus luteum 10-14 gün yani menstrüel siklusun sadece ikinci yarısı boyunca kalır (menstrüasyon korpus luteumu). Bu süreden sonra, LH eksikliği korpus luteumun dejenere olmasına yol açar. Gebelik meydana gelirse, plösentadan üretilen koryonik gonadotropin korpus luteumu uyarır. Böylece, korpus luteum 6 ay kadar bir süre kalır ancak daha sonra yavaş yavaş etkisini kaybeder. Buna gebelik korpus luteumu denir. Gebelik korpus luteumu aynı zamanda bir polipeptid hormon olan relaksin salgılar. Bu hormon simfisiz pubisin bağ dokusunu yumuşatıp gevşeterek doğumun kolaylaşmasına yardımcı olur (Ross ve Pawlina 2014; Junqueira ve Carneiro 2003; Kierszenbaum 2006).

4.3. İMPLANTASYON

Blastosistin dış tabakası trofektodermin (TE), endometriyumun luminal epiteli (LE) ile etkileşime girmesine implantasyon denir. Bu olayda genetik olarak farklılıkları olan embriyonik ve maternal dokular aralarında başarılı bir kaynaşma meydana gelir. Çeşitli deneysel çalışmalarda, endometriyumun embriyonun implantasyonu için göstermiş olduğu değişikliklerle meydana gelen bu döneme implantasyon penceresi adı verilmiştir. Endometriyumda yapısal, hücresel ve moleküler birçok olay implantasyon penceresi ile kontrol edilir ve böylece endometriyumun embriyoyu kabul edişini sağlayan moleküler markerları ortaya çıkarır. Bunlar sitokinler, adezyon molekülleri, pinopodlar ve diğer endometriyal proteinlerin miktarlarında değişiklikler şeklinde sıralanır (Gökçimen ve ark. 2004; Sarani ve ark. 1999; Kimber, 2000).

İnsanda oositinin dölllenmesi tuba uterinanın genellikle ampulla bölgesinde olur. Zigot pasif olarak uterusu doğru taşınırken yarıklanmaya başlar. Daha sonra gerçekleşen mitozlarla, sıkı bir hücre topluluğu olan morula oluşur. Zona pellusida ile örtülü bulunan morula, zigotla yaklaşık aynı büyüklüktedir. Zigotun segmentasyonu sonucu ortaya çıkan hücrelere blastomer denir. Uterin tübün lümeninden aktarılan sıvının giderek birikmesi sonucunda morulanın merkezinde bir boşluk oluşur. Hücrelerin oluşturduğu bu içi sıvı dolu küreye, blastosist denir. Blastomerler periferik bir tabaka (trofoblast) şeklinde düzenlenirler. Bu tabaka iç hücre kitlesi denen bir hücre topluluğunun blastosist boşluğuna doğru çıkıntı yaptığı noktada kalınlaşmıştır. Gelişimin bu evresi ovulasyondan sonraki yaklaşık 4 ya da 5'inci günlere rastlar. Blastosist uterus lümeninde bir ya da iki gün kalır. Burada endometriyum salgısı içinde endometriyum yüzeyiyle temas eder. Blastosist evresinde, zona pellusida giderek incelik ve daha sonra kaybolur. Bu sayede mukozayı delme kapasitesine sahip trofoblastların endometriyuma doğrudan temas etmesine olanak sağlar. Bundan hemen sonra trofoblast hücreleri hızlı bir şekilde çoğalmaya başlayarak, endometriyumun da yardımıyla embriyonun beslenmesini sağlar. Bu evre esnasında embriyo iç hücre kitlesi hafifçe büyür (Ross ve Pawlina 2014, Kierszenbaum 2006).

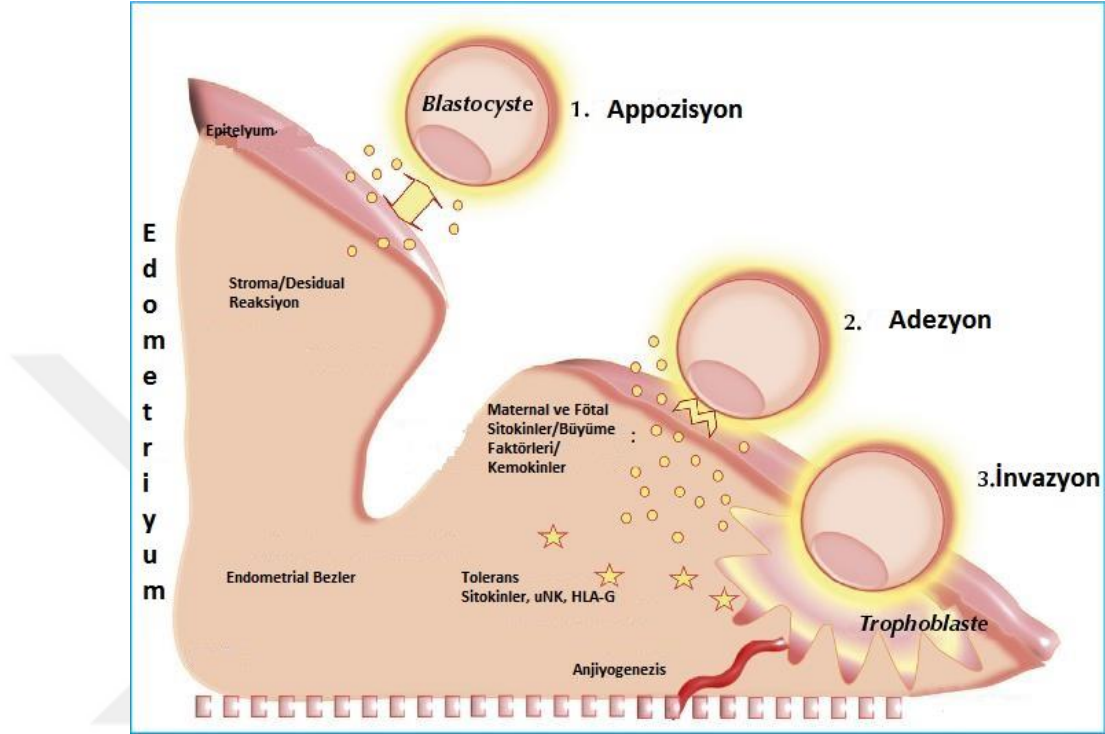
Blastosist evresindeki embriyo, dölllenmeden sonraki 5-7. günler arasında uterusu gelir. Zona pelusidasından kurtulmuş olan blastosist, embriyoblastların

bulunduğu bölgeden endometriyuma yaklaşır (*apozisyon evresi*), blastosist endometriyumun glandüler epiteline yapışır (*adhezyon evresi*) ve son olarak da endometriyuma yapışan blastosist endometriyum içine doğru ilerler (*invazyon evresi*) (**şekil 4.3.1**).

İmplantasyon, insan endometriyum dokusuna özel bir süreçtir ve endometriyum 'implantasyon penceresi' olarak adlandırılan zaman dilimi içinde embriyoyu kabul eder (Staun-Ram ve Shalev 2005). İmplantasyon penceresi östrojen ve progesteronun endometriyum üzerine programlanmış etkisidir. İnsanda implantasyon penceresi LH'nin ani artışından 6 gün sonra başlar ve 10. günde tamamlanır (Ross ve Pawlina 2014). İmplantasyonun başarılı olması sağlıklı bir gebeliğin başlangıcıdır. Bu dönemde blastosistte ve endometriyumda ayrı ayrı meydana gelen birtakım genetik ve genetik olmayan değişiklikler ve birbirleriyle olan iletişim sonucunda implantasyon meydana gelir. Gerek embriyo hücreleri kendi aralarında, gerek endometriyum bez ve stromal hücreleri kendi aralarında, gerekse embriyo-endometriyum hücreleri birbirleriyle endokrin, parakrin ve otokrin ürünlerle haberleşme halindedir. Bu ürünlerin bazıları steroid hormonlar, insan koryonik gonadotropin (hCG), büyüme faktörleri, sitokinler, yapışmayı sağlayan moleküller, hücre dışı matriks proteinleri ve prostaglandinlerdir (Dey ve ark. 2004).

İmplantasyon döneminde endometriyumda meydana gelen en önemli hücresel değişiklik lümen epitel hücrelerinin pinopod denilen yapılara dönüşmesidir. Pinopodlar, yüzey epitelinde sadece 1-2 gün süreyle uzayan yapılar olup yüzeylerinde Musin-1 (MUC-1) molekülü bulunmaktadır. MUC-1, blastosistin adezyonunu engeleyen bir moleküldür ve implantasyon bölgesinde MUC-1'in bulunmadığı ancak adezyonda önemli rol oynayan laminin, kollajen IV, fibronektin, integrin gibi adezyon moleküllerinin miktarının arttığı, dönüştürücü büyüme faktörü α (TGF- α), kollajen IV, IL-11 ve tümör nekrozis faktör α (TNF- α)'nın ise invazyon sırasında fonksiyon gösterdiği bildirilmektedir. Stroma da ise damarların artması ve geçirgenlikteki artışa bağlı olarak ödem ve desidual tepkime meydana gelir. Desidual tepkime, endometriyumun her yerinde meydana gelir ve çoğalan stromal fibroblastların bir farklılaşmasıdır. Desidual tepkime östradiyol ve progesteron ile önceden hazırlanmış endometriyumun blastokist tarafından uyarılması ile meydana gelir. Desidua oluşumu CO₂, prostaglandinler-PGF2 α , PGE2, histamin gibi kimyasal

ve fiziksel uyarılar ile de meydana gelebilir. Desidual hücreler glikojen, alkalin fosfataz, α -aktin, prolaktin ve büyüme faktörlerini üretirler. Bu maddeler trofoblastların çoğalması ve farklılaşması için önemlidirler (Aplin ve ark. 2001; Giray 2001).



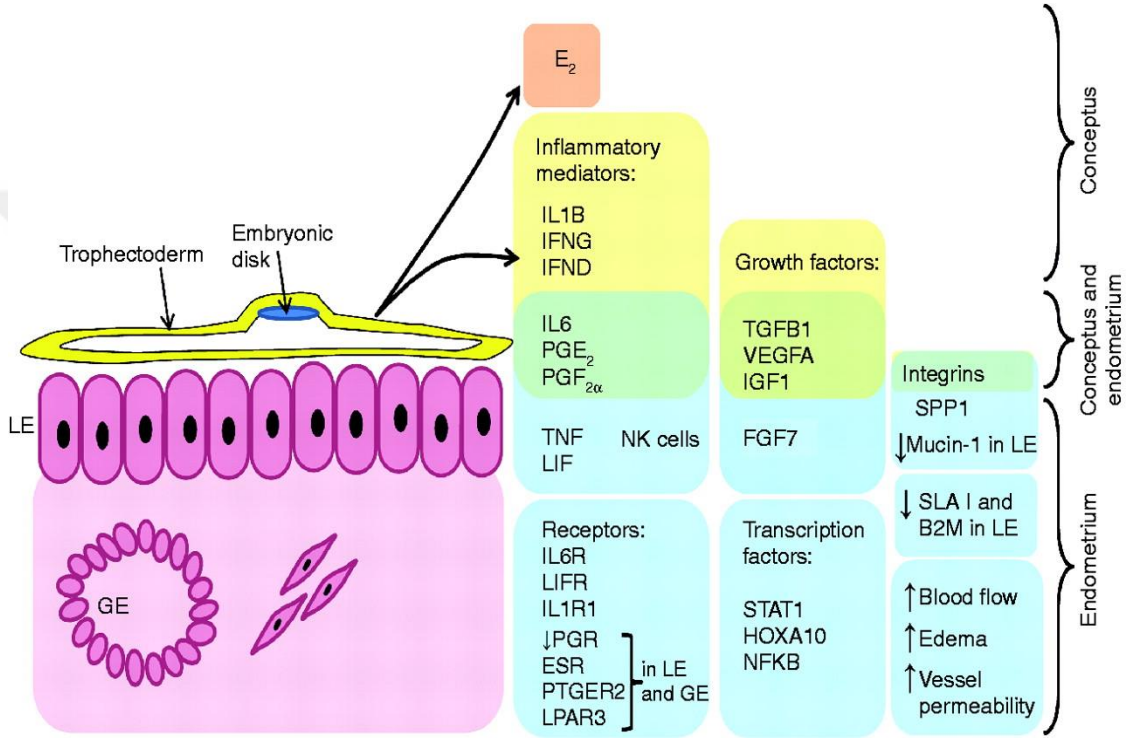
Şekil 4.3.1. İmplantasyon aşamaları (<http://www.jle.com/en/revues>, Erişim: 24.01.2018).

4.3.1. İmplantasyonun Sinyalleşme Olayları

Blastosist ve LE arasındaki sinyalleşme, hücrelerden salınan moleküller yoluyla ortaya çıkabileceği gibi, membrana bağlı sinyal molekülleriyle de ortaya çıkabilir. 1994'te yapılan bir çalışmada, fare endometriyumunun yüzey epiteline blastosistin bağlanmasından hemen önce Heparin Binding-Epidermal Growth Factor (HB-EGF) salgılandığı gösterilmiştir. HB-EGF, progesteron ve östrojen kontrolü altındaki stroma tarafından eksprese edilir. HB-EGF, hücre çoğalmasında östrojenin etkilerine medyatör olarak rol alır. Gebeliğin 2. ve 3. günlerinde LE'de HB-EGF eksprese edecek mRNA bulunmaz ancak, olasılıkla blastosist bağlanma zamanından 6-7 saat önce, LE'in apikalinde blastosiste komşu bölgede eksprese edilir (Paria ve ark. 2000, Kimber 2000).

Prostaglandin ve prostasiklin (PGI-2) sentezinde önemli bir enzim olan siklooksijenaz 2 (Cox-2) erken implantasyonun gerçekleşmesindeki olaylar için gerekli bir dizi sinyalleşmenin merkezi olarak görünmektedir. Cox-2 eksik dişilerde,

ovulasyon, döllenme hataları ve implantasyon yetersizliklerini de içine alan çoklu üreme başarısızlıklarına rastlanmaktadır (Chakraborty ve ark. 1996). Cox-2' den olmadığı dişilere, PGI-2 ilavesi, desidual tepkinin ve implantasyonun gerçekleşmesinde çok etkili olmuştur. Bu durumda PGI-2'nin; önemli bir Cox-2 ürünü olduğu, uterin stromal değişikliklerin meydana gelerek implantasyon sağladığı ileri sürülebilir. PGI-2'nin implantasyondaki esas rolü, desidual tepkimenin bir özelliği olan artmış vasküler geçirgenliği sağlamak olabilir (Paria ve ark. 2000).



Şekil 4.3.1.1. İmplantasyonun moleküler düzenlenmesi (<http://www.reproduction-online.org>, Erişim: 23.05.2018).

İmplantasyondan LE'de bazı değişiklikler meydana gelir. İmplantasyon anında LE hücrelerinin polaritesi, apikal membrandaki bazolateral markerların ortaya çıkması ile ortadan kaybolur. Hücreler daha yassılaştır ve mikrovillus sayısı azalır. Birçok türde mikrovillusların yerini pinopodlar almaya başlar. Bazal membran kalınlığıda oldukça fazla inceler. Hücre yüzeyi moleküllerinin apikolateral dağılımında değişiklikler meydana gelir. İnsanlarda LE'nin yeniden organizasyonu diğer memelilerdekine ek unsurları içerir. Ovulasyondan yaklaşık 6 gün sonra LE hücrelerin mikrovillusları yerlerini pinopodlara bırakırlar. Tekrarlayan biyopsileri çalışmalarında, pinopodların kadınlarda 48 saatten daha az sürede ortadan

kayboldukları ortaya konulmuştur. Menstrüel siklusun 20 ve 22. günleri arasında pinopodlar değişir ve bireye özgü hale gelir. İnsanda bu durum beklenen alıcılık penceresi ile uyum göstermektedir. Ayrıca, pinopodları taşıyan hücre kümelerinin hücre katmanında buldukları yere yapışarak yerleştikleri kaydedilmiştir. Bundan dolayı bu tür pinopodlar insan embriyoları için önemli tutunma alanları oluştururlar (Bentin-Ley ve ark 1999). İnsanda uterus LE hücrelerinin E-kadherin, 6, 1 ve 4 integrin gibi bazı bazolateral adezyon molekül serilerinin embriyonun tutunmasını için apikaldan eksprese ettikleri bilinmektedir (Duc- Goiran ve ark. 1999). Bu hücre serilerinin yapışkanlıklarına Muc-1 gibi bazı anti-adeziv faktörlerin azaltılması katkıda bulunabilir (Susan 2000).

4.3.1.1. İntegrinler

Kalsiyum bağımlı hücre ile hücreler arası madde bağlantısını sağlayan transmembran glikoproteinleridir. α ve β olmak üzere iki alt birimden oluşan heterodimer yapısındadırlar. Farklı 18 adet α ve 8 adet β biriminin farklı birliktelikleri sonucu 29 adet integrin ortaya çıkmıştır (Reel ve ark. 2010). Endometriyumun desidual ve ekstrasitotrofoblast hücrelerinden eksprese edilen adeziv molekülleridir. Bunlar, hem hücre dışı matriks (bazal lamina) bileşenleri arasındaki adezyonda hemde hücrelerarası adezyonda rol alırlar. LE kaynaklı integrinlerin luteal safhanın yarısında implantasyon penceresini çevreler ve desidual integrinler oluşur oluşmaz bir üst regülasyona geçerler. İntegrin alt üniteleri LE'den siklusun luteal safhasında eksprese edilmektedir. Alt uniti siklusun 20. gününde ortaya çıkmakta ve implantasyon tamamlandığında subunitleri ile bir arada bulunurlar. Bu yönüyle implantasyon penceresi için ideal bir belirteçtir. Beş ve birinci alt unitleri de mevcut olup hem heterodimer topluluğunu harekete geçirir hemde integrini, RGD (glisin, arjinin ve aspartik asitten oluşan 3 amino asitlik peptit) serilerine bağlanmakta ve trofoblastı LE'e tutturmak için hücre-hücre etkileşimlerini başlatmaktadır. Beş (V) dimeri aynı zamanda uterus epitelinde ve trofoblastta bulunmaktadır. Böylece zincirleme etkileşimler sayesinde embriyonun uterusu sabitlenir. Trofoblastlardan eksprese edilen fibronektin ve vitronektin endometriyal integrinlerle etkileşim kurar. Fakat ekspresyonu önemli büyüme faktörlerine bağlıdır (Merviel ve ark. 2001): Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF) 'ü azaltır, Interlökin-1, 6 (IL-1, 6) ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) ekspresyonunu artırır. Epidermal

Büyüme Faktörü (EGF) ekspresyonunu artırmaktadır (Duc- Goiran ve ark. 1999; Merviel ve ark. 2001; Tabibzadeh 1992). Desidual stromal hücreler tarafından eksprese edilen TGF, metalloproteinaz doku inhibitörünü arttırarak trofoblastın toplam jelatinolitik aktivitesini inhibisyona uğratır. Bu sebeple de trofoblast invazyonunda düzenleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir. IL-1 ve IL-6 sitokinler, trofoblastlar tarafından sentez edilen laminin ve kollajen reseptörlerinin ($\beta 1$ ve $\beta 2$) eksprese edilmeleri için uyarı verir. Bu sitokinler trofoblast hücreleri tarafından kendileri için de sentezlenir ve kendi ekspresyonlarını indüklemek için otokrin veya parakrin hareket ettikleri bildirilir. Östrojen, progesteron ve hCG gibi hormonlar IL-1 ve IL-2 ekspresyonunda, genel olarak negatif modülasyon sergiler. IL-1 ve IL-2, trofoblast hücrelerinin çoğalma, invazyon ve farklılaşmasında önemli rol oynadıklarından, trofoblast fonksiyonları için kilit faktör olabilirler (Das ve ark 2002; Duc- Goiran ve ark. 1999). Embriyonun endometriyuma tutunduğu aşamada, buradaki yeni integrin subunitleri, blastosistin implantasyon için gerekli kapasiteye kavuşmuş olduğunun göstergesi kabul edilir. Laminine bağlanan integrin alt unitleri, implantasyonun sürdüğü esnada endometriyal epitelin bazal membranında bulunmaktadır. Aynı şekilde endometriyumda eksprese edilmekte ve trofoblastik fibronektine bağlanmaktadır (Merviel ve ark. 2001; Tabibzadeh 1992). İnsanlarda yapılan bir çalışmada, in vitro fertilizasyon (IVF) tedavisi görmekte olan kadınlardan embriyo transferinin yapılacağı gün olarak koryonik gonadotropin hormonu (hCG) verilisinden 5 gün sonra alınan endometriyum biyopsileri ve gönüllüler tarafından verilen blastosistlerde qRT-PCR ile adezyon molekülleri ve hücrelerarası madde bileşenlerinin gen analizi incelenmiştir. qRT-PCR sonucu adezyon moleküllerinden olan integrinin, αE alt biriminin trofoblast hücrelerinde $\alpha 9$, αV , $\beta 1$ ve $\beta 8'$ in ise endometriyum epitel hücrelerinde sentezlendiği belirtilmiş ve ayrıca bu çalışmada kullanılan endometriyum ve blastosist ayrı ayrı analiz edilmiştir. Embriyo-endometriyum etkileşimi, etik sorunlardan dolayı insanlarda incelenemediğinden bu genlerin varlığı insanlarda implantasyon sırasındaki rollerini açıklamakta yetersiz kalmaktadır (Haouzi ve ark. 2011). Gestasyonun 3, 4 ve 5. günlerinde sıçanlardan alınan embriyolarda integrin $\beta 3$ sentezinin morula safhasından blastosist aşamasına doğru artmış olduğu, özellikle trofoblast hücrelerinde ve iç hücre kitlesinde yoğun olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca Ishikawa hücreleri ile kültüre edildiğinde apikal

hücrelerde integrin $\beta 3'$ e rastlanırken, bazal hücrelerde görülmemiştir. Sıçanlardan elde edilen embriyoların bir kısmı Ishikawa hücreleri ile kültüre edildiklerinde blastosistin bu hücelere tutunduğu ve trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında görülen integrin $\beta 3'$ ün membranda yer aldığı, sadece kültür kabına bırakılan blastosistlerde ise integrin $\beta 3$ dağılımının sitoplazmada devam ettiği izlenmiştir. İntegrin $\beta 3'$ ün sitoplazmadan hücre membranına yönelimin, embriyo ve endometriyum arasında bir parakrin etkileşim sonucu olduğunun kanıtı olmaktadır (Kaneko ve ark. 2011).

4.3.1.2. Kaderinler

Kaderinler Ca^{2+} bağımlı birer transmembran glikoproteinleridir (Stemmler 2008). Hücre-hücre arasında homotipik veya heterotipik bağlanma yaparlar. Kaderin süper ailesinin şimdiye kadar belirlenen birkaç alt grubu mevcuttur. Bunlar klasik (tip I) kaderinler, tip II kaderinler, dezmozomal kaderinler ve protokaderinler. Hücre dışı, transmembran ve hücre içi olmak üzere üç bölgesi bulunan kaderinler üç adet sitoplazmik proteinle ilişkilidir: α -katenin, β -katenin ve γ - katenin. Kaderinler buldukları dokuyla ilişkili isimlendirilir. Epitel hücrelerinde E-kaderin, plasentada P-kaderin, endotel hücrelerinde V-kaderin, nöral dokularda ve kasta N-kaderinler ve kalp kasında H-kaderinler bulunmaktadır (Dai ve ark. 2002; Tsuchiya ve ark. 2006). E-kaderin geni susturulmuş farelerde hasarlı preimplantasyon embriyo gelişimi ve implantasyon başarısızlığı görülmüştür (Larue ve ark. 1994; Riethmacher ve ark. 1995). β -katenin, fare blastosistlerinde hücre-hücre etkileşim alanlarında sentezlenmektedir. Endometriyumda E-kaderin, epitel hücrelerinin lateral bölgesinde hücre membranında yerleşir ve bu durum hücre-hücre bağlantı komplekslerinde önemli role sahiptir (Poncelet ve ark. 2002).

4.3.1.3. Trofinin-Tastin-Bystin Kompleksi

Esas olarak trofinin membran proteinlerindedir. İnsan trofoblast hücreleri ile endometriyum hücreleri arasındaki hemofilik hücre adezyonunun medyatörüdür. Trofinin, adezyondaki aktifliği sağlamak için bystin yardımıyla sitoplazmik bir protein olan tastine bağlanarak kompleks bir yapı oluşturur. Trofinin ve tastin, insan LE'in erken sekretuar safhasında, apikal yüzeyde açığa çıkmaktadırlar. Sekretuar periyodun ortasında da hızla ortadan kaybolur. İmplantasyon alanında, trofininin, TE

ve LE'in karşıt apikal yüzeylerinde açığa çıktığı görülmektedir (Susan 2000; Fukuda ve Sugihara 2012).

4.3.1.4. Heparan sülfat proteoglikan (HSPG)

Heparan sülfat proteoglikan, LE'e embriyonun tutunmasında rol oynayan bir diğer faktördür. HSPG'nin bazal membran şekli perlecan, inkübasyonun ardından blastosistin etrafını çevreleyerek mRNA ve proteininin eksprese edilmesi blastokistin bağlanma yeterliliğini kazanması ile uyumludur. Böylece HSPG, TE'i LE'e bağlayan destekleme ligandı olarak işlevini gerçekleştirir. Fare embriyoları HSPG'la ilişkili proteinlere tutunabilmektedir (Carson ve ark 1993; Chen ve ark 2008).

4.3.1.5 Musin-1 ve Musin-4 (MUC-1, MUC-4)

Muc1, üreme sistemi epitelinin yüzeyinde bulunan bir transmembran musin glikoproteinidir ve hücre yüzeyinin mikroorganizmalardan, degradatif enzimlerden korunmasında rol oynar. Ayrıca hem normal hem de malign koşullarda hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerinde inhibitör olarak görev yapar (Brayman ve ark 2004). Ayrıca Muc-1 gibi aşırı glikozilatlı musinler LE'de maskeleyiş işlevi görürler. LE'deki Muc-1'in standartların altındaki blastokistlerin yapışmasını önleyen seçici bir bariyer olduğu tahmin ediliyor. Sıçanlarda diğer musin olan Muc-4'tür. İmplantasyon zamanında gözden kaybolur. Muc-4 prereseptif LE'deki bağlanmayı engellemeye yönelik bariyer işlevine benzeyen bir fonksiyona sahiptir. Muc-1 ve Muc-4 ovaryum hormonlarının kontrolü altında açığa çıkmaktadırlar (Chervenak ve Illsley 1998; Meseguer ve ark 1998).

İnsanlarda Muc-1 ekspresyonu embriyonun tutunduğı bölgede ve altındaki epitelyum hücrelerinde bulunmaz iken komşu hücrelerde ekspresyonu devam etmektedir. Bunun sebebinin Muc-1'in antiadheziv etkisinin azalması sonucu uterus epiteli ile blastokistin başarılı implantasyonunu sağlamak olduğu düşünülmektedir. Fare, rat ve domuz gibi bazı memelilerde ise, insanların aksine, blastokist implantasyonu süresince uterus epitelinin apikal yüzeyinde Muc-1 ekspresyonunun azalarak devam ettiği gösterilmiştir (Paszkievicz-Gadek ve ark 2008).

4.3.1.6. Selektinler

➤ **L- Selektin;** Selektinler diğer adezyon moleküllerinden farklı olarak protein-protein şeklinde bağlanma özelliğiyle karbonhidratlara bağlanabilir ve karbonhidratlı

proteinler olarak işlev görürler. Selektinlerin ligandları ise heterotipik olarak bağlanma gösterdikleri sialil lewis^x (sLe^x) ve sialil lewis^a (sLe^a) gibi fukosilize ve sialilize glikoproteinlerdir. Platelet selektin (P-selektin), Lökosit selektin (L-selektin), Endotelyal selektin (E-selektin) gibi üzerinde buldukları hücre tipine göre isimlendirilirler (Terekeci ve ark. 2008). İnsanda L-selektinin trofoblast hücreleri tarafından oluşturulduğu ve annenin endometriyum epitel yüzeyindeki oligosakkarit ligandlarına bağlandığı bildirilmektedir (Genbacev ve ark. 2003). Blastosist uterusu geldiğinde, endometriyum yüzeyi glikokaliks ile örtülüdür. Blastosist burada MUC-1 tarafından taşınan L-selektin ligandına zayıf bağlanma gösterir ve endometriyum epiteli üzerinde yuvarlanma hareketi yapar. Yuvarlanma hareketi sırasında insan blastosistinden hCG ve birçok faktörler salgılanarak endometriyum epiteli tropinin üretmek üzere uyarılır. Blastosistin bağlandığı bölgede pinopodlarda MUC-1 sentezi azalır ve trofoektoderm ile endometriyal epitel arasında tropinin-tropinin bağlantısıyla güçlü bir iletişim oluşturulur (Aplin ve ark. 2001). Yine L-selektin ligandlarından MUC-1 molekülü ile ilişkili sLex'in endometriyum yüzey epitelinde ve bez epitel hücrelerinde lokalize olduğu, implantasyon penceresi sırasında ise miktarında artış gözlenmiştir (Hey ve Aplin 1996; Red-Horse ve ark. 2004; Lai ve ark. 2005). Ligand miktarındaki artış implantasyon başarısı ile ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark. 2008).

4.3.1.7. Sitokinler

➤ **Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α);** TNF- α , üreme organları, preimplantasyon embriyoları ve endometriyum gibi çeşitli dokularda eksprese olan çok yönlü sitokinlerdendir. Endometriyumda fibroblastlar, immunkomponent hücreler, glandular epitelyal hücreler ve vasküler hücreler gibi TNF- α eksprese eden çeşitli hücre tipleri mevcuttur (Ross ve Pawlina 2014). TNF- α , pre- ve periimplantasyonda yüksek derecede eksprese olmasına karşın gebelik esnasında limitli eksprese olmaktadır. İnsan, fare ve ratlarda TNF- α 'nın yüksek ekspresyonu, aynı zamanda meydana gelen yavru sayısını azaltır veya implantasyonu engeller (Sanford ve ark 1992).

➤ **Lösemi İnhibitör Faktör (LIF);** LIF bir IL-6 tipi sitokini olup, farelerde implantasyon için kritik olduğu gösterilmiş birçok sitokinden birisidir. LIF mRNA ve proteini, blastokist implantasyonundan hemen önce murin endometriyal glandular

epitelde maksimum seviyede eksprese edilir. Aynı şekilde kadınlarda LIF, uterusun blastokist implantasyonuna uygun hale geldiği sekreteruar fazın ortalarında luminal ve glandular epitelde yüksek seviyede eksprese olur Gebelik boyunca ise LIF mRNA ve proteini ilk trimesterde desidualda eksprese edilir (Shuya ve ark 2011). LIF'in sitotrofoblastlarda fibronektin sentezini arttırarak ve hCG sentezini azaltarak trofoblastların fenotipini daha invazif olma yönünde değiştirdiği gösterilmiştir (Suman ve ark. 2013; Salleh ve Giribabu 2014).

4.3.1.8. Büyüme Faktörler

➤ **Heparin Bağlayıcı-Epidermal Büyüme Faktörü (HBEGF);** İmplantasyon zamanında kritik olarak görev alan faktörlerden biri de HB-EGF'dir. HB-EGF tarafından düzenlenen çok çeşitli hücrel aktivitenin plasental dokuların oluşması gibi embriyonik gelişimde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Stromal hücrelerdeki HB-EGF regülasyonu, desidualizasyon için uterusun hazırlanmasında temel rol oynayabileceğini göstermektedir (Jessmon ve ark 2009).

➤ **Dönüştürücü Büyüme Faktörü- α (TGF- α);** EGF'e benzer şekilde proliferasyon, migrasyon, farklılaşma ve hücrelerin remodelinginde rol oynar. Fonksiyonunu EGF reseptörüne bağlanarak gerçekleştirir. TGF- α 'nın implantasyonda ve desidualizasyonda rolü olduğu bilinmektedir (Tamada ve ark 1997). Blastosist şekillenmesinde TGF- β 1, hücreler arasında sıkı bağlantıların kurulması ve trofoektoderm hücrelerinin farklılaşmasında rol oynar (Bulgurcuoğlu ve ark. 2003).

4.3.1.9. Embriyodan Salınan Sinyaller

Erken hamilelik faktörü (EPF), preimplantasyon faktörü (PIF), trombosit aktive edici faktör (PAF), büyüme faktörleri, interferon gama ve insan koryonik gonadotropin (IFN γ , hCG) ve prostaglandin embriyodan salınan ve implantasyonu etkileyen faktörlerdendir. EPF, büyüme ve immün düzenleyici özellikte, embriyonik yaşamın devamı ve büyümesi için gereklidir. İnsanda erken gebelik faktörü, maternal serum, fetal serum, amniyotik serum ve plasental atıklarda ve idrarda tespit edilmiştir (Özbek ve ark. 2013). PIF ise preimplantasyon evresindeki embriyolarda üretilmektedir (Rosario ve ark. 2005). Antijenik stimülasyon sonucu bazofillerden salınan PAF farelerde fertilizasyondan kısa bir süre sonra varolan geçici

trombositopeniden sorumludur (O'Neill 2005). IFN γ normal insan uterin endometriyumunda immun yanıtın oluşması, büyümesi ve farklılaşmasında rol oynarken, hCG, progesteron ve östrojen varlığında desidualizasyonun devamından sorumludur (Kodaman ve Taylor 2004).

4.4. RATLARDA DIŞI ÜREME SİSTEMİ

Sıçanlarda, dışi genital sistemi oositin tutulduğu ve embriyoların geliştiği bölge olması gibi genel özellikleri bakımından insandakine benzemekle birlikte farklılıklar görülmektedir. Sıçanların sağ ve solda olmak üzere iki ayrı uterusları vardır. Her iki uterus da kan damarları bakımından çok zengindir. Dolayısıyla mevcut yapı sıçanların bir batında çok sayıda yavru doğurabilmesine olanak sağlamaktadır (Dilsiz 2008).

Üretral ve vajinal açıklıkları ayrıdır. Vajinayı kapatan membran pubertede yok olur. İki ayrı uterus kaudal tarafta birleşir ve vajinaya iki farklı serviksle açılır. Vesicae urinaria ve rektum ile komşulukları vardır. Kranial kısımda ovaryumlar bulunmaktadır (Dilsiz 2008). Sıçanda ovaryumlar böbreklerin arka yüzünde bir dizi folikül kitlesi şeklinde izlenmektedir. Erişkin gebe olmayan sıçanda genellikle ovaryumlar iyi gelişmiştir. Tuba uterinalar ise küçük oldukça sıkı kıvrılmış tübüler yapılar olup ovaryumlardan uterusu doğru bilateral olarak uzanan yapılardır (Dilsiz 2008).

4.4.1. Ratlarda Uterus Yapısı

Uterus endometriyumunu döşeyen epitel kemirgen türlerinde yalancı çok katlı prizmatik epitel olup lamina propriyada gevşek bağ dokusu içinde artmış nötrofil ve lenfosit yoğunluğu belirgindir. Hemen altında ise lamina submukoza ile devam eder. Endometriyum bezlerini tunika submukoza içindeki lamina propriyasına yerleşmiş basit ya da dallı tübüler bezlerdir. Kemirgenlerdeki endometriyumda bezler yer almaz ve son derece vaskülerdir. Miyometriyum uterusun tunika muskularisini oluşturmaktadır. Kalın iç sirküler tabaka ile dış longitudinal düz kas katmanından meydana gelmiştir. İç ve dış kas katmanları arasında ise büyük kan damarları yer almaktadır. Perimetriyum, gevşek düzensiz bağ dokusu yapısındadır ve çok sayıda lenfatik damar içeriği de belirgindir. Uterusun her iki kornusu yan yana gelerek vajinayı oluşturmak üzere birleşirler. Ancak her bir uterusun kendi serviks yapısını

oluşturduğu bilinmektedir. Her bir serviksin duvarları kalın kas yapısı şeklindedir. Serviksin açıklığı oldukça küçük olmakla beraber doğuma izin verecek şekilde genişleyebilme özelliği gösterir (Dilsiz 2008).

Rodentlerde desidual endometriyum beş farklı bölge içermektedir: 1- Bazal bölge, 2- Kapsül, 3- Antimezometriyal desiduama, 4- Mezometriyal desiduama ve 5- Glikojenik bölge. Ratlarda gebeliğin erken dönemlerinde meydana gelen desidualizasyon ve implantasyon, uterusun antimezometriyal bölgesinde özellikle primer desidual bölgede gerçekleşir. Antimezometriyal desidua bölgesinin iç tabakası embriyoyu saran yassı hücrelerden, ara tabakası poligonal hücrelerden, miyometriyuma komşuluğundaki dış tabakası ise predesidual hücrelerden oluşmaktadır (Özcan 2010).

4.4.2. Ratlarda Hormonal Düzenleme ve Siklus Tayini

İnsanlarda menstrual siklus olarak adlandırılan üreme döngüsü kemirgenlerde östrus siklusu olarak adlandırılmaktadır. Yaklaşık 4-5 gün süren östrus siklusu kısa olmasından dolayı üreme döngüsü süresince meydana gelen değişiklikleri araştırmak için bu hayvanların tercih edilmesini sağlamıştır (Caligioni 2009; Dixon ve ark. 2014).

Östrus siklusunun evrelerini belirlemek için vajinal smear sitolojisini incelemek en çok kullanılan yöntemdir. Vajinal sekresyonlar 10 µl. serum fizyolojik içeren plastik pipetin sıçan vajenine yerleştirilerek sıvının önce içeriye enjekte edilmesi sonra geri alınması yoluyla elde edilebilir. Nemlendirilmiş pamuk uçlu swab yardımıyla da vajinal örnek alınabilir. Kullanılan bir diğer yöntem de klasik yayma çubukları ile vajinal materyal alınmasıdır. Alınan sürüntüler cam lama yayılarak %95'lik alkol ile tespit edildikten sonra Giemsa, Toluidin mavisi, Papanicolaou, Hematoksilen-Eozin veya Diff-Quick yöntemleri ile boyaması yapılarak ışık mikroskobu altında incelenir (Dilsiz 2008). Her bir evrenin özelliği vajinal smearda incelenen epitelyal hücreler, kornifiye hücreler ve lökositler arasındaki orana dayanmaktadır. Buna göre proöstrus, östrus, metaöstrus ve diöstrus olarak 4 evreden oluşur (Marcondes ve ark. 2002). Vajinal smeara göre proöstrus 12, östrus 12-14, metöstrus 21 saat ve diöstrus evresi 57 saat sürer (Rişvanli ve ark. 2003).

Östrous siklusu süresince prolaktin, LH ve FSH düşük seviyededir ve proöstrus evresinin ortasından sonra artmaya başlar. Proöstrus sırasında östrojen seviyesi artar

ve ovaryum follikülleri hızlı bir şekilde büyür. Ovulasyon LH artışından sonra östrus evresinde meydana gelir. LH atımlı (pulsatile) salınır ve en yükseğe proöstrusta, en düşüğe de östrusta gelir. LH atımı (pulse) gonodotropin-releasing hormon (GnRH) salınımının yüksekliğine bağlıdır. LH dalgaları proöstrustaki preovulatuvar folliküllerde (preovulatör follikül 0,9-1,0 mm çapında) ovulasyonun gerçekleşmesine ve korpus luteum şekillenmesine sebep olur. İki farklı preovulatuvar FSH dalgası mevcuttur. Birinci dalga LH dalgası ile ilgiliyken, ikinci dalga ovulasyon sonrası inhibindeki düşüşle ilişkilidir. Progesteron salınımı da metöstrus ve diöstrus evrelerinde artar, diöstrus evresinden sonra azalır. Daha sonra progesteron değeri ikinci en yüksek seviyesine proöstrus evresinin sonunda gelir. Bu hormonal etki proöstrus ve östrus fazında folikül gelişimini, östrus fazının hemen hemen ortasında ovulasyonu, metöstrus fazında korpus luteum oluşumunu gerçekleştirir. Diöstrus fazında dinlenme fazıdır (Marcondes ve ark. 2002; Paccola ve ark. 2013).

4.4.3.Vajinal Sitoloji

➤ **Proöstrus;** Vajinal yaymalarda, erken proöstrusta daha az mukus ile daha temiz bir görünüm yer alır. İntermediyer hücreler kadar parabazal hücreler de daha belirgin izlenir. Ancak ortamda hala hücre debrisı vardır. Proöstrusta ise yaymanın rengi daha açık ve mukus daha nadir izlenmektedir. Hücreler predominant olarak intermediyer hücreler şeklindedir ve parabazal hücreler nadirdir. Lökositlere neredeyse hiç rastlanamaz (Dilsiz 2008).

➤ **Östrus;** östrüs siklusu süresince histolojik olarak bakıldığında; proöstrustan östrusa geçişte, yayma bu dönemde temiz ve hücreler ile doludur. Hücre içeriğinde intermediyer hücreler, yüzeysel hücreler ve çekirdeksiz (keratinize) hücreler vardır. Östrusta yaymanın neredeyse tamamı erken östrusa hakim olan keratinize yüzeysel hücrelerden oluşmaktadır. Östrus ilerledikçe gruplar oluştururlar. Nadir de olsa sağlam nukleusları olan birkaç intermediyer hücreye rastlanılabilir (Dilsiz 2008). Ayrıca yüzey epitelinde proliferasyon olmaz ancak hücre boyutu en yüksek seviyede seyrettiğinden epitelde kalınlaşma görülmektedir. Bazı yerlerde epitelin yalancı çok katlı olarak izlenir. Apoptotik indeks bu evrede artar. Uterus kavitesi iyice genişler ve sıvı birikimi artar. Yüzey epitelindeki bu değişiklikler embriyonun implante olmasını sağlar (Sözen 2008; Dixon ve ark. 2014).

➤ **Metöstrus;** Siklusun bu evresindeki görünüm sıklıkla çok sayıdaki lökositlerin ve intermediyer hücrelerin hâkimiyetindedir. Bu evre ilerledikçe daha çok intermediyer hücre ortaya çıkar. Bunlar genellikle koyu renkli ve küçüktür. Parabazal hücrelere hala rastlanılabilmektedir. Ayrıca büyük intermediyer hücreler ve lökositler de varlığını sürdürmektedir (Dilsiz 2008).

➤ **Diöstrus;** Çok az alınabilen vajinal materyal vardır ve özellikle hücresel debris ile birlikte salgı materyalinin kalıntılarını içerir. Bazı parabazal ve intermediyer hücreler izlenebilir. Genellikle eğer saptanabilirse az sayıda lökosit varlığına rastlanır (Dilsiz 2008).

4.4.4. Ratlarda İmplantasyon

Sıçanlar olgunluğa 2-4 ayda ulaşır. Üremeleri için optimal verimlilik süresi 9-10 aydır. Çiftleşmeden yaklaşık 30 dk. sonra vaginada vaginal plak oluşur. Vaginal plak gebelikle ilgili ilk bulgudur. Sertleşen plak 12 saatte atılır. Üreme siklusunun kısa olması deney süresi açısından avantaj sağlamaktadır. İnsanlarda 28 günde izlenen menstrüel döngü, ratlarda 4-5 günde gerçekleşir. Dolayısıyla sıçanlar ile yapılan birçok çalışma daha kısa zamanda tamamlanabilmektedir. Bu da çalışmalarda ratların tercih edildiği modellerin görülme sebebini oluşturur (Dilsiz 2008).

Sıçanlarda apozisyon, adezyon ve invazyonun 6 saatte meydana geldiği son derece hızlı bir implantasyon görülür. Zona pellusidanın kaybından sonra uterus lümeni blastosisti örter. Blastosist endometriyumun anti mezometriyal kenarına mezometriyal yönlendirmelerle iç hücre kitlesinin bulunduğu noktadan tutunur. Blastosist epitel tabakası ile ilişki kurduktan sonra blastosistin duvarındaki trofoblastik hücreler tarafından yapılan fagositozla epitelyal penetrasyon başlar. İç hücre kitlesinin mezometriyal yönlendirmesi blastosistin bir paket halinde desidual zona invaze olmasını sağlar. Primer desidual zonun farklılanmasıyla embriyonun büyümesi için trofoblast ile maternal kan sağlayan plasenta şekillenir.

Apozisyon, adezyon ve invazyonun hızlı olması yüzünden erken implantasyonun fiziksel mekanizmalarının anlaşılması için fare ve sıçanlar iyi bir aday değildir. Ancak, trofoblastik tutunmanın olmadığı durumlarda desidual cevap ortaya çıktığı ve gebe farelerde desidualizasyon bölgesi kolayca ayırt edilebildiğinden dolayı fare ve sıçanlarda desidualizasyon mekanizmasının çalışması için iyi bir modeldir (Lee and DeMayo, 2004).

4.5. KÖK HÜCRE

İnsanoğlunun var oluşundan günümüze kadar gelen hastalıkları yenme ve yaşlanmayı önleme çabaları şüana kadar tıbbın çekici gücü olmuştur. Sağlık ve biyoteknoloji alanında yeni bir çağın başlangıcındayız ve geçen on yıllarda hayal bile edilemeyen çok fazla tıbbi uygulama günümüz gelişmelerinde hayata geçmiş bir kısımda geçmek üzeredir. Bu uygulamalardan bugün yürürlükte olan ve yakın gelecekte etkisini daha çok gösterecek en dikkat çekici gelişmeler hücre ve hücrenel uygulamalar alanında olmaktadır. Araştırmaların sayısındaki ve neticesindeki olumlu gelişmeler tedavide kullanılabilir insan hücre çeşit ve kaynaklarına her gün bir yenisini eklemekte ve gittikçe artan talepler bu hücre ve dokulara olan ihtiyacı göstermektedir.

Kendini yenileme özelliğindeki kök hücreler (KH), vücutta ve laboratuvar ortamlarında, uygun uyaranlarla, birçok özelleşmiş hücre tipine dönüşebilmen hücreler olarak tanımlanmaktadır. Asıl önemli olan durum ise bu hücrelerin farklılaşmamış hücre formunda elde edilebilmeleridir. KH, “işlevsel olarak farklılaşmamış ve heterojen çoğalma potansiyeli olan” hücreler olarak tanımlanmaktadır. Başka tanımlara göre KH, bölünerek kendini yenileyen (self-renewal), sayılarını sürekli sabit tutatar özelleşmiş görevleri yerine getiren organları oluşturan ve farklılaşma yeteneği maksimum seviyede olan öncü hücredir (Weissman 2000).

4.5.1. Farklılaşma ve Plastisite Kapasitesi

KH'lerin bir vücut hücresi gibi belirli bir amaca yönelik farklılaşmamış olmaları önemli bir KH belirteci olsa da, belirli uyaranlarla diğer hücelere dönüşebilme yetenekleri bilimsel araştırmalar açısından daha çok dikkat çeker. Plastisite ya da Differansiyasyon bir hücrenin farklı hücelere dönüşebilme yeteneğine; değişik hücelere dönüşme potansiyelinde “Farklılaşma Kapasitesi” denilir. Farklılaşma; hücre iletişimlerinin sonucunda ortaya çıkan büyüme ve farklılaşma faktörlerinin, sitokinlerin birlikte etkisiyle geçirdikleri değişimi tanımlar. Farklılaşmadan önce Kh'ler devamlı bölünerek sayılarını artırmaya çalışırlar. Kendilerini yenileme olayıyla KH'lerin belirli bir sayıda sabit tutulmasına olanak tanınır. Kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahip KH'lerde iki farklı bölünme görülür;

➤ **Simetrik bölünme;** bu tip bölünmede hücreler köken aldıkları hücrenin bütün özelliklerine sahip iki yavru hücre meydana gelir. Bu bölünmeyle hücreler özelliklerini değiştirmeden sayılarını çoğaltırlar. KH havuzunu sabit tutabilmek için asimetrik bölünme gerekli olsada embriyonun gelişim sürecinde ve doku tamirinde gerekli olan yeni hücrelerin oluşabilmesi için simetrik bölünme de olmalıdır. Özellikle dokularda fonksiyonel harabiyet durumu ortaya çıktığında bu mekanizmayla öncü hücreler oluşturularak en kısa zamanda onarımının garantisi alınır. Bu sırada KH'ler de simetrik olarak bölünerek yeni KH'ler oluşturulur (Can 2014).

➤ **Asimetrik bölünme;** bölünme sonucu iki farklı hücre oluşur. Bu hücrelerden biri ana hücrenin tüm özelliklerini korumaya devam ederken, diğeri projenitör hücreyi meydana getirir. Projenitör hücre ard arda geçirdiği bölünmelerle terminal farklılaşmaya uğrar ve esas işlevsel olacak olgun hücreye farklanır. KH'lerin kendi kendilerine çoğalma veya farklılaşmalarında diğerkök hücreler ve farklanmamış hücreler arasındaki ilişki; sitokinler, ekstraselüler matriks bileşenleri, adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve mikroçevrenin fizyo-kimyasal koşulları (pH, iyonik ortam vb.) etkili olmaktadır. Farklanmayı uyaran etkenler kaldırılırsa, birçok hücrede bölünme döngüsü tekrar başlayabilir. İn vitro olarak KH'lerin belirlenmiş bir hücre hattında farklılaşmasına “yönlendirilmiş farklılaşma” adı verilir. Bu olayın gerçekleşmesi için ya hücrenin genetik programı değiştirilir ya da mikroçevresinin fiziksel ve kimyasal özellikleri değiştirilir. Bir KH'nin farklılaşması için dört alternatif yol vardır (Martin-Rendon ve Watt 2003).

Asimetrik bölünmede, hem intraselüler hem de ekstraselüler etkenler birlikte çok sıkı kontrol edilmesiyle sağlanır. Farklı nişlerdeki hücrelerin kaderleri de farklı olmaktadır. Mikroçevre kök hücrelerin sayısını, hücre dışı matriks bileşenleri, komşu hücreler ve eksprese edilen proteinlerle kontrol eder. Örneğin *Drosophila*'da overlerde KH'lerin bölünme ekseniniş tarafından belirlenir; mitoz mekiği nişedik açıyla şekillenir. Bu durum nişeyakın taraftaki hücrelerin, kök hücre özelliğini korurken uzaktakiler farklanmasına neden olur. Hücredeki asimetri, bazı protein gruplarının, organellerin ve RNA'nın yavru hücrelerden sadece birine aktarılmasıyla başarıya ulaşır. DNA'nın asimetrik dağıldığını bildiren çalışmalarda mevcuttur. Bölünmenin sonunda esas DNA, yavru hücrelerden birisine geçerken, prekürsör

hücreye dönüşecek olanda ise yeni DNA sentezi gerçekleşir. Bu mekanizma KH'ler, yeni sentezlenen DNA'da oluşacak mutasyonlardan korunmakta ve sahip olduğu genomu bozulmadan koruyabilmektedir. Özellikle doku işlevlerinin harabiyet durumlarında bu mekanizmayla kök hücrelerin öncü hücrelere dönüşerek kısa zamanda onarımı garanti altına alır (Can 2014).

Hücrelerin bölünme kapasiteleri kromozomların uç kısmında bulunan, telomer denilen DNA zincirleriyle belirlenir. Telomer ne kadar uzun olursa, hücreler o kadar çok sayıda bölünme geçirir. Bunu sağlayacak olanda telomeraza enziminin aktivitesidir. KH'lerde bu enzimin aktivitesi çok fazladır, bu sebeple çok sayıda bölünebilirler (Matur ve Solmaz 2011).

a. Transdeterminasyon: Özelleşmiş bir hücre oluşturmak için planlanmış bir öncü hücrenin başka bir öncü hücreye dönüşmesi ve o KH'ye ait serilerin oluşturulmasıdır.

b. Transdiferansiyasyon: Farklılaşmış hücrenin farklı bir dokuya ait farklılaşmış bir hücre fenotipini kazanmasıdır. Burada hücrenin gen ekspresyonu değişir ve tamamıyla farklı ekspresyonları hücre tipine dönüşür. Örneğin normal memeli gelişimi sırasında, özofagustaki düz kas ve çizgili kas formasyonu verilebilir. Düz kas hücreleri iskelet miyozitlerini oluşturması transdiferansiyasyona örneğidir (Patapoutian ve ark 1995). Patolojide metaplazi kavramı, bir transdiferansiyasyon modeli olarak kabul edilebilir. Metaplazide, bazı mide epitel hücreleri veya KH'leri bağırsak epitel hücrelerine dönüşür (intestinal metaplazi) (Matur ve Solmaz 2011).

c. Dediferansiyasyon (geriye farklılaştırma): Farklılaşmış bir hücrenin veya bir hücre grubuna farklılaşmak için planlanmış hücrenin, öncü formlarına giderek tamamen farklı bir hücreyi oluşturmak üzere başka kola kaymasına dediferansiyasyon denilir. Bu tipte bir farklılaşmaya, semenderlerde ekstremite amputasyonunun ardından kas hücrelerinin farklı hücreler farklılaşmaları örnek olarak verilebilir (Martin-Rendon ve Watt 2003). İn vitro olarak indüklenmiş pluripotent kök hücreler bu yöntemle elde edilir. Bunun için viral plazmid gibi vektörler kullanılır. Somatik hücrelere, viral veya non-viral vektörler kullanılarak Oct3/4, c-Myc, Sox2 ve Klf4 gibi genleri aktif hale getirerek embriyonik kök hücrelerine farklılaşma sağlarlar (Ullah ve ark. 2015).

d. Hücre füzyonu: Bir hücre yönlendiği hücre dizileriyle füzyonu yeni yönlendiği hücre dizilerinin oluşumuna sebep olur. Tedavi amaçlı klonlama buna en güzel örnektir. Klonlamada bir hücre grubuna farklanmaya programlanmış hücrenin çekirdeği, çekirdeksiz bir oosit içerisine transfer edilerek tekrar programlanabilir ve böylece değişen çevre şartlarında olgun çekirdeğin yeniden programlanması ile çok sayıda dokuların oluşumu sağlar. Fibroblastların miyoblastlarla füzyonu benzer şekilde oluşur (Campbell ve ark 1996; Amabile ve Meissner 2009).

e. Yönlendirilmiş farklanma: İn vitro olarak, KH'lerin belli bir çizgide farklılaşmasının sağlanması veya yönlendirilmiş farklılaşma; ya belirlenmiş kimyasal ve fiziksel şartlar yerine getiril ya da doğrudan genetik programın değiştirilmesiyle başarıya ulaşılır. Örneğin; yetişkin bir KH'nin adiposite farklılaşması için kültür ortamına belirli miktarlarda indometazin, deksametazon ve insülin gibi doğal hormon ve suni kimyasal maddeler eklenir. Bu maddelerin in vivo olarak KH'lerin yağ hücresine dönüşümünü uyarıp uyarmadıkları bilinmese de, in vitro ortamda bu yolla elde edilen adipositler in vivo karşılıklarıyla kıyaslanacak düzeyde olgunlaşırlar. Aynı yöntemle in vitro askorbik asit, deksametazon ve β -gliserofosfat ilave edildiğinde osteojenik farklılaşma sağlanır (Matur ve Solmaz 2011).

4.5.2. Mikroçevre (Niş)

Kök hücreler, kendilerine destek sağlayan ve bu düzenleyici sinyallerin iletilmesine olanak sağlayan bir çevreye ihtiyaç duyarlar. “niş” olarak adlandırılan bu mikroçevre, hücrelerin düzenlenmesi ve işlevlerinin kontrol edilebilmesi için gerekli hücrel ve moleküler faktörleri içermektedir. Bazı dokularda bu mikroçevre hem kök hücreleri hem de bu hücrelerin öncüllerini düzenleyici etki göstermektedir (Zhang ve Li 2008).

Nişler, kök hücrelere destek sağlamakta, yaşamları için uygun ortamı oluşturmakta, proliferasyonlarını düzenlemekte ve farklılaşmalarına yön vermektedir. Bu alanda gerçekleştirilen çalışmalar oldukça önemli bilgiler vermektedir. Örneğin; her niş sistemi, fiziksel etkileşimi sağlayan ve kök hücrenin asimetric veya simetric olarak bölünmesine neden olan Notch gibi özel moleküllerden yararlanmaktadır. Bir nişte çok yönlü kök hücreler bulunabilmektedir. Kök hücrelerin çoğu, nişte kalacak bir oğul hücre ve farklılaşmak için nişten ayrılacak bir oğul hücreyi oluşturmak için asimetric olarak bölünmektedir. Bununla

birlikte, simetrik bölünme de gerçekleşmektedir. Kök hücreler, doku hasarı geliştiğinde mikroçevrelerinden ayrılarak hasarın geliştiği bölgeye göç etmektedir. Bu nedenle mikroçevredeki kök hücre sayısının dengelenmesi oldukça önemlidir (Conway ve Schaffer 2012; Krause ve ark. 2013).

4.5.3. Kök Hücre Çeşitleri

Bugüne kadar KH'ler ile ilgili olarak farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Bunlar arasında en fazla kabul göreni; KH'lerin esasında iki farklı kaynaktan elde edildiğini bildirenidir. Bu iki farklı kaynak genel itibariyle:

- Embriyonik olan ve
- Embriyonik olmayan KH'ler şeklindedir.

4.5.3.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Embriyo gelişimin erken safhalarında blastosist aşamasındaki iç hücre kitlesinden izole edilen pluripotent hücrelerdir. Vücuttaki herhangi bir hücreye dönüşebilme yeteneğindedirler. EKH'den elde edilen hücreler embryoid cisim olarak adlandırılmaktadır. Bunlar plasenta dışında embriyonik germ yapraklarından ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından kökenlenen her hücre tipine farklılaşabilirler (Wobus 2001). Kompleman yardımıyla toplanan iç hücre kitlesi içerisinde fare embriyonik fibroblastlarının bulunduğu bir kültüre alınır. Bu hücre tabakası besleyici hücre tabakası (feeder layer) olarak adlandırılır ve besleyici tabakadaki hücreler bölünme ve çoğalma açısından inaktif durumdadırlar. Sadece EKH'lerin farklılaşmadan çoğalmasını sağlarlar. Farelerde EKH'ler besleyici tabaka olmaksızın lösemi engelleyici faktör (LIF) olduğunda da farklılaşmadan çoğalabilmektedirler. Alt pasajlarla altı ay sonra iç hücre kitlesinden milyonlarca EKH serisi elde edilebilmektedir. İnsan EKH'leri pluripotent ve farklılaşmamış hücre belirteçlerinden LIN28, Nanog, Thy-1, SSEA-3, SSEA-4, CD9, CD24, oktamer bağlayıcı protein (Oct-4) ve alkalin fosfatasekspresyonları vardır (Tromson 2006). Bu ekspresyonlara sahip hücreler in vitro ortamlarında uzun süre yüksek derecede telomeraz aktivitesi gösterirler. EKH'ler kendi kendilerini yenilemedeki kapasiteleri sınırsızdır ve tüm fetal ve erişkin dokulara farklılaşabilirler.

➤ Embriyonik olamayan kök hücreler; herhangi bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında yerleşen farklılaşmamış hücelere denir. Tipik kök hücre özelliklerine sahiptirler. Kendini yenileyebilme ve içinde bulunduğu doku özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilirler. Bu hücrelerin organizmadaki temel görevleri, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun bütünlüğünü korumaktır. Üç farklı grupta toplanarak incelenirler:

- 1- Hematopoetik kök hücreler
- 2- Stromal (mezenkimal) kök hücreler
- 3- Diğer erişkin kök hücreler

4.5.3.2. Mezenkimal Stromal (Mezenkimal Kök) Hücreler (MKH)

Canlılarda en fazla bulunan ve insan kök hücrelerinin en karakteristik özelliğini taşıyan hücrelerdir. Aynı zamanda mezenkimal kök hücreler (MKH) erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları sebebiyle genel olarak “destek hücresi” özelliği taşıdıkları için, bu hücrelerin tıbbın birçok alanında kullanılmasının temelini oluşturmaktadır (Conget ve ark. 1999). Geldiğimiz şu aşamda hem teknolojik gelişmeler hemde tıptaki yenilikler rejeneratif tıbbın önemli bir bölümünü oluşturan MKH’lerin in vitro şartlarda elde edilip petri kaplarında üretilmesini sağlanabiliyor. Birçok dokudan rahatlıkla izole edilebilirler. Sayıca çoğaltılmaya uygun, dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları faktörler içinde buldukları dokuların özel hücrelerinin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar (Diefenderfer ve ark. 2003). Doku nişinin önemli bileşenleri olmaları ve çoğunlukla immünmodulator özellik taşımalarından dolayı büyük ilgi görmektedirler (Dominici ve ark. 2001).

MKH’ler bağ dokusunun esas hücreleridir. Adiposit, osteosit, kondrosit, miyosit, gibi hücelere farklılaşabilirler (Sekiya ve ark. 2004). Bununla beraber tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini oluşturular. MKH’ler 1974 yılında Fridenstein tarafından ilk kez tanımlanmışlardır. Fridenstein, fetal buzağı serumunda yaptığı kemik iliği kültürlerinde yapışma yeteneği olan, fibroblast morfolojisine benzeyen hücre kolonilerinden bahsetmiş ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğinde olduklarını göstermiştir. Aradan geçen yıllar yeni çalışmalar eşliğinde hücrelerin hematopoetik olmayan pluripotent kök hücreler olduğu ve üç germ yaprağından köken alan hücelere farklılaştığı ortaya konmuştur. İlk başlarda, “Kemik iliği stromal fibroblast”ları ve CFU-F (Colony forming unit

fibroblast) gibi isimler verilen bu hücreler günümüzde mezenkimal kök/ stromal hücre olarak tanımlanırlar (Gregory ve ark. 2005).

KH'ler, otolog veya allojenik olabilir ve sistemik yolla veya lokal olarak uygulanabilirler (Şahin ve ark 2005). Araştırmacılar, MKH'lerin belirgin özelliklerini tanımlamada bazen çelişki yaşarlar. Çok sayıda laboratuvar, birbirinden çok da fazla farklılıkları olmayan protokolleri kullanarak MKH izolasyonu, çoğaltılması, farklılaşması için yönlendirilmesinde çeşitli metotlar kullanmaktadır. Farklı dokulardan morfolojik olarak birbirine benzeyen özelliklere sahip MKH'ler elde edilebilmektedir. Fakat genede hücrelerin farklılaşma ve immünomodulatör özellikleri ile in vivo ortamda etkinliği konularında hücrelerin geliştirildiği adaptasyon olduğu bildirilmektedir. Bundan dolayı Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği, gerek deneysel araştırmalar olsun gerekse pre-klinik çalışmalarda insan MKH'lerini tanımlamada gerekli olan kriterleri önermiştir. Ayrıca bu dernek tarafından isimlendirmesinde de, "kök hücre" yerine "mezenkimal stromal hücre" ya da "multipotent mezenkimal stromal hücre" şeklinde adlandırılmaları önerilmiştir. Bunlara ek olarak farklı birçok çalışmada da hücrelerin, konnektif dokular yanında endoderm ve ektoderm kökenli hücrelere dönüşebilme özelliklerinin de gösterilmesi, bu hücrelerin birçok araştırmacı tarafından "MKH" olarak nitelendirilmesine neden olmaktadır. MKH tanımlanmasındaki en yaygın kullanılan özellikler; stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu, plastik yüzeye yapışma ve multipotent farklılaşma potansiyelidir (Silva ve ark. 2003).

MKH'lerin temel bilim araştırmalarında ve klinik kullanımdaki en önemli dezavantajı, çok az sayıda elde ediliyor olmalarından dolayı in vitro ortamda çoğaltılmalarının gerekliliğidir. Çoğalmaları için kültür ortamında pasajlanmaları sonucu maruz kaldıkları çeşitli uyaranlar ve faktörler immünolojik, fenotipik ve diğer biyolojik özelliklerinde farklılıklara yol açmaktadır (Tuli ve ark. 2003). MKH'ler ile yapılan temel araştırmaların büyük bir kısmında in vitro ortamda geliştirildikleri için tanımlanmış özellikleri in vivo özelliklerini yansıtmaktan oldukça uzaklaşmaktadır. Böyle bir durum özellikle klinik uygulamalarında dezavantaj olmaktadır. İn vitro olarak pasajlanarak çoğaltılmaya bağlı hücre yaşlanması, sitogenetik bozukluk ve azda olsa malign transformasyon riski bulunmaktadır. Aynı zamanda uluslararası kabul görmüş akreditasyon koşullarına uygun hücre işleme laboratuvarlarını

oluşturmadaki zorluklar, çoğunlukla klinikte kullanımına engel olmaktadır (Tae ve ark. 2006). Artı yönü ise özellikle 2000’li yılların ortalarından günümüze uygulama sayısı giderek artan MKH klinik uygulamalarında bu hücelere bağlı ciddi komplikasyonlara rastlanmamıştır.

4.5.3.3 Mezenkimal Stromal Hücre Kaynakları

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH’ler için ana kaynak sayılmaktadır. Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök/projenitör hücreler bulunmaktadır. Kemik iliği dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Solid dokulardan hücre izolasyonunda enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Kemik/ periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovial sıvı, hatta periferik kandan da adezyon özellikleri nedeniyle ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür (Alhadlaq ve Mao 2004). Mezenkimal kök hücrelerin, elde edildikleri dokudan bağımsız olarak plastik doku kültür kaplarına yapışabilme, fibroblastoid morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşabilme ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi birçok özellikleri vardır. Bu özellikler büyük ölçüde benzerlik gösterir. Ancak farklılaşma kapasitesi ve fonksiyonel özelliklerinde, köken alınan doku tipine göre bazı değişiklikler olabildiği de gösterilmiştir. Buldukları mikroçevreye ve organizmada ihtiyaç duyulma haline bağlı olarak, MKH’lerin biyolojik özellikleri ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler olduğu da gösterilmiştir. Bununla ilişkili olarak da spesifik bir dokunun onarımı için, o bölgeden elde edilen kök hücrelerin kullanımının avantajları olacağı gündeme gelmiştir.(Hwang ve ark. 2014).

Periferik kanda MKH varlığı ise tartışmalıdır. Periferik kanda osteojenik farklılaşma yeteneği olan nonhematopoetik ve MKH karakterinde hücreler olduğu gösterilmiştir. Özellikle ağır hasar olan durumlarda, kemik kırığı, multiorgan yetmezliği hallerinde periferik kandan MKH izole edildiği gösterilmiştir (Zou ve ark. 2014). Mezenkimal kök hücrelerle yapılan çalışmalar hep in vitro olduğundan, hücrelerin dokularda yerleşimi, yuvaları/ niş (niche) bölgeleri detaylı incelenmemiştir; yine de özellikle son zamanlardaki çalışmalarda, hücrelerin dokularda perisitler gibi perivasküler yerleşimde olduğu, komşu hücrelerin

olgunlaşma, farklılaşma ya da sessiz kalma gibi hücresele fonksiyonlarını koordine ettikleri bildirilmiştir (Farini ve ark. 2014).

4.5.3.4. Mezenkimal Stromal Hücrelerin In Vitro Çoğaltılması

MKH'ler, kemik iliği de dahil buldukları dokularda çok az sayıda elde edilmektedirler. Çok adeziv olduklarından buldukları dokulardan yeterli sayıda elde edilmelerinde zorluklar oluşmaktadır. Hem klinik uygulamaları, hemde deneysel araştırmalarında yeterli hücre eldesi için in vitro ortamda çoğaltılmaları gerekmektedir. Çoğalan hücrelerin in vitro şartlarda proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerini korudukları bilinmektedir. İn vitro çoğaltılan MKH'ler ışık veya faz kontrast mikroskopi ile incelendiğinde hücrelerin iğ şeklinde olduğu ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oluşturdukları bilinmektedir. Düşük konsantrasyonda kültür edildiğinde koloni formasyonuna meyilli oldukları, yüksek hücre konsantrasyonunda ise yanyana dizilmiş hücre grupları halinde çoğaldıkları gözlenmektedir (Zou J ve ark. 2014).

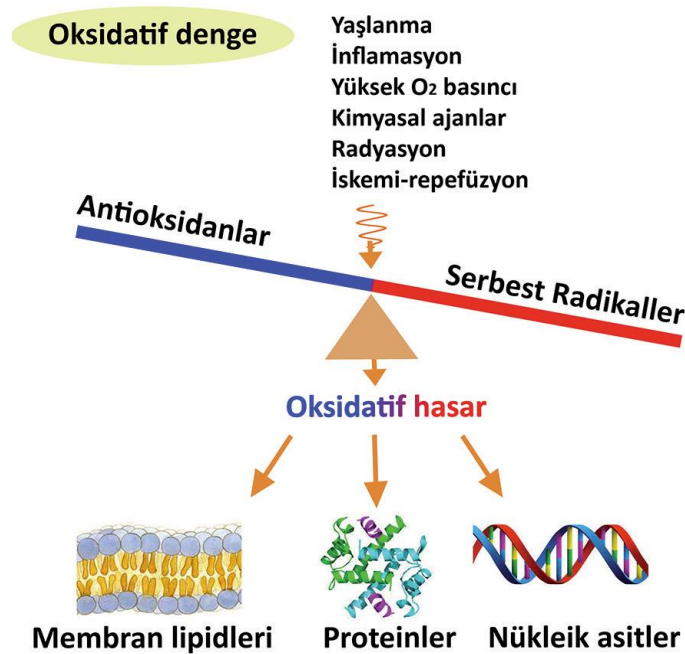
MKH'lerin en fazla bulunduğu yer kemik iliğidir. Farklı çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücereye yaklaşık 2 ile 100 arasında değişen sayıda MKH karşılık geldiği gösterilmiştir (Colter ve ark 2001). MKH'lerin plastik kültür kaplarına yapışabilme, fibroblast benzer morfoloji, multipotent farklılaşma ve bazı yüzey belirteçleri CD105, CD73, CD90 taşımaları gibi ortak özellikleri vardır. Fakat farklılaşma potansiyeli ve fonksiyonel özelliklerinde köken aldıkları doku tipine göre değişiklikler olabilmektedir. Bu sebeple spesifik bir bölgenin tedavisi için o bölgeden kök hücre alınması gerekmektedir (Karaöz ve ark. 2013; Zou ve ark. 2014; Potdar ve Jethmalani 2015).

4.6. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde serbest radikaller ile bunlara karşı ortadan kaldırmaya sahip antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanır (Şekil 4.6.1). Reaktif oksijen türleri azımsanmayacak kadar yüksek reaktivitedeki moleküller olup, mitokondriyum başta olmak üzere hücre organellerinde gerçekleşen normal metabolizmanın sonucu olarak veya radyasyon, yüksek oksijen basıncı, inflamasyon, iskemi-reperfüzyon, yaşlanma ve kimyasal ajanlara maruz kalma gibi nedenlere bağlı olarak ortaya çıkarlar (Yan ve Sohal 1998; Yan 2014). Hücrelerdeki

oksidasyon redüksiyon bozuklukları protein, lipid, DNA dahil olmak üzere hücrenin bütün bileşenlerine peroksidaz ve serbest radikal üretimi ile toksik etki eder. Ayrıca bazı reaktif oksijen metabolitleri oksidasyon redüksiyon olaylarında hücre içi haberci gibi hareket eder. Böylece oksidatif stres normal hücre içi sinyal iletiminde bozulmalara neden olabilir. Başta kanser olmak üzere ateroskleroz, inflamatuvar bozukluklar, diyabet, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde oksidatif stres sorumludur (Motor ve ark. 2014; Aydın ve ark. 2012; Ögüt ve Atay 2012).

Serbest radikaller biyolojik sistemlerde oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif moleküllerdir, elektronları rahatlıkla hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girer ve oksidatif stres meydana getirirler. Normal hücre metabolizma sırasında serbest radikaller oluşabilir. Aynı zamanda çeşitli dış etkenlerde ortaya çıkmasına neden olabilir. Organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak oksidatif stres tanımlarken kullanılır. Radikaller; temel hücre bileşenlerinden olan nükleik asitler, lipidler ve proteinlerde hasara yol açabilir. Oluşan hasar amiloidoz, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği, ateroskleroz, kanser, senil demans ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklarda ortaya çıktığı ve biyolojik yaşlanmada rol aldığı bilinmektedir (Kopáni ve ark., 2006).



Şekil 4.6.1. Oksidatif denge (Özcan ve ark. 2015)

4.6.1. Serbest Radikal

Reaktif ve kısa ömürlü olup dış yörüngelerinden birinde eşleşmemiş elektron içeren bileşiklerdir. Serbest radikaller, hücrede enerji üretimi için gerekli olan birçok reaksiyon tarafından veya normal bir metabolizmanın devamı olarak üretilmektedir. Üç yolla oluştuğu kabul edilmektedir (Kılınç K ve Kılınç A 2002).

1- Normal bir molekülün kovalent bağlı herbir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.

2- Normal molekülün bir elektron kaybına uğraması

3- Normal moleküle bir elektron eklenmesi

Üretilen radikaller membran lipitlerine, hücre içi proteinlere ve nükleik asitlere etki ederek yapı ve fonksiyonları üzerinde değişikliklere yol açtığı ve hücrel hasar oluşturduğu çok iyi bilinmektedir.

4.6.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Atmosferdeki oksijen, moleküler oksijen (O_2) ya da dioksijen olarak isimlendirilir. Normal oksijenin çok az bir kısmı mitokondri başta olmak üzere hücrel kompartımanlardaki metabolizma sırasında indirgenerek reaktif oksijen türlerine dönüşür. Reaktif oksijen türleri; Hidroksil radikali (OH), Süperoksit radikali (O_2) ve Hidrojen peroksit (H_2O_2)'dir. Hidroksil radikali ve süperoksit radikali serbest radikal, hidrojen peroksit ise prooksidandır (Navarro ve Boveris 2004).

4.6.1.2. Süperoksit radikalleri (O_2)

Oksijenli solunum yapan hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda süperoksit radikalleri oluşur. Özellikle iç mitokondri zarı elektronca zengin bir ortam olduğu için bu zarı ve ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak oluşturulur. Ayrıca indirgenmiş geçiş metallerindeki otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir (Valko ve ark. 2005).

4.6.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Serbest radikal değil ama ROS kapsamına girer ve serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar. Hücrel kompartımanlarda bulunan glikoz oksidaz, urat oksidaz ve D-aminoasit oksidaz gibi enzimler olarak hidrojen peroksit oluşturur. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubundaki demirle tepkimeye girerek, yüksek

oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Reaktif demir formu çok güçlü oksitleyici özelliklere sahiptir ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimelere sebep olmaktadır. Ancak katalaz enzimi tarafından su ve oksijene parçalanarak ortamdaki uzaklaştırılır (Aksin 2012).

4.6.1.4. Hidroksil radikalleri (OH)

yarılanma ömrü 10⁻⁹ saniye olan son derece reaktif radikallerdir. Hidroksil radikali ROS'ların en güçlüsüdürler ve metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda H₂O₂ oluşmaktadır. Oluştugu bölgede tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikaller oluşturur. Böylece hücrede hasara neden olur (Ayala ve ark. 2014; Yin ve ark. 2011).

4.6.2. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik Oksit (NO), ilk başlarda endotel kaynaklı gevşetici faktör adıyla bilinen ve eşleşmemiş bir elektron taşıyan yüksüz bir moleküldür (Burke ve ark. 2013). NO, molekül ağırlığı 30,006 gr/mol olup serbest radikal yapısındadır. Yarı ömrü 20-30 sn'dir. Lipofilik özelliğe sahip NO, yüksek konsantrasyonlarda oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda çözülebilir. Düşük konsantrasyonlarda ise ortamda oksijen varlığında stabilitesini koruyabilmektedir (Lowensein ve ark. 1994; Star 1993).

Reaktif nitrojen türlerinden biri olan NO, üzerinde yük taşımaması ve eşleşmemiş elektron bulundurması özelliği onu önemli bir mesajcı yapar. Yüksüz olduğu için hücre membranından hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolayca geçer ve eşleşmemiş bir elektrona sahip olması nedeniyle hızlı reaksiyona girer (Moncada ve Higgs 2002; Ebrahimzadeh ve ark. 2010).

NO, pek çok hücrede nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından katalizlenen reaksiyon ile sentezlenmekte ve L-arginin ile O₂ molekülleri, NO ve sitrüllin moleküllerine dönüştürülmektedir. NO' in sentez reaksiyonu sırasında moleküler O₂' nin yanı sıra kofaktör olarak flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), tetrahidrobiopterin (BH₄) ve Hem kullanılır. Bu kofaktörler arasında elektron transferleri gerçekleşir (MacMicking ve ark. 1997; Alderton ve ark. 2001).

L-Arjinin- NO yolu ile NOS enziminin çeşitli fonksiyonları tanımlanmış ve farklı hücrelerdeki türevleri bulunmuştur. NO, üç farklı NOS enzimi tarafından

arjininden sentezlenir (Sugiura ve Ichinose 2011). Bunlar nNOS (nöronal, NOS 1), iNOS (indüklenebilir, NOS 2), eNOS (endotelial, NOS3). Bu enzimler Yapısal (Constitutive) NOS (cNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılır. Endotel (eNOS) ve nöron (nNOS) kaynaklı NOS, cNOS grubuna dâhildir. Hücre içinde devamlı bir şekilde var olan ve kas kasılması ile nöronal iletim için aralıklı olarak ve küçük miktarlarda (picomol- nanomol) NO üreten bir enzimdir. Nöronal yapılar, endotel hücreleri, miyokard ve trombositlerde bulunur. Kofaktör olarak Ca^{2+} /kalmodyulin bağımlıdır. Ca^{2+} 'un yükselmesi kalmodyulinin NOS' a bağlanmasını uyarır ve süratli bir şekilde pikomolar düzeylerde NO sentezlenir (Tejero ve Stuehr 2013).

Sentezi uyarılabilen iNOS ekspresyonu mikroçevredeki sitokin dengesine bağlıdır. Çeşitli uyarılara (sitokinler, mikroorganizmalar, tümör hücreleri gibi) cevap olarak NO sentezi yapar. Bir kez eksprese edildiğinde yüksek miktarlarda ve daha uzun süre NO sentezleyebilir (Tejero ve Stuehr 2013). İndüksiyon sonrası NO sentezi saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Fakat uzun süreli NO sentezi aşırı miktarda olduğunda dokularda harabiyete neden olur. L-arjinin analogları ve glukokortikoidler enzim indüksiyonunu inhibe edilebilmektedir. Enzim, bilinen bu özelliklerinden dolayı indüklenebilir NOS veya kalsiyum bağımsız NOS olarak adlandırılmıştır (Hevel ve ark. 1991; Dawson 1995; Leppänen ve ark. 2013).

NOS; NADPH, flavoproteinler, kalmodyulin, oksijen ve tetrahydrobiopterinin varlığında L-arjinini NO'ya ve sitrulline dönüştürür. NOS I (nNOS)- III (eNOS) nöronal endotel hücrelerinde yerleşir ve enzim aktivasyonu için hücre içi kalsiyum artışına gereksinim duyar. NOS II sentezi için Ca ihtiyaç duymaz. NOS enzimlerinin tümü arjinin analoglarınca inhibe edilir (Fidancı ve Gümüş 2011).

Farklı NOS izozimleri tarafından sentezlenen NO, farklı fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (Lowenstein ve Snyder 1992). NO bir kere sentezlendikten sonra hızla hedef dokulara yol alır ve hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive eder ve düz kas kasılmasını sağlayan siklik guanozin monofosfat (cGMP) miktarını artırır. Bu biyokimyasal olaylar vasküler tonüs, düz kas kasılması ve kan akışının regülasyonunda önemli rol oynar. Aynı zamanda trombositler içindeki guanilat siklaz aktivitesini artırarak trombosit adezyon ve agregasyonunu azaltır (Michie ve ark. 1988; Moat ve ark. 1993). Mikroorganizmaların mitokondriyel proteine bağlı demir

bileşikleriyle reaksiyona girerek DNA sentezini bozar ve ölmelerine yol açar. Vazodilatasyona yol açarak lökosit migrasyonunu artırır. Sonuçta antimikrobiyal ve fagositik aktiviteyi artırarak inflamasyon genişlemesini engellemeye katkıda bulunur (Campisi ve ark. 2002).

NO oluşuktan sonra; 1) Met-hemoglobin, nitrite ve nitrata dönüşerek inaktive olur; 2) Süperoksit anyonları ile birleşerek peroksinitrite dönüşür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri ve tirozinle birleşerek nitrotirozini oluştururlar. 3) cGMP' yi artırarak düz kas gevşemesine sebep olmaktadır (Özkan ve Yüksekol 2003).

4.6.3. Oksidatif Stresin Etkileri

Oksidatif stres faktörlerinin başında serbest radikal oluşumu yer alır. Bu moleküller yapısal moleküllerden elektron alarak, moleküllerin yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre zarını ve genetik materyali etkileyerek değişik hücre hasarlarına yol açmaktadır. Bu radikaller canlı organizmalarda sitoplazmik, mitokondriyel ve ekstrasellüler formları olan, nitrik oksit sentaz (NOS), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) gibi antioksidan enzim sistemleri ile seruloplazmin, , askorbik asit (vitamin C), transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve alfa tokoferol gibi antioksidanlar tarafından yıkılarak ortamdaki uzaklaştırılır. Bu sistem düzgün çalışmadığında ise serbest radikallerin aşırı üretimi ile oksidatif stres diyabet, iskemik hasar, kanser, yaşlanma gibi birçok hastalıklara yol açtığı bildirilmektedir (Shi ve ark. 2012; Keane ve ark. 2015; Liu ve ark. 2015).

Reaktif oksijen türlerinin hücrede artışı ya da antioksidanların bazı patolojik süreçler sonucunda azalmasıyla oksidatif denge bozulur. ROS miktarının artmasıyla bu dengenin bozulması neticesinde hücre membranlarında hasar, hücre içi proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma ve DNA'da yapısal hasar meydana getirir ve hücre hasar görür.

4.7. APOPTOZİS

Yüksek yapılı organizmalarda hücrelerdeki ölüm iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Birincisi klasik hücre ölümü nekrozdur. İkincisi apoptozisdir ki apoptozis çoğunlukla tek tek hücreleri etkiler. Çok farklı fizyolojik ve patolojik şartlarda ortaya çıkabilir ve genellikle enflamasyonda söz konusu olmaz (Öztürk 2002).

İlk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları Apoptozis terimini kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin nükleuslarında yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark etmiştir. Bu olayda büzüşme nekrozu adını vermiştir (Kerr ve ark. 1972). Apoptozis birçok genin aktif olduğu bir sistem olup, Yunancada sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş bir kelimedir (Özvaran 2004). Hücrenin yaşamı boyunca anabolik ve katabolik dengesini sürdürmesini sağlar. Örnek olarak kemik iliğinden sürekli olarak hücre üretimi sürerken aynı zamanda günde neredeyse 5×10^{11} kan hücresinde apoptozis ile ortadan kaldırılır. Yine bağırsak epitelin sürekli yenilenmesi, uterusun iç yüzündeki hücrelerin menstrüasyon sonunda uzaklaştırılması apoptozis mekanizmasıyla gerçekleşir. Apoptozis aynı zamanda, hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Virüsle enfekte hücreler ve hasarlı DNA da apoptozisle ortadan kaldırılır. DNA hasarı olan hücreler kanserleşebileceği için apoptozisle öldürülmesi oldukça önem taşır (Erdoğan 2003).

Hücrenin ömrü hücre tipine göre değişmektedir. Bağırsak hücreleri 3–5 gün işlev görüp ölümler, derideki epidermal hücreleri 20–25 günlük bir yaşarlar. Diğer taraftan kalp kası hücreleri ve nöronlar ise ömür boyu yaşarlar. Bu ölümlerin hepsi fizyolojik şartlarda cereyan ettiği için, fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır. Apoptozisle hücre ölümü; enerji kullanılarak, hücresel yaralanma ve enflamasyon olmaksızın, profesyonelce gerçekleştirilir. Programlı hücre ölümünün, bütün organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde olmazsa olmaz bir role sahiptir (Tomatır 2003).

4.7.1. Apoptozis Morfolojisi

Apoptozisde esas morfoloji, nükleusta kromatin yoğunlaşması ve daha sonra parça parça ayrılmasıdır (Galle 1997). İmmun elektroforez yapıldığında ‘ladder

pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (Walker 1999). Normalde sağlıklı bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma meydana geldiğinde onarılabiliyorken, apoptoziste yaklaşık 300000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (Zhang ve Xu 2002).

Apoptozisin erken evresinde hücre komşu hücrelerden ayrılır, özelleşmiş tutunma organellerini kaybeder ve büzüşmeye başlar, bir kaç dakika gibi kısa bir sürede hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm sebebi muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında ki aktivasyonun bozulmasından kaynaklanır (Wijsman ve ark. 1993). Apoptotik hücrelerin doku kesitlerinde ışık mikroskopuyla incelendiğinde, hücreler etrafında açık bir parlama görülmektedir (Öktem ve ark. 2001).

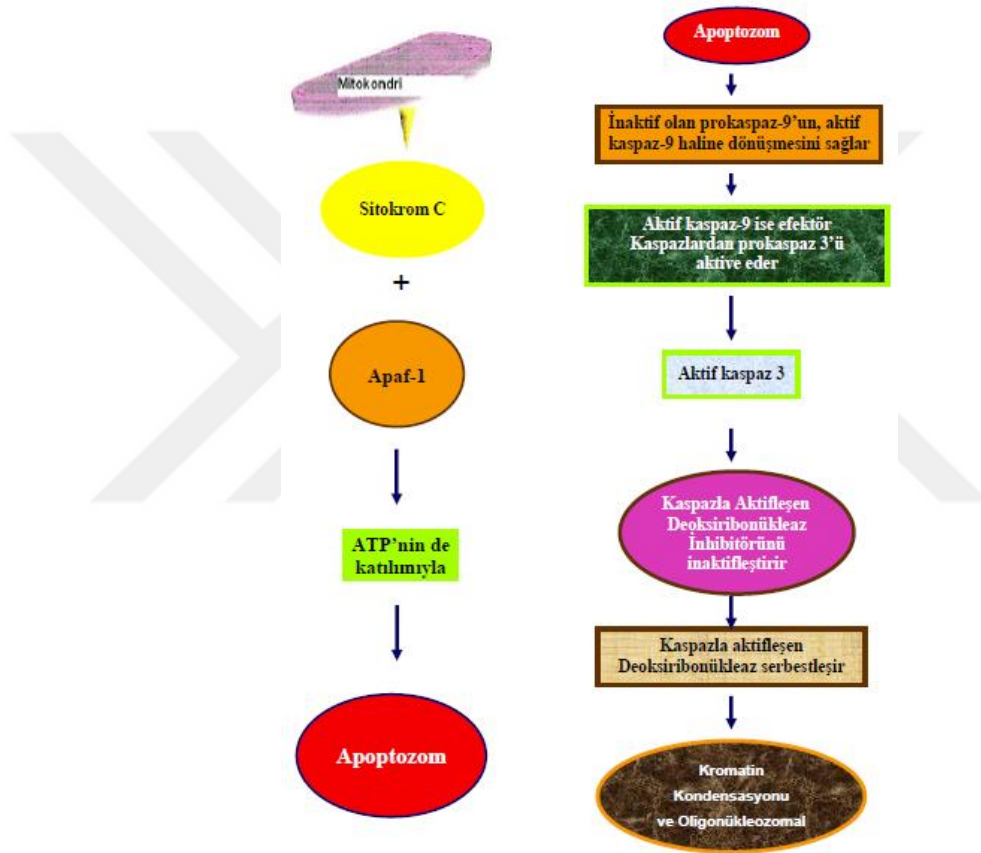
İleri aşamada plazma membranında tomurcuklanmalar meydana gelir ve hücre, sitoplazma ile içerisinde kromatin parçaları olan sitoplazmalara parçalanır. Bu oluşumlar apoptotik cisimcik olarak adlandırılır. Apoptotik hücreler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Dayan ve ark. 2000). Apoptotik hücrelerin tanınması, membranındaki değişikliklerle olur. Normalde sağlıklı hücrelerde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış tarafına göç eder. Fagositoz yapan hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Öktem ve ark. 2001).

Apoptozis, bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın ortadan kalkmasıyla karakterizedir. Hücre sel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durmasıdır. Hücre içi ve dışı arasında hareket olmaz artık. Apoptotik uyarımla hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklaşmalar oluşur ki bu yapı 'zeiozis' olarak tanımlanır. Membrandaki tomurcuklar ve ardından parçalara ayrılmasında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (Tomatır 2003).

4.7.2. Apoptozis Mekanizmaları

Hücresinin otomatik saati olan genlerindeki aktivasyon veya çevreden gelen uyarılarla apoptozis başlamaktadır. Apoptozis uyarı almış hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir. Hücreyi dışardan

uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması yer alır (Şekil 4.7.2.1). Ayrıca glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenlerde apoptozis mekanizmasının başlamsında önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olan bazı proteinler, virüsler de TNF reseptörü üzerinden hücreyi apoptozise götürmektedir. Normal şartlarda organizmada apoptozisi uyarıcı ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Erdoğan 2003; Gürbilek ve ark. 2004; Öktem ve ark. 2001; Bender ve ark. 2005).



Şekil 4.7.2.1. Apoptozisin regülasyonu (Akşit ve Bildik 2008).

Hücre içi uyarıcılar ise; sitokinler, kalsiyum hücre içinde artışı, TNF, tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (c-myc gibi) rolünün olduğu bilinmektedir. Ayrıca sitotoksik antikanser ilaçlar, hipertermi, radyasyon ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptozise neden olabilmektedir. Her ne kadar apoptozisde hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptozis

dolaylı yoldan çevre dokuda nekroza sebep olabilir ya da tam tersi nekroz apoptozisi başlatabilir (Öktem ve ark. 2001).

Apoptozisteki olaylar; DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranının ölüm sinyallerini alması (Fas ligandı) ve hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir (Roshal ve ark. 2001). Apoptoziste belirli üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteindir. Bu moleküllerinin biyokimyasal aktivasyonu, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, apoptozisde gözlenen mitokondriyal hasar, nükleus membranı kırılması, ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (Staley ve ark. 1997). Günümüzde apoptozis sürecinde rolü olan biyokimyasal ve genetik komponentlerin aydınlatılmasıyla birlikte apoptozun aktivasyonuna ya da inhibisyonuna ilgili çalışmalar; AIDS, kanser ve otoimmün hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalıkta yeni tedavi olanaklarını gündeme getirmektedir.

4.7.3. Apoptozisin Regülasyonu

Bcl-2 / Bax gen ailesi apoptozis düzenlemesini sağlayan genlerdir. Bu ailenin toplam 20 üyesi tanımlanmıştır; bazıları apoptoz inhibitörü (antiapoptotik), bazıları ise apoptozisi uyarıcı ve proapoptotik genler olarak tanımlanır (Nagata 1997). Apoptotik sinyal alındıktan sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltır. Bu azalma nedeniyle bir takım değişiklikler ortaya çıkar ve sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler (Kaneda ve ark. 1999). AIF doğrudan yoğunlaşmış kromatine ve parçalanmış nükleusa yönelirken, sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c bir sitoplazma proteini Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptosom' olarak adlandırılır. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (Nagata 1997; Tomatır 2003).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 01/03/2016 tarih ve 77637435-13 karar numaralı onayı ile yapılmıştır. Çalışma için herahngi bir kurum ya da şahıs desteği alınmamıştır.

5.1. Deneş Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Çalışmada MCBÜ-DEHAM'nden temin edilen ağırlıkları 200-250 gr. civarında değişen erişkin 60 adet dişi ve 3 adet erkek Wistar albino cinsi sıçan olmak üzere toplam 63 adet sıçan kullanıldı. Kullanılacak deneklerin daha önce özellikle çiftleşmemiş ve herhangi bir çalışmada kullanılmamış olmasına dikkat edildi. Deneşsel uygulamaları ve bakımları MCBÜ-DEHAM'nde yapıldı. Ratların laboratuvar koşullarına adaptasyonunu sağlamaları için 22°C sıcaklıkta, 12 saatlik karanlık ve aydınlık periyodunda, yem ve musluk suyu serbest olarak (*ad libitum*) verildi. Ayrıca 2 haftalık bir süreçte ele alıştırmaya (handling) yöntemi ile ratların deney yapan kişiye alışmaları sağlandı. Asherman oluşturmak için operasyonlar, deney hayvanlarının bulunduğu ortamdaki uzak ve sessiz bir ortamda yapılmış olup, uygulamalar sırasında ani hareketlerden kaçınılarak stres oluşturulmamaya çalışıldı.

Çalışmamızda, kimyasal yöntem kullanılarak trikloro asetik asitle AS modeli oluşturduğumuz deneklere, erkek sıçanların tibia ve femur kemiklerinden elde edilen ve pasaj üç aşamasına kadar çoğaltılan KİMKH'ler, deneşsel model oluşturulduktan hemen sonra intraperitoneal olarak enjeksiyonla transplante edilerek tedavi amacıyla 10 gün boyunca tekrarlayan şekilde verilerek, adezyon meydana gelmiş ve kapanmış uterin kornuyu açabilmeyi ve tedaviden sonra çiftleştirmeye sağlıklı yavrular ve implante olmuş embriyolar elde etmeyi amaçladık. Ayrıca sağlıklı gebelik elde etmek için implantasyon süreçlerini etkileyen önemli bir faktör olarak, kök hücre uygulamasının moleküler mekanizmalarının rolü ve bunları etkileyen faktörlerin araştırılması ve infertil hastaların tedavisine katkıda bulunulması amaçlandı. Bu amaçla AS modeli oluşturulan sıçanların hem gebelik oluşturulmadan önce hem gebelik oluştuktan 12 gün sonra grupların uterus dokuları alınarak histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi. Histokimyasal olarak Hematoksilin- Eozin ve Masson- Trikrom boyması yapıldı ve endomteriyumun histolojik yapısı, bez sayısı, inflamasyon oluşumu, endomteriyal kalınlık ve fibrozis açısından

değerlendirmesi yapıldı. İmmünohistokimyasal boyama olarak c-Kit, PCNA, eNOS, TGF- β 1, VEGF, Laminin, Fibronektin, L- Selektin boyamaları yapılarak moleküler etkileşimler ortaya konulmaya çalışıldı. Ayrıca TUNEL metoduyla apoptotik süreç de değerlendirildi. Bununla beraber alt gruplardan üçüncüsünde yavruların doğması beklendi ve morfolojik değerlendirilmesi yapıldı.

5.2. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eldesi

Çalışmada kemik iliği kaynaklı stromal kök hücre (KİMKH) eldesi için erkek sıçanların tibiasından ve femurundan alınan kemik iliği hücreleri ayrışmayı takiben 25cm²'lik kültür kabında % 15 fetal buzağı serumu (FBS) (S0113, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. Amfoterisin (A2612, Biochrom, Berlin, Germany), 50 μ gr./ml. Gentamisin (A2712, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. Streptomisin (A2213, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. penisilin ve 200 mM L-glutamin (K0282, Biochrom, Berlin, Germany) ilave edildiği α -MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Germany) kültür vasatında 37⁰C'de ve %5 CO₂'e ayarlanmış ortamdaki inkübatörde çoğaltıldı. Üçüncü günün sonunda kök hücreler ve yüzeye tutunmayan hücreler vasatın değiştirilmesi sonucu ortamdan uzaklaştırıldı. Sonra kültür kabına yapışan hücrelerin besiyeri, konfluent olana kadar iki gün arayla değiştirildi (Tuglu ve ark. 2010).

Hemen hemen 16-18 gün sonra, inverted mikroskop (IX71, Olympus, Japan) altında hücrelerin çoğalmaları kontrol edildi; kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücre ile dolduğunda (%70-80 konflüente ulaşıldığında) pasajlanmaya başlandı. Birincil kültür sıfırncı pasaj (P0) olarak kabul edilerek, birincil kültürden sonra her alt-kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 olarak belirlendi (Niemeyer ve ark. 2010).

Laminar flow steril kabinde gerçekleştirilen pasaj işleminde; besiyeri ve tutunmayan hücreler döküldükten sonra, flask yüzeyi 3-4 ml steril PBS (Phosphate buffer saline, L1815, Biochrom, Berlin, Germany) ile yıkandı. Yaklaşık 1.5-2 ml %0.25 tripsin-EDTA (L2143, Biochrom, Berlin, Germany) solusyonu ilave edilerek, CO₂ inkübatörde 4-5 dk inkübe edildi. İverted mikroskopta hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldükten sonra, tripsinin etkisini ortadan kaldırmak için flaslara, 4 ml besiyeri eklendikten sonra hücreler 15 ml'lik tüplere alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifuj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pelete 1 ml besiyeri eklenip,

homojenizasyon için pipetlendi. Arkasından, hücre sayımı için eppendorf tüpüne 100 µl hücre süspansiyonu eklendi. Hücre süspansiyonun üzerine 100 µl tripan mavisi solusyonu eklendi. Thoma lamında ışık mikroskobu altında hücre sayımı gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler, uygun oranlarda besi ortamıyla seyreltilerek, 1×10^6 hücre yoğunluğunda 75 cm²'lik kültür flasklarına (T-75 kültür kaplarına) ekimi yapıldı ve iki günde bir besi ortamı değiştirilerek kültür işlemine devam edildi (Karaöz ve ark. 2009).

5.3. Kök Hücre Sayımı

Kemik iliğinden izole edilen kök hücreler için her pasaj işlemi sırasında, dondurma ve çözündürme işlemleri sonrasında ve karakterizasyon işlemleri öncesinde gerçekleştirilen hücre sayımları Karaöz ve ekibinin (2009) metoduna uygun olarak gerçekleştirildi.

Hücre sayımı için; sayım kamarası olarak Thoma lamı kullanıldı. Lam, düz bir zemin üzerine alındı, sayım alanı çerçevesi üzerine lamel kapatıldı. Tripan mavisi ilave edilmiş süspansiyondan 50 µl alınarak, Thoma lamının iki yanında bulunan kanalların ortasında lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucu ile tam orta noktasından hücre solusyonu sayım alanına pipetlendi. Sayım, ışık mikroskobunda, x40 objektifte gerçekleştirildi. Toplam hücre sayıları aşağıdaki formüle göre hesaplandı; Canlı hücre sayısı = Boya almamış hücre sayısı/Toplam hücre sayısı x 100.

5.4. Kök Hücre Karakterizasyonu

KİMKH'leri P3' e kadar çoğaltıldıktan sonra karakterizasyonu indirekt immunohistokimyasal yöntemle anti-Stro-1 (MAB4315, Millipore) ve anti-c-Kit (sc-168, Santa Cruz Biotechnology) antikorları kullanılarak gerçekleştirildi. Stro-1 (+) ve c-Kit (+) olan P3' teki hücreler, mezenkimal kök hücre olarak kabul edildi (Karaöz ve ark. 2009).

Hücrelerin bir kısmı 8 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve konfluent olan hücreler fosfat tamponunda (PBS, Phosphate buffer saline) hazırlanmış %4'lük paraformaldehid (pH 7,4) ile 30 dk fikse edildikten sonra 3x5'er dk PBS (00-3002, İnvitrogen, CA, USA) ile yıkandı. Bir sonraki aşamada %0,1'lik Triton-X100 (T8787, Sigma, St.Louis, USA) solüsyonu ile 15 dk inkübe edildi ve tekrar PBS ile

yıkama işlemi gerçekleştirildi ve %3 hidrojen peroksit (1.08600, Merck, Darmstadt, Germany) ile 30 dk bekletildi ve böylece endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi. PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra blokama serumuyla bir saat inkübe edilen hücreler yıkama yapılmadan sadece serumun alındıktan sonra **anti-Stro-1** ve **anti-c-Kit** primer antikorları ilave edilerek 18 saat inkübe edildi. Bu aşamadan sonra tekrar 3x5'er PBS ile yıkandı ve sonra biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikor (85-9043, Invitrogen® -Histostain Plus Bulk Kit, CA, USA) solüsyonu ile 30 dk boyandı. Her bir sekonder antikor 3x5'er dk PBS ile yıkandı. İmmunreaktiviteyi görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB, 00-2020, Zymed, CA, USA) ile 5-8 dk boyandı. Ayrıca primer antikorun yerine PBS konarak negatif kontrolleride yapıldı. Son olarak Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması yapıldı. Ardından distile su ile yıkandıktan sonra kapatma medyumu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda (BX43, Olympus, Japan) incelenerek değerlendirildi.

5.5. Deneysel Asherman Modeli ve Kök Hücre Uygulamaları

İmplantasyon başarısızlık modeli olarak Asherman sendromu kimyasal olarak trikloroasetik asitle dişi sıçanlarda uterusun tek hornda oluşturuldu. Ketamin/ksilazin anestezisi altında orta hat insizyonu ile abdomen açılarak sağ ve sol uterin hornlar belirlendikten sonra sol uterin kornuya 0,1 ml (**Resim 5.5.1**) trikloroasetik asit (IL 33\, İstanbul Ilac Sanayi ve Ticaret AS, Umraniye, İstanbul, Turkey) uygulandıktan bir gün sonra deney gruplarına göre uygulamalar gerçekleştirildi (Kilic ve ark., 2014).

Gruplar:

Asherman +BY (G1); Taze hazırlanan besiyeri verilen grup,

Asherman + Niş (G2); 48 saatlik besiyeri verilen grup,

Asherman + KİMKH (G3); besiyerisi uzaklaştırılmış sadece KİMKH verilen grup,

Asherman + KİMKH + Niş (G4); KİMKH'ler besiyerisiyle birlikte verilen grup olmak üzere toplam dört grup oluşturuldu.

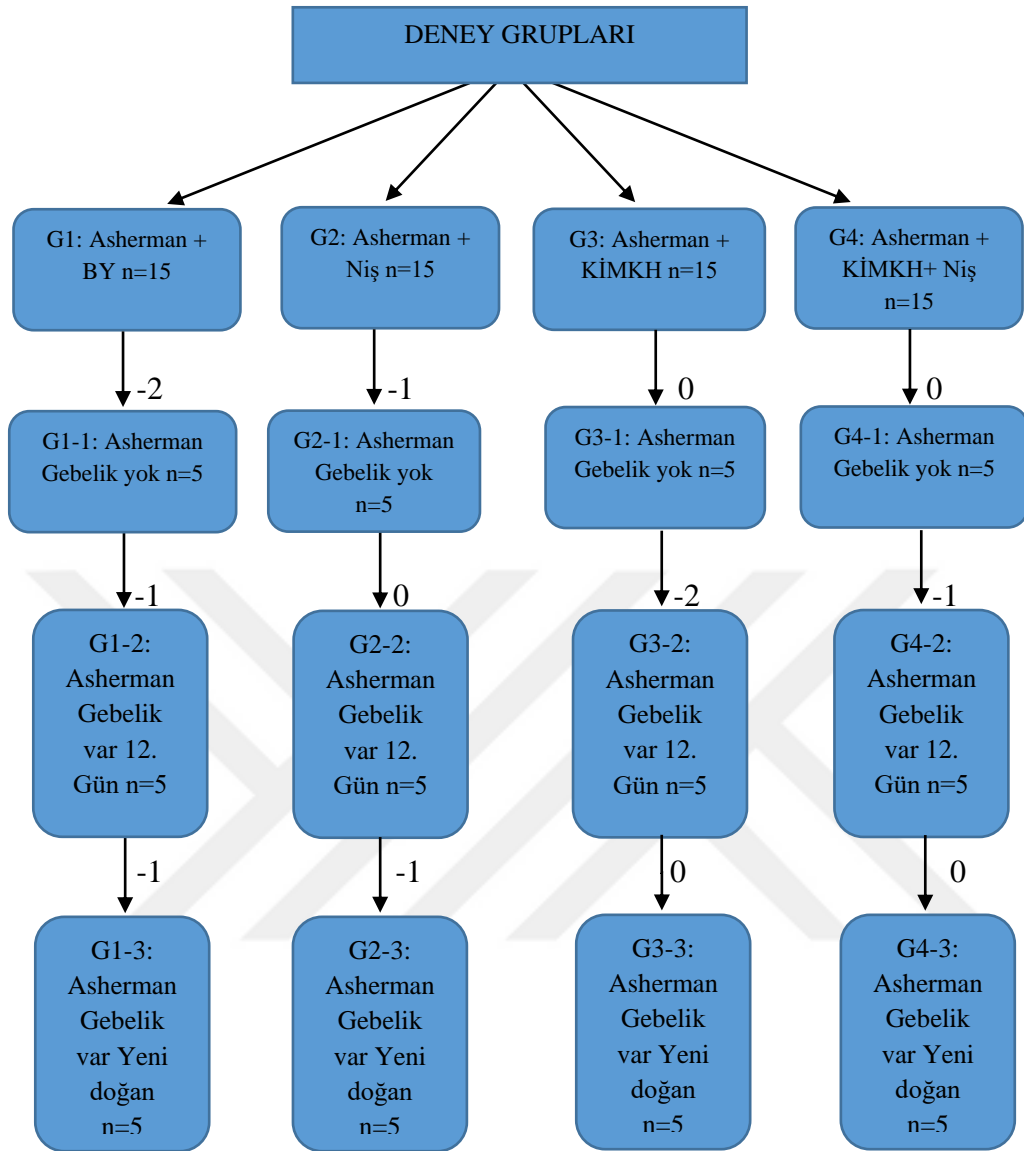
Her bir grup 3 alt gruba ayrılarak incelendi.

Alt gruplar:

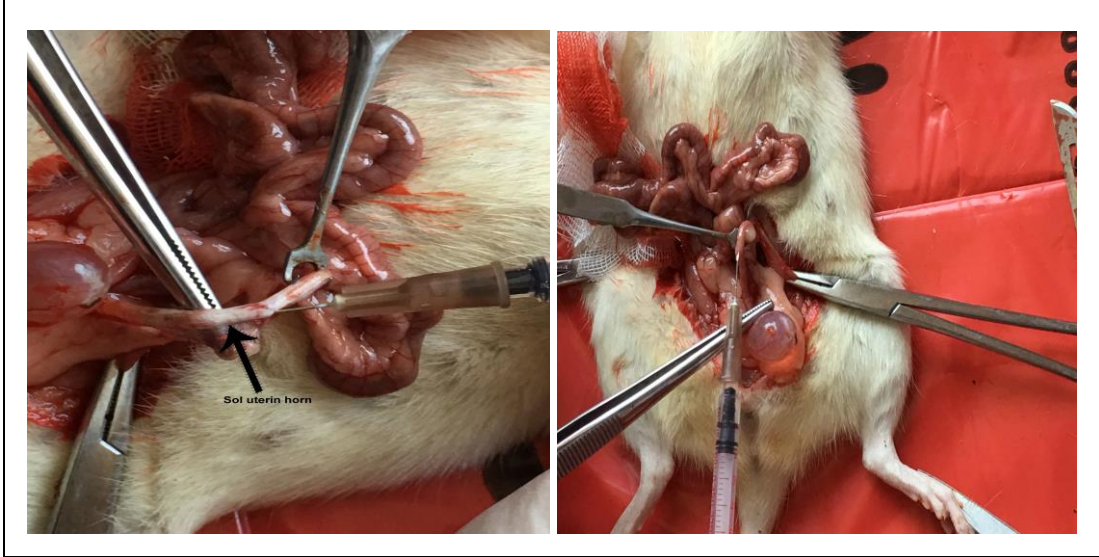
G1	G2	G3	G4
Asherman + BY (G1-1, n=5)	Asherman + Niş (G2-1, n=5)	Asherman + KİM KH (G3-1, n=5)	Asherman + KİM KH + Niş (G4-1, n=5),
Asherman + BY 12. gün implantasyon (G1-2, n=5)	Asherman + Niş 12. gün implantasyon (G2-2, n=5)	Asherman + KİM KH 12. gün implantasyon (G3-2, n=5)	Asherman + KİM KH + Niş 12. gün implantasyon (G4-2, n=5)
Asherman + BY yeni doğan (G1-3, n=5)	Asherman + Niş yeni doğan (G2-3, n=5)	Asherman + KİM KH yeni doğan (G3-3, n=5)	Asherman + KİM KH + Niş yeni doğan (G4-3, n=5)

Toplam her grupta 5 denek olmak üzere 60 dişi sıçan kullanıldı. Ayrıca kök hücre izole etmek için 3 adet erkek sıçan kurban edildi.

Tedaviden 10 gün sonra gruplardan alt birincileri grup denekler (G1-1, G2-1, G3-1, G4-1) kurban edilerek uterus dokuları alındı. Gruplardan alt ikinci grup denekler (G1-2, G2-2, G3-2, G4-2) gebelikleri belirlenerek 12. gün kurban edildi. Gruplardan alt üçüncü grup denekler (G1-3, G2-3, G3-3, G4-3) ise yeni doğanlar elde edilene kadar yaşatıldı. Üçüncü grupların morfolojik değerlendirmeleri sonunda AS oluşturulan anne denekler anestezi altında kurban edildi, yavrular ise deney hayvanlarına teslim edildi.



Tablo 5.5.1. Grupların oluşumu ve denek sayılarının dağılımı (Eksiler gruplarda deneyden sonra ölen hayvan sayılarını ifade etmektedir).



Resim 5.5.1. Deneysel Asherman modeli.

G1-1: Asherman + BY (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulandı. Deney oluşturulduktan sonra 10 gün boyunca 1ml besiyeri intraperitoneal (İP) olarak uygulandı. 10 Gün sonra bu grubun hayvanları sakrifiye edilerek sağ ve sol uterus dokuları fiksatife alınarak histolojik takibi yapıldı.

G1-2: Asherman + BY (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulandı. Deney oluşturulduktan sonra 10 gün boyunca 1ml besiyeri İP olarak uygulandı. 10 Gün sonra sitolojik smear bakılarak proöstrus ve östrus dönemindeki hayvanlar gebe kalmaları için erkek sıçanlarla aynı kafese konuldu. Erkeklerle aynı kafese konulduktan 1 gün sonra vaginal smear alınarak sperm varlığı tespit edilenler ve sperm görülen denekler gebe olarak kabul edildi. Gebeliğin 12. günü implantasyon değerlendirmesi için hayvanlar sakrifiye edilerek sağ ve sol uterin dokular fiksatife alındı.

G1-3: Asherman + BY (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulandı. Deney oluşturulduktan sonra 10 gün boyunca 1ml besiyeri İP olarak uygulandı. 10 Gün sonra sitolojik smear bakılarak proöstrus ve östrus dönemindeki hayvanlar gebe kalmaları için erkek sıçanlarla aynı kafese konuldu. Erkeklerle aynı kafese konulduktan 1 gün sonra vaginal smear alınarak sperm varlığı tespit edilenler ve sperm görülen denekler gebe olarak kabul edildi. Yeni doğanların morfolojik incelenmesi yapıldı.

G2-1: Asherman + Niş (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulandı. Deney oluşturulduktan sonra 10 gün boyunca

hücreleri uzaklaştırılmış 1ml 48 saatlik besiyeri (**niş**) İP olarak uygulandı. 10 Gün sonra bu grubun hayvanları sakrifiye edilerek sağ ve sol uterus dokuları fiksatife alınarak histolojik takibi yapıldı.

G2-2: Asherman + Niş (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulandı. Deney oluşturulduktan sonra 10 gün boyunca hücreleri uzaklaştırılmış 1ml 48 saatlik besiyeri (**niş**) İP olarak uygulandı. 10 Gün sonra sitolojik smear bakılarak proöstrus ve östrus dönemindeki hayvanlar gebe kalmaları için erkek sıçanlarla aynı kafese konuldu. Erkeklerle aynı kafese konulduktan 1 gün sonra vaginal smear alınarak sperm varlığı tespit edilenler ve sperm görülen denekler gebe olarak kabul edildi. Gebeliğin 12. günü implantasyon değerlendirmesi için hayvanlar sakrifiye edilerek sağ ve sol uterin dokular fiksatife alındı.

G2- 3: Asherman + Niş (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulandı. Deney oluşturulduktan sonra 10 gün boyunca hücreleri uzaklaştırılmış 1ml 48 saatlik besiyeri (**niş**) İP olarak uygulandı. 10 Gün sonra sitolojik smear bakılarak proöstrus ve östrus dönemindeki hayvanlar gebe kalmaları için erkek sıçanlarla aynı kafese konuldu. Erkeklerle aynı kafese konulduktan 1 gün sonra vaginal smear alınarak sperm varlığı tespit edilenler ve sperm görülen denekler gebe olarak kabul edildi. Yeni doğanların morfolojik incelenmesi yapıldı.

G3-1: Asherman + KİMKH (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulancaktır. Deney oluşturulduktan sonra, **KİMKH'ler** santrifüj edilerek yeni besiyerine eklenip 10 gün boyunca 1×10^6 /ml İP olarak uygulandı. 10 Gün sonra bu grubun hayvanları sakrifiye edilip sağ ve sol uterus dokuları fiksatife alınarak histolojik takibi yapıldı.

G3-2: Asherman + KİMKH (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulancaktır. Deney oluşturulduktan sonra, **KİMKH'ler** santrifüj edilerek yeni besiyerine eklenip 10 gün boyunca 1×10^6 /ml İP olarak uygulandı. 10 Gün sonra sitolojik smear bakılarak proöstrus ve östrus dönemindeki hayvanlar gebe kalmaları için erkek sıçanlarla aynı kafese konuldu. Erkeklerle aynı kafese konulduktan 1 gün sonra vaginal smear alınarak sperm varlığı tespit edildi ve sperm görülen denekler gebe olarak kabul edildi. Gebeliğin 12. günü implantasyon

değerlendirmesi için gebe hayvanlar sakrifiye edilerek sağ ve sol uterin dokular fiksatife alındı.

G3- 3: Asherman + KİMKH (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulancaktır. Deney oluşturulduktan sonra, **KİMKH'ler** santrifüj edilerek yeni besiyerine eklenip 10 gün boyunca 1×10^6 /ml İP olarak uygulandı. 10 Gün sonra sitolojik smear bakılarak proöstrus ve östrus dönemindeki hayvanlar gebe kalmaları için erkek sıçanlarla aynı kafese konuldu. Erkeklerle aynı kafese konulduktan 1 gün sonra vaginal smear alınarak sperm varlığı tespit edildi ve sperm görülen denekler gebe olarak kabul edildi. Yeni doğanların morfolojik incelenmesi yapıldı.

G4-1: Asherman + KİMKH + Niş (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulancaktır. Deney oluşturulduktan sonra, P3'te 48 saat bekletilmiş **KİMKH ve niş birlikte** 10 gün boyunca 1×10^6 /ml İP olarak uygulandı. 10 gün sonra bu grubun hayvanları sakrifiye edilip sağ ve sol uterus dokuları fiksatife alınarak histolojik takibi yapıldı.

G4-2: Asherman + KİMKH + Niş (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulancaktır. Deney oluşturulduktan sonra, P3'te 48 saat bekletilmiş **KİMKH ve niş birlikte** 10 gün boyunca 1×10^6 /ml ip olarak uygulandı. 10 Gün sonra sitolojik smear bakılarak proöstrus ve östrus dönemindeki hayvanlar gebe kalmaları için erkek sıçanlarla aynı kafese konuldu. Erkeklerle aynı kafese konulduktan 1 gün sonra vaginal smear alınarak sperm varlığı tespit edildi ve sperm görülen denekler gebe olarak kabul edildi. Gebeliğin 12. günü implantasyon değerlendirmesi için gebe hayvanlar sakrifiye edilerek sağ ve sol uterin dokular fiksatife alındı.

G4- 3: Asherman + KİMKH + Niş (n=5): Sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulancaktır. Deney oluşturulduktan sonra, P3'te 48 saat bekletilmiş **KİMKH ve niş birlikte** 10 gün boyunca 1×10^6 /ml İP olarak uygulandı. 10 Gün sonra sitolojik smear bakılarak proöstrus ve östrus dönemindeki hayvanlar gebe kalmaları için erkek sıçanlarla aynı kafese konuldu. Erkeklerle aynı kafese konulduktan 1 gün sonra vaginal smear alınarak sperm varlığı tespit edildi ve sperm görülen denekler gebe olarak kabul edildi. Yeni doğanların morfolojik incelenmesi yapıldı (**Tablo 3.6.1**).

5.6. Vajinal Yayma İşlemi

Siklus ve gebelik tespiti için dişi sıçanlardan saat 15.00-16.00 arasında vajinal smear yayma tekniği kullanıldı ve örnekler toplandı. Bu işlemi gerçekleştirmek için mikro pipete 0,5 ml serum fizyolojik çekildi. Pipet ucuyla vajinadan içeri serum fizyolojik püskürtüldü. Pipetin ucu çıkartılmadan, negatif basınç oluşturularak püskürtülen serum fizyolojik tekrar pipetin içine çekildi. Çekilen sıvı temiz bir lamın üzerine alındı ve metanol ile 5 dk tespiti yapıldı. Ardından hızlı hematoksilen ve eozin boyama yöntemiyle boyandı ve östrus siklus dönemleri sitolojik olarak ışık mikroskop (BX43, Olympus, Japan) altında değerlendirildi (Cora ve ark. 2015). Ayrıca gebelik oluşturulacak grupların denekleri bu yöntemle proöstrus ve östrus evresi belirlendikten sonra üç dişi sıçan ve bir erkek sıçan olmak üzere kafeslere alınarak çiftleşmeye bırakıldı. Ertesi gün gebelik için bırakılan dişilerden vajinal smear alındı ve H&E boyaması ile sperm varlığı tespit edilen sıçanların gebelik birinci günleri tespit edildi. Böylece implantasyon 12. gün deneklerden örneklerinin alınması için çizelge tutuldu.

5.7. Doku Örneklerinin Alınması ve Takibi

Sol uterin horna kimyasal uygulanarak Asherman oluşturulan birinci grupların uterus dokuları, tedavinin ardından (10 gün sonra) genel anestezi altında servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek alındı. Dokular, histokimyasal ve immünohistokimyasal incelemeler için %10'luk formalin solüsyonu ile 48 saat tespit edildi. Formalinde tespit edilen dokulardan, fiksatifin uzaklaştırılması için 1 gece akarsu altında yıkandı. Daha sonra dehidratasyon amacıyla 30'ar dakika %60, 70, 80 ve %100'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Sonra 15 dakika bire bir oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 30 dk iki değişim ksilende tutuldu ve 60°C'lik etüvde 15 dakika bire bir oranında ksilen-parafin uygulanıp 60 dk iki değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklara (**Tablo 5.7.1**) gömüldü.

Tablo 5.7.1. Parafin Takip Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
TESPİT	% 10 FORMALİN	48 SAAT
TESPİT SOLUSYONUNUN UZAKLAŞTIRILMASI	AKARSU	1 GECE
DEHİDRATASYON	% 50 ALKOL	30 DAKİKA
	% 60 ALKOL	30 DAKİKA
	% 70 ALKOL	30 DAKİKA
	% 80 ALKOL	30 DAKİKA
	% 90 ALKOL	1 SAAT
	% 95 ALKOL	1 SAAT
	% 100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL: KSİLEN (1:1)	30 DAKİKA
	KSİLEN	1 SAAT
	KSİLEN	1 SAAT
İNFİLTASYON (60°C ETÜVDE)	KSİLEN-PARAFİN (1:1)	30 DAKİKA
	PARAFİN	1 SAAT
	PARAFİN	1 SAAT
GÖMME	PARAFİN	

5.8. Histokimyasal Boyama

Dokuların gömüldüğü parafin bloklardan 4-5 µm'lik kesitler Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) ile alındı. Su banyosuna bırakılıp ardından lam üzerine alınan kesitler parafinin uzaklaştırılması için 1 gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dk olacak şekilde iki ksilen serisi uygulandı. Rehidratasyon işlemi yapılarak %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirildi ve 5 dakika akarsuda yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 2-5 dk boyamanın ardından, fazla boyayı dokudan uzaklaştırmak için 5 dk akarsuda yıkandı ve 1 dk Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Akarsuda yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilen ve daha sonra havada kurutulan kesitler, şeffaflaştırma işleminde 30 dk iki değişim ksilende tutulduktan ve entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (**Tablo 5.8.1**). Kamera ataçmanlı (SC50,

Olympus, Germany) ışık mikroskopunda (BX43, Olympus, Japan) fotoğrafları çekildi ve gruplar arasındaki farklılıklar anlamlılık değerlendirildi (Gürpınar ve ark. 2012).

Tablo 5.8.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN	30 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	2-5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	1 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	%80 ALKOL	1 DAKİKA
	%95 ALKOL	1 DAKİKA
	KSİLEN	30x2 DAKİKA
KAPATMA	ENTELLAN	

Masson Trikrom boyaması için; parafin bloklardan 4-5 µm'lik kesitler alındı. Lam üzerine alınan kesitler parafinin uzaklaştırılması için 1 gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dk olacak şekilde iki ksilen serisi uygulandı. Rehidratasyon işlemi yapılarak %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirildi ve 5 dakika distile suda yıkandı. Weighert's çalışma çözeltisinde 10 dk tutuldu. Weighert's çalışma çözeltisi için stok A ve stok B çözeltileri eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı. 10 dk akarsuda yıkandı. Biebrich Scarlet-Asit fuksin çözeltisi 15 dk uygulandı. Distile su ile çalkandıktan sonra Fosfomolibdik asit-fosfotungustik asit çözeltisinde 15 dakika tutuldu. Kesitler yıkanmadan anilin mavisi çözeltisi içine alınarak 5 dakika boyandı. Distile su ile çalkanan kesitler asetik asitte 1 dk tutuldu.

Daha sonra akarsuda yıkama yapılarak alkol serilerinden geçirildi ve ksilen içinde 1 saat bekletildi. Son olarak entellanla kapama işlemi gerçekleştirildi (**Tablo 5.8.2**).

Tablo 5.8.2. Masson- Trikrom Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN	30 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	5 DAKİKA
BOYAMA	WEİGHERT'S ÇALIŞMA ÇÖZELTİSİ: STOK A VE STOK B	10 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	10 DAKİKA
BOYAMA	BIEBRICH SCARLET-ASİT FUKSİN	15 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	5 DAKİKA
BOYAMA	FOSFOMOLİBDİK ASİT- FOSFOTUNGUSTİK ASİT	1 DAKİKA
BOYAMA	ANİLİN MAVİSİ	5 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	5 DAKİKA
	ASETİK ASİT	1 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	5 DAKİKA
	%80 ALKOL	1 DAKİKA
	%95 ALKOL	1 DAKİKA
	KSİLEN	1 SAAT
KAPATMA	ENTELLAN	

5.9. İndirekt İmmunohistokimyasal Boyama

Kesitler bir gece deparafinizasyon için 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30 dk iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Sonra azalan alkol serilerinden %95'ten %60'a rehidratasyon sağlamak için geçirildi ve ardından distile suda 10 dk bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırları çizildi ve %0,5'lik tripsin (800.729.8350, ScyTek, Utah, USA) solüsyonunda 37⁰C'de 15 dk tutuldu.

Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. 3x5 dk PBS ile yıkanan doku kesitleri bir saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırılarak yıkama yapılmadan primer antikolar anti-Stro-1 (MAB4315, Millipore), anti-c-Kit (sc-168, Santa Cruz Biotechnology), anti-Laminin (sc-5582, Santa Cruz Biotechnology), anti-Fibronektin (sc-18825, Santa Cruz Biotechnology), anti-L-Selektin (sc-13505, Santa Cruz Biotechnology), anti-TGFbeta-1 (sc-146, Santa Cruz Biotechnology), anti-VEGF (ab1316, Abcam), anti-PCNA (orb11245, Biorbyt), anti-eNOS (sc-654, Santa Cruz Biotechnology) ile +4⁰C 'de 18 saat yani bir gece inkübe edildi. Ertesi gün 3x5 dk PBS ile yıkanan kesitler, biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikoru (85-9043, Invitrogen® - Histostain Plus Bulk Kit, CA, USA) ile 30 dk boyandı. Ardından 3x5 dk PBS solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak için DAB ile 3-5 dk boyandı. Mayer's hematoksilenle (72804E, Microm, Walldorf, Germany) artalan boyaması yapıldı ve sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumunu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı (**Tablo 5.9.1**). Kamera ataçmanlı (SC50, Olympus, Germany) ışık mikroskopunda (BX43, Olympus, Japan) görüntüleri alındı. İmmunohistokimyasal pozitivite H-skor ile hesaplanarak gruplar arasındaki farklılık One-Way ANOVA testi ile değerlendirildi. (Gürpınar ve ark. 2012).

Tablo 5.9.1. İndirekt İmmunohistokimya Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60 °C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
PBS	PBS	3x5 DAKİKA
HAVUZCUK OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	TRİPSİN 37°C etüvde	15 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
BLOKLAMA	Bloklama solüsyonu	1 SAAT
PRİMERANTİKORLAR		18 SAAT+4°C
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	BIYOTINLE İŞARETLİ	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidine)	3-5 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3x5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPATMA	ENTEMLAN	

5.10. TUNEL Boyaması

Hücre ölümünün belirlenmesinde apoptotik hücreleri boyama olanağı sağlayan **Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling** (TUNEL, S7101, Millipore, USA) yöntemi kullanıldı. Alınan kesitler deparafinizasyon işlemini takiben önce distile suda daha sonra 3x5 dk PBS solüsyonu ile yıkandı. Sonra PBS solüsyonu ile 1/500 oranında seyreltilen 20-µg/ml Proteinaz-K oda sıcaklığında 15 dk uygulandı.

PBS ile yıkamayı takiben 5 dk %3'lük H₂O₂ ile muamele edildikten sonra yeniden 3x5 dk PBS ile yıkandı. Örnekler Equilibration buffer ile oda ısısında 5 dk tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli ortamda 37⁰C de 1 saat bekletildi. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dk ve sonra Antidioksinin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dk muamele edilen örnekler 3x5 dk PBS ile yıkandı. Ardından DAB ile boyaması yapıldı, ardından distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı (**Tablo 5.10.1**). Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptandı ve ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi (Gürpınar ve ark. 2012).

Tablo 5.10.1. TUNEL Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60 °C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	PBS	3x5 DAKİKA
HAVUZCUK OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	PROTEİNAZ-K (oda ısısında)	15 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
EQUILIBRATION BUFFER		5 DAKİKA
ENZİM	Tdt ENZİMİ (37°C etüvde)	1 SAAT
STOP WASH BUFFER		10 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x1 DAKİKA
ANTI-DİOKSİGENİN	PEROKSİDAZ KONJUGATI	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
BOYAMA	DAB	10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3x5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPATMA	ENTELLAN	

5.11. İstatistik

Çalışmamızın birinci gruplarından elde edilen bulgularda inflamasyon, fibrozis, bez sayısı ve endometrial kalınlık H&E ve Masson- Trikrom boyamalarıyla belirlenerek istatistiksel anlamlılıklar tespit edildi. Değerlendirmede 0= çok az inflamasyon ve az fibrozis, 1= az inflamasyon ve orta fibrozis, 2= orta inflamasyon ve çok fibrozis, 3= çok inflamasyon ve çok fazla fibrozis olarak incelendi ve istatistiksel farklılıklar belirlendi (Gan ve ark., 2017).

İkinci grupların sağ ve sol hornlarındaki implante olmuş embriyo sayıları belirlendi ve istatistiği yapıldı. Üçüncü grupların ise yeni doğan sayıları belirlenerek morfolojik değerlendirme yapıldı ve gruplar arasındaki anlamlılık belirlendi. Ayrıca immunohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi; hücrelerin %1'den azında boyanma varsa 0; hücrelerin %1- 10'unda boyanma varsa 1+; hücrelerin %11-50'sinde boyanma varsa 2+; hücrelerin %51-80'inde boyanma varsa 3+; hücrelerin %80'inden fazlasında boyanma varsa 4+ olarak değerlendirildi. Ayrıca boyanma şiddeti 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun olarak kör yöntemle belirlendi. Sonra “ $(1+\text{boyanma şiddeti}/3) \times \text{boyanma oranı}$ ” formülü ile toplam skor hesaplandı. Sonuçta elde edilen veriler One Way-ANOVA Tukey istatistik testiyle karşılaştırıldı ve $p < 0,05$ sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Gürpınar ve ark. 2012).

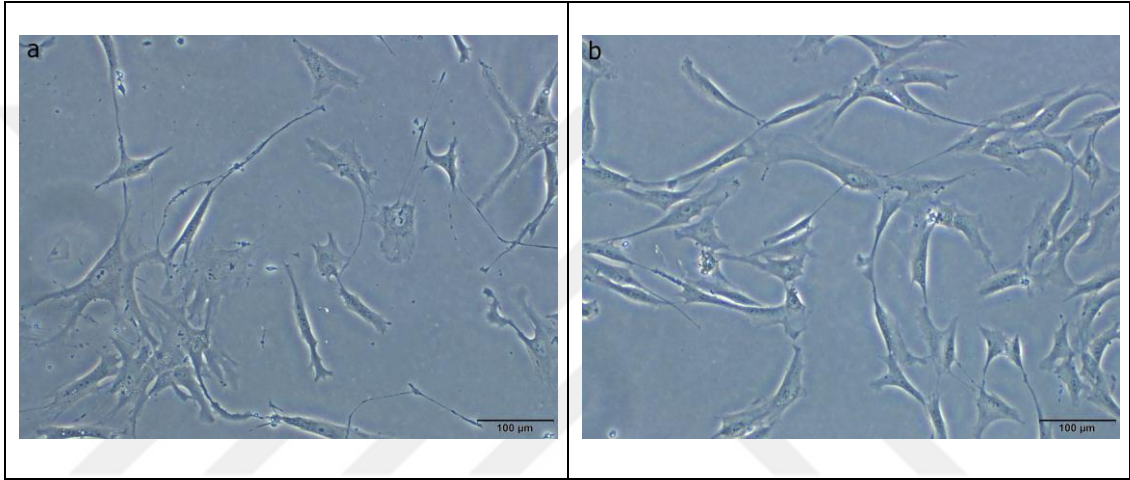
5.12. Histolojik İnceleme

Doku takibi yapılarak 4-5 μm 'lik kesitler alınan dokular hematoksilin ve eozinle boyandıktan sonra kantitatif görüntü işleme yazılımı (ImageJ- [NIH Image](#)) kullanılarak endometriyal kalınlık belirlendi. Endometrial kalınlık ölçümleri, her bir kesitin lateral kenarlarından elde edildi; ölçüm sonucu lümen yüzeyleri ve seröz membranlar arasındaki dikey mesafeler olarak tanımlandı. Ayrıca bez sayıları, stromadaki bez bolluğunun olduğu noktalar belirlenerek rastgele dört alandan sayım yapılarak ortalaması alınarak belirlendi. Bununla beraber H&E'le boyanan kesitlerde inflamasyon ve masson trikrom boyanan kesitlerde fibrozisin yoğun olduğu alanlar tespit edilerek histolojik skorlama üzerinden semikantitatif olarak değerlendirildi.

6.BULGULAR

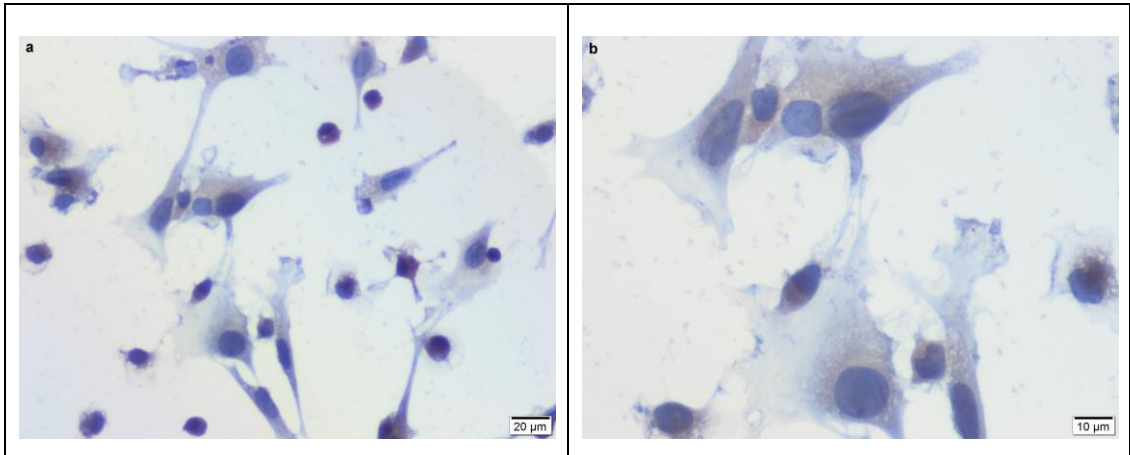
6.1. KİMKH Tanımlanması

Hücre kültüründe sıçan tibia ve femur bölgesinden toplanan KİMKH besiyeri içerisinde konfluent olana kadar kültürü yapıldı. Hücrelere üçüncü pasaja kadar pasajlama işlemi yapıldıktan sonra tedavi için yeterli hücre yoğunluğunun olduğu tespit edildi. İnverted mikroskopta incelendiğinde hücrelerin fibroblast benzeri iğ şeklinde olduğu ve hücre çekirdeğinin ortada yerleşim gösterdiği görüldü (**Resim 6.1.1**).



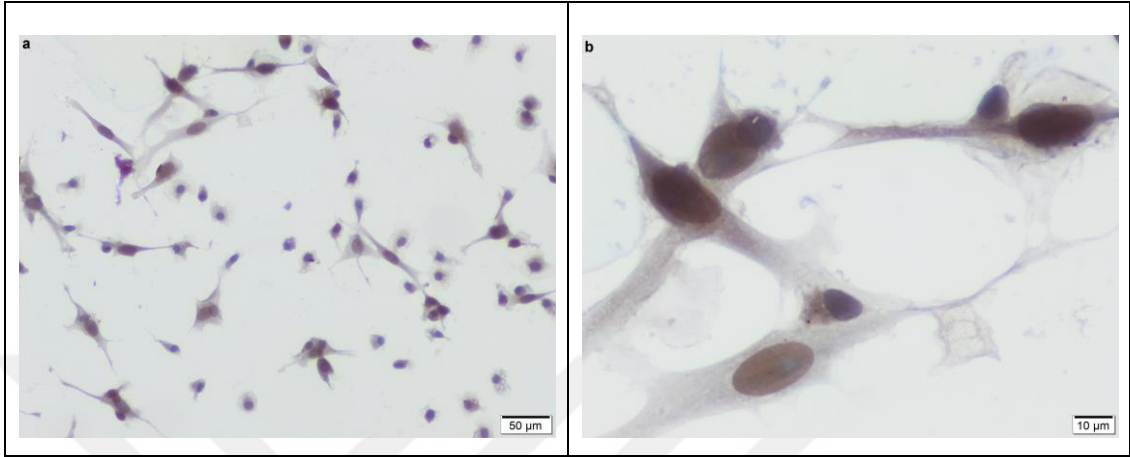
Resim 6.1.1. KİMKH'lerin kültür ortamında yerleşip, çoğalmış 4. pasajdaki hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri.

Hücre kültüründe dördüncü pasajdaki KİMKH'ler kültür kabında konfluent olduğunda kök hücre belirteçleri olarak Stro-1 (**Resim 6.1.2**) ve c-kit aktivitesi pozitiflik (**Resim 6.1.3**) açısından immunohistokimyasal olarak doğrulandı.



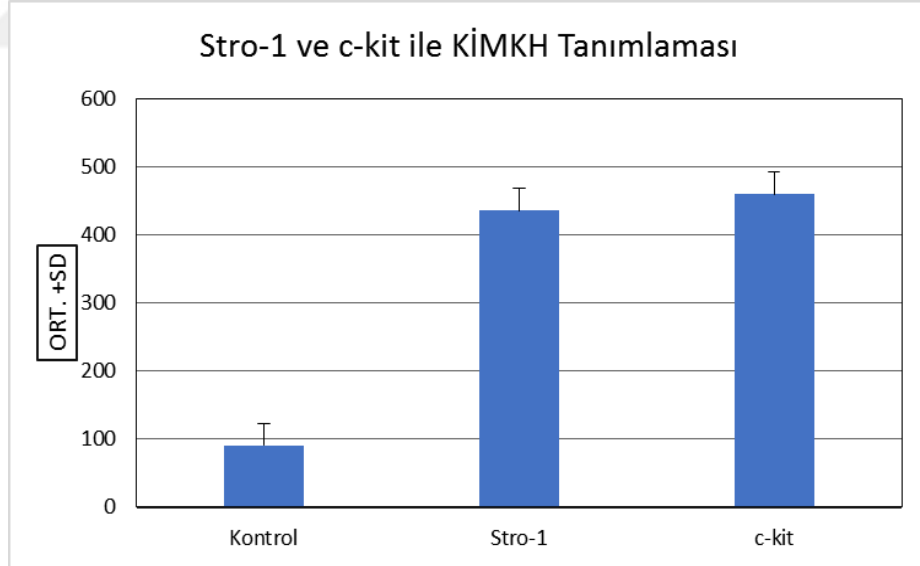
Resim 6.1.2. KİMKH'lerin Stro-1 antikor ile boyanmış pozitif immunohistokimya görüntüleri.

Dördüncü pasajdaki KİMKH'lerin immunohistokimyasal sonuçları One Way-ANOVA Tukey testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Stro-1 ve c-kit immunoreaktivitesinin kontrol boyamaya göre anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) arttığı tespit edildi (**Tablo 6.1.1**).



Resim 6.1.3. c-kit antikor ile boyanmış KİMKH'lerin pozitif immunohistokimya görüntüleri.

Tablo 6.1.1. KİMKH'lerin c-kit ve Stro-1 ile boyanma sonucunda H-skorlama ile analizinde tanımlamaları doğrulandı, KONT: Boyama kontrolü.

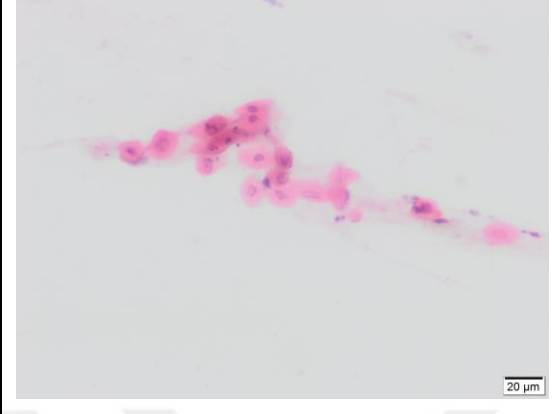

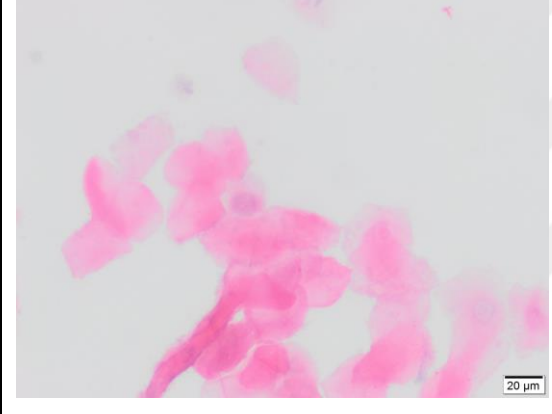

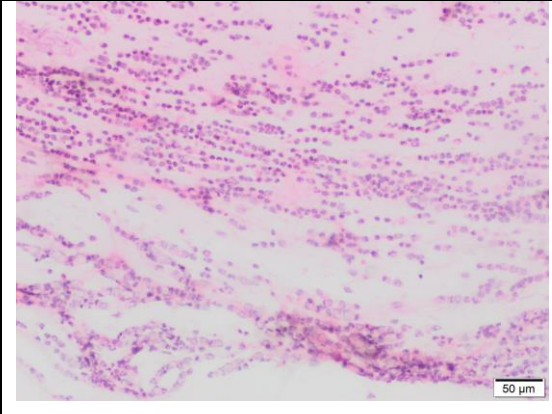
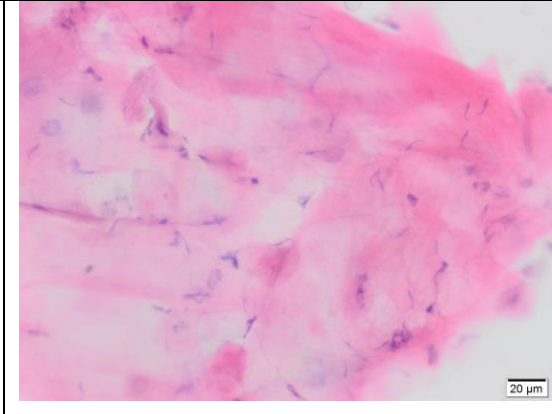


Kont vs Stro-1 *** $p<0,001$

Kont vs c-kit *** $p<0,001$.

6.2.Vajinal Yayma Bulguları

Vajinal yayma işlemi ikinci gruplarımızda oluşturduğumuz gebeliklerin günlerini belirlemek için yapıldı. Bu nedenle AS oluşturulmuş ve 10 günlük besiyeri, niş, kök hücre ve kök hücre+niş tedavileri tamamlanmış sıçanlar proöstrus ve östrus siklusları belirlendikten sonra erkek sıçanlarla aynı kafeslere alındılar. Ertesi gün tekrar vajinal yayma yapılarak çiftleşmenin olup olmadığı yaymada tespit edilen sperm varlığına göre yapıldı. Vajinal yaymalarında sperm gözlemlediklerimiz denkeleri gebe kabul ettik ve 12. gün genel anestezi altında sakrifiye ederek implantasyon sayılarını belirlemeye çalıştık. Vajinal yaymalarda sıçan spermelerinin kanca şeklinde baş ve uzun bir kuyruk yapısı olduğu gözlemlendi. Sperm gözlemlediğimiz vajinal yayma preparatlarındaki hayvanların hepsinin gebe oldukları deney sonlandırılırken gözlemlendi. Grupların ikinci ve üçüncü alt grupları vajinal yayma preparatlarındaki sperm bulgularına göre kategorize edildiler. Bununla beraber yaymanın parlak renkte olduğu, intermedier hücrelerin yoğun, parabazal hücrelerin ve mukusun nadir görüldüğü preparatların proöstrus grubuna ait yayma olduğu belirlendi. Keratinleşmiş süperfisiyal hücrelerden oluşan grubun östrus grubu yaymaların ait olduğu tespit edildi. Sitoplazmik vakuollerin yer aldığı sıkıca paketlenmiş çok sayıda nükleuslu epitel hücresi ve çok sayıda artmış nötrofil gözlenen grubun metöstrus siklusundaki sıçanlara ait olduğu belirlendi.

VAJİNAL YAYMA	
ÇİFTLEŞMEDEN ÖNCE	ÇİFTLEŞMEDEN SONRA
PROÖSTRUS	1.GÜN GEBELİK
	
ÖSTRUS	1. GÜN GEBELİK
	
METÖSTRUS	1. GÜN GEBELİK
	

Resim 6.2.1. Asherman sendromu modeli oluşturulan grupların vajinal yayma preparatlarının ışık mikroskop ile değerlendirilme sonuçları, H&E.

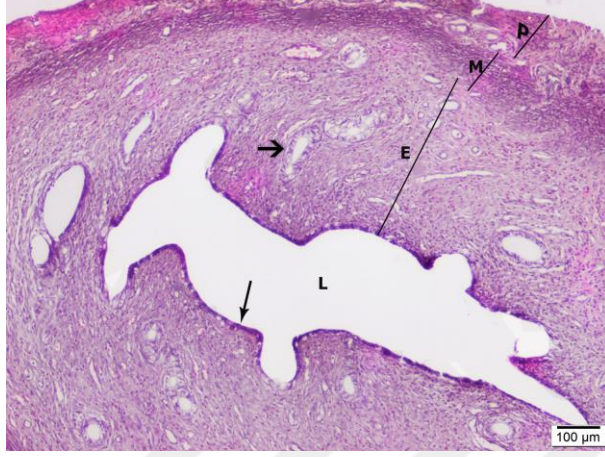
6.3. Gebelik Oluşturmayan Grupların Histokimyasal Bulguları

İmplantasyon başarısızlık modeli olarak AS modeli oluşturduğumuz deneysel modelimizin birinci gruplarında hem sağ ve sol uterin hornlar hemde gruplar kendi aralarında karşılaştırılarak değerlendirildi. Çalışmamızda sol uterin hornları asitle muamele edilerek hasar oluşturulan sıçanlara intraperitoenal olarak 10 gün boyunca farklı tedavi ajanları uyguladık ve 10 gün sonra endometriyumlarında meydana gelen değişiklikleri ışık mikroskop altında değerlendirdik. Rutin histokimyasal boyamalardan H&E ve Masson-Trikrom boyaıyla boyandılar ve uygulamalar sonunda dokularda meydana gelen morfolojik, histolojik ve fonksiyonel değişiklikler incelendi (**Resim 6.3.1**). Çalışmada tüm denek gruplarında tek taraflı Asherman modeli oluşturuldu (Kılıç ve ark., 2014). Sol uterin horn asetik asitle muamele edilerek hasar oluşturulurken sağ uterin horn ise kontrol olarak tutuldu ve herhangi bir kimyasalla ya da mekanik unsurla hasar meydana getirilmedi. AS oluşturulduktan sonra tedavi amaçlı ajanlar 10 gün aralıksız uygulandı. Uygulamalardan 10 gün sonra uterus örnekleri alınarak endometriyum kalınlığı, stromadaki bez sayısı, infalamasyon ve fibrozis açısından sonuçları incelendi. Besiyeri ve niş uygulanan (G1-1, G2-1) gruplarımızda endometriyumun yoğun bir şekilde dejenere olduğu, sineşi alanlarının aşırı arttığı, bez sayısının sadece KİMKG ve KİMKG ile nişinin birlikte (G3-1 ve G4-1) uygulandığı gruplara göre anlamlı şekilde azaldığı ($p < 0,001$) gözlemlenmiştir. BY ve niş uygulanan grupların endometriyum epitelinin ortadan kalktığı, lamina propriyasında ise yoğun fiböz alanların olduğu izlenmiştir. Yine bu gruplarda bezlerin hem sayısında düşüş hemde bez epitelinin tübüler yapısının bozulduğu görülmüştür (**Resim 6.3.1**). Ayrıca inflamasyonun BY (G1-1) ve niş (G2-1) verilen gruplarda yoğun olarak izlendiği, KİMKG (G3-1) ve KİMKG ile nişinin (G4-1) birlikte verildiği gruplara göre istatistiksel olarak da anlamlı farkların olduğu belirlenmiştir ($p < 0,0001$). İnflamasyon açısından KİMKG (G3-1) ve KİMKG + niş (G4-1) uygulanan gruplar arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). KİMKG ve KİMKG ile nişinin birlikte uygulandığı gruplarda inflamasyon, fibrozis, bez sayısı ve endometriyal kalınlık açısından BY ve niş verilen gruplara göre önemli histolojik değişimler belirlenmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlılıklar tespit edilmiştir.

ALT BİRİNCİ GRUPLARIN TEDAVİ UYGULAMALARI

SAĞ UTERİN HORN

(E: Endometriyum, M: Miyometriyum, P: Perimetriyum, L: Lümen, kısa ok: endometrial bez, uzun ok: epitel)



SOL UTERİN HORN

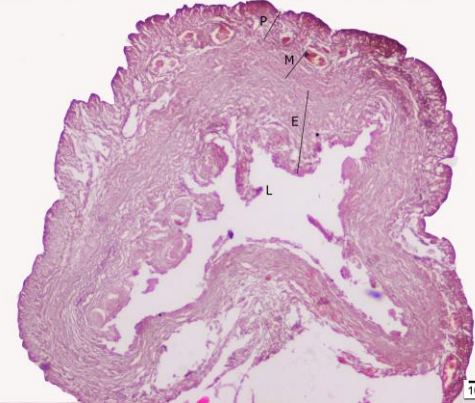
BY (G1-1)

(E: Endometriyum, M: Miyometriyum, P: Perimetriyum, L: Lümen, kısa ok: sineşi, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)



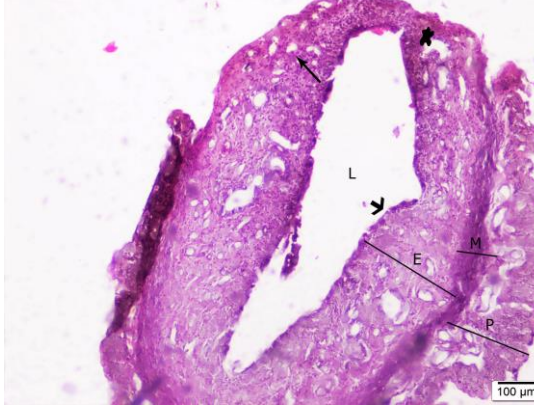
NİŞ (G2-1)

(E: Endometriyum, M: Miyometriyum, P: Perimetriyum, L: Lümen)



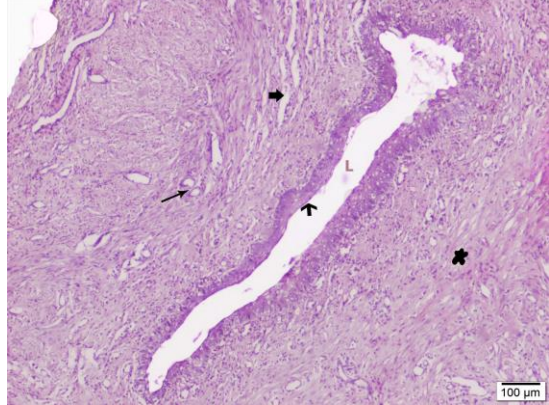
KİMKH (G3-1)

(E: Endometriyum, M: Miyometriyum, P: Perimetriyum, L: Lümen, kısa ok: epitel, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)

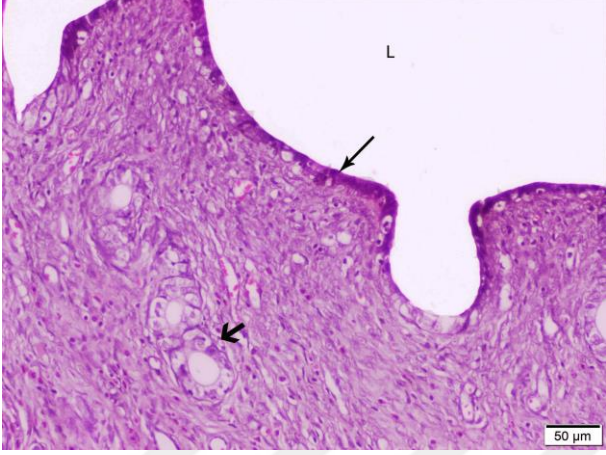
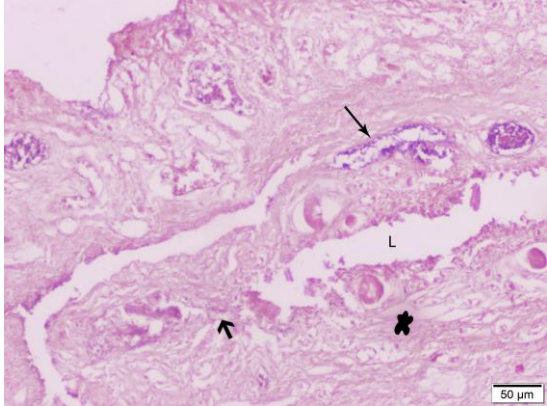
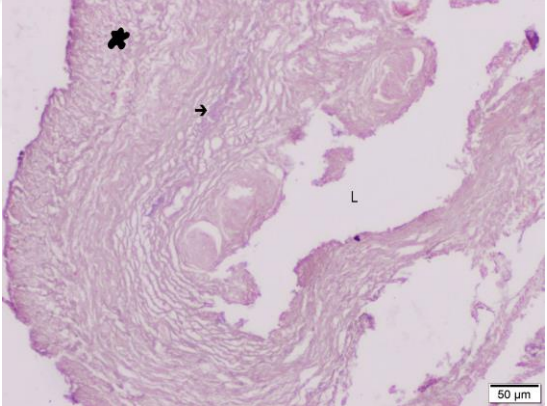
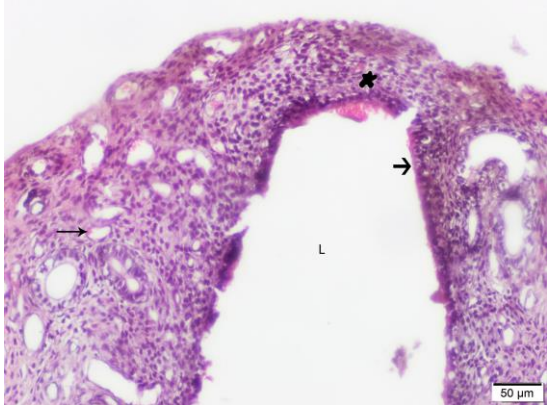
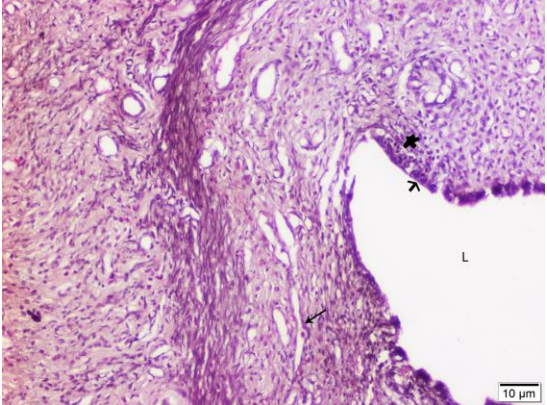


KİMKH+NİŞ (G4-1)

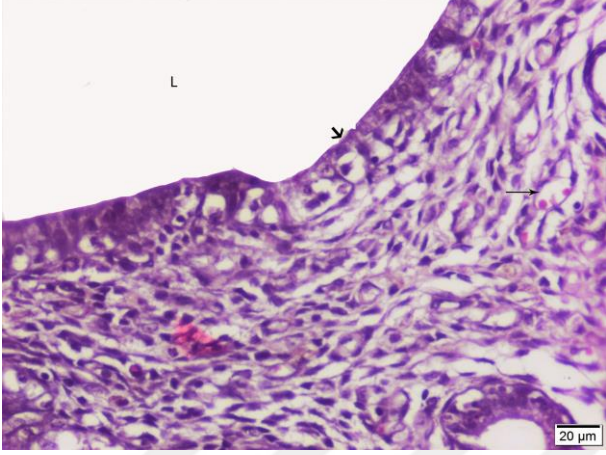
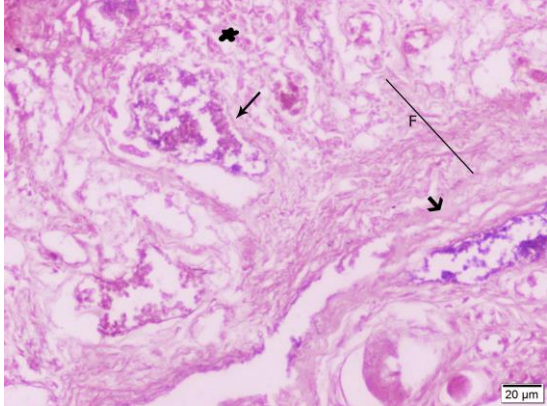
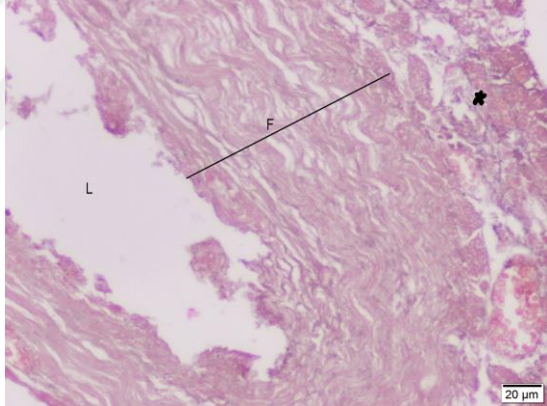
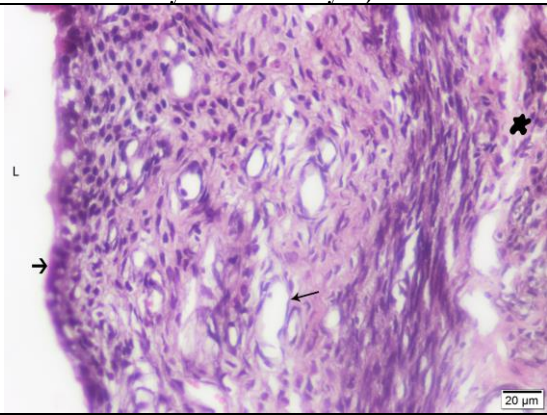
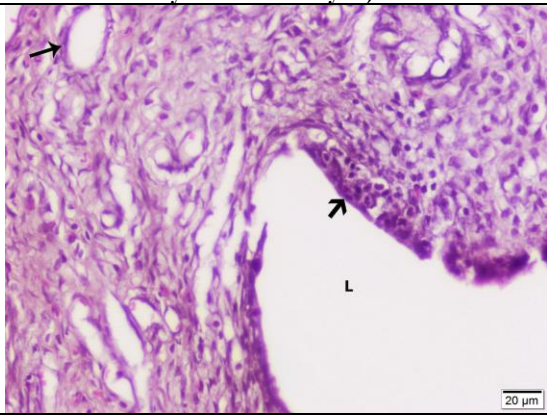
(E: Endometriyum, M: Miyometriyum, P: Perimetriyum, L: Lümen, kısa ok: epitel, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)



Resim 6.3.1. Alt birinci grupların tedavi uygulaması sonrası endometriyumun görüntüleri, H&E.

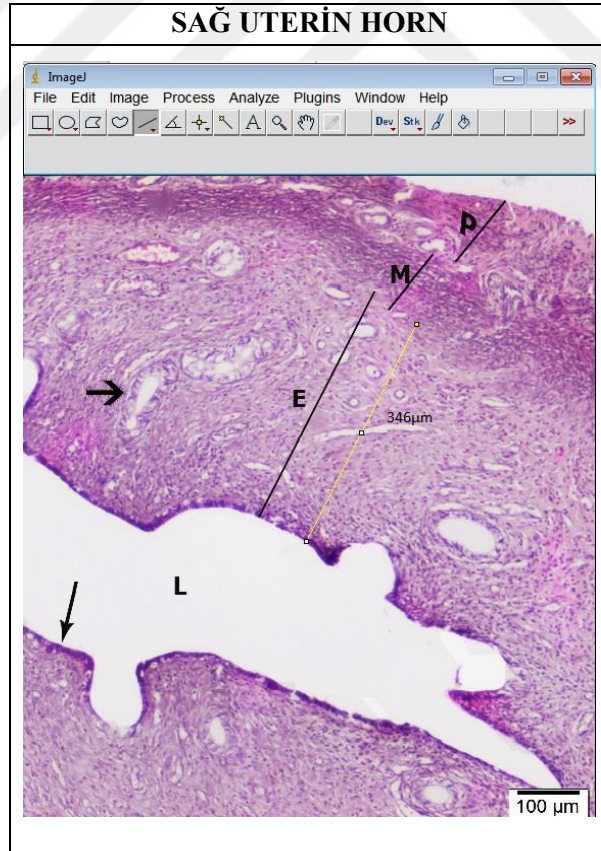
ALT BİRİNCİ GRUPLARIN TEDAVİ UYGULAMALARI	
SAĞ UTERİN HORN (L: Lümen, kısa ok: endometrial bez, uzun ok: epitel)	
	
SOL UTERİN HORN	
BY (G1-1) (L: Lümen, kısa ok: sineşi, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)	NİŞ (G2-1) (Kısa ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon, L: lümen)
	
KİMKH (G3-1) (L: Lümen, kısa ok: epitel, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)	KİMKH+NİŞ (G4-1) (L: Lümen, kısa ok: epitel, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)
	

Resim 6.3.2. Alt birinci grupların tedavi uygulaması sonrası endometriyumun görüntüleri, H&E.

ALT BİRİNCİ GRUPLARIN TEDAVİ UYGULAMALARI	
SAĞ UTERİN HORN (L: Lümen, kısa ok: epitel, uzun ok: kan damarı)	
	
SOL UTERİN HORN	
BY (G1-1) (L: Lümen, kısa ok: sineşi, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)	NİŞ (G2-1) (F: Fibrozis, yıldız: inflamasyon, L: lümen)
	
KİMKH (G3-1) (L: Lümen, kısa ok: epitel, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)	KİMKH+NİŞ (G4-1) (L: Lümen, kısa ok: epitel, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)
	

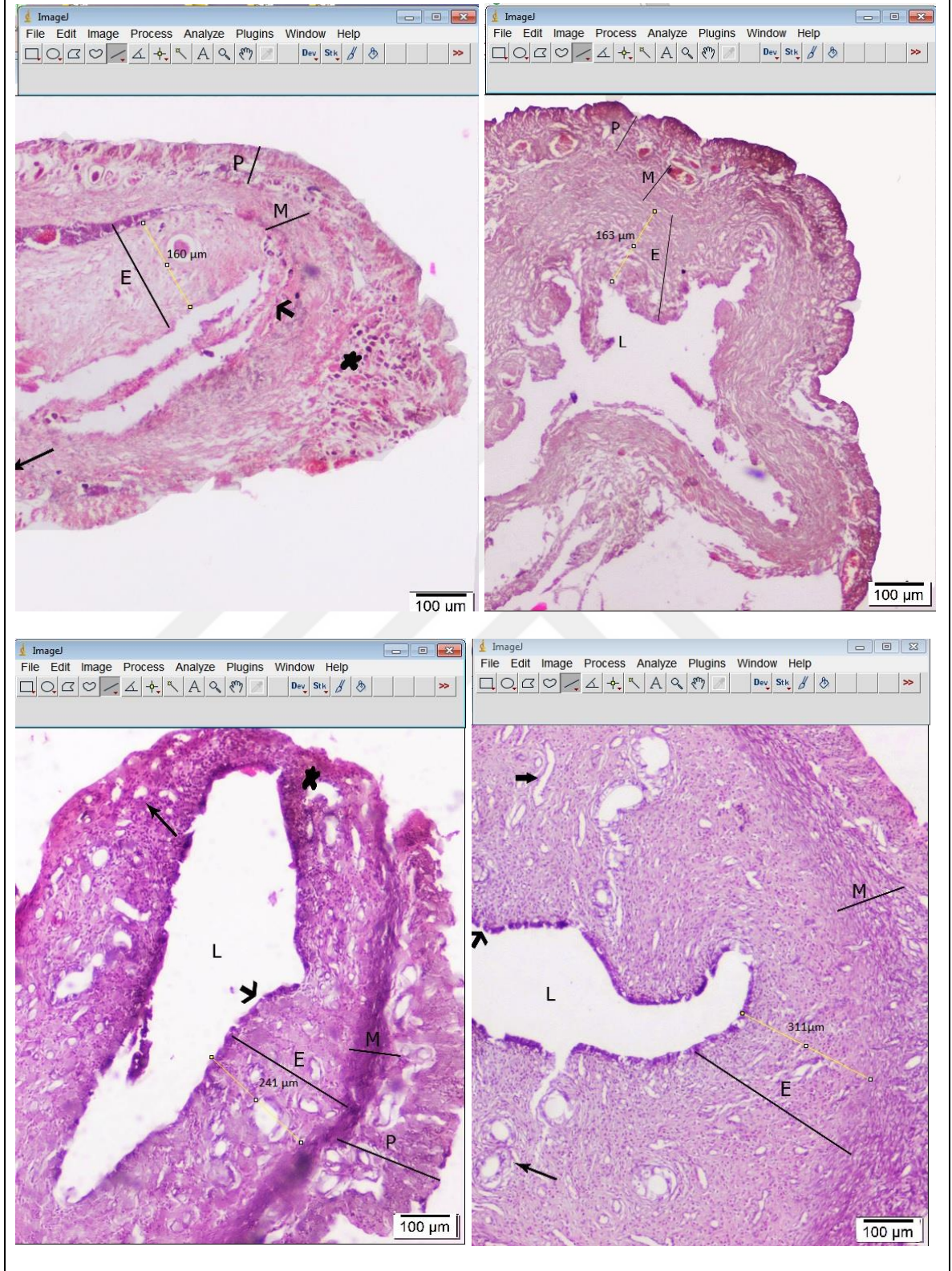
Resim 6.3.3. Alt birinci grupların tedavi uygulaması sonrası endometriyumun görüntüleri, H&E.

Gruplardan elde edilen uterus kesitlerinin, H&E boyanarak mikroskop değerlendirilmesinde, AS modelinde epitelin sineşiler nedeniyle büyük bölümünün ortadan kaybolduğu, endometriyum yüzey epitelinin tedavi gruplarından KİMKH (G3-1) ve KİMKH ile nişi (G4-1) birlikte uygulanan grupta çok fazla olmak üzere rejenerasyonun başladığı, düzgün tek katlı prizmatik yapıya dönüştüğü, BY (G1-1) ve Niş (G2-1) tedavisi uygulanan gruplarda ise rejenerasyonun hemen hemen gerçekleşmediği gözlemlenmiştir (**Resim 6.3.4 ve Resim 6.3.5**). Niş (G2-1) grubundan bazı deneklerde sol uterin hornun kalın bağırsakla yapıştığı, benzer şekilde BY (G1-1) sol uterin hornlarının da bazı deneklerde peritona yapıştığı görülmüştür. Yine BY (G1-1) ve Niş (G2-1) gruplarının stromal bezlerinde ve kan damarlarında belirgin azalma olduğu gözlemlendi. KİMKH (G3-1) ve özellikle KİMKH+Niş (G4-1) gruplarında kök hücre uygulamasının stromal bezlerin sayısında ve vaskülarizasyonda belirgin şekilde artışa sebep olduğu görüldü (**Resim 6.3.2, Resim 6.3.3**).



Resim 6.3.4. Sağ birinci alt grubun İmagJ programı ile yapılmış endometriyum kalınlığı ölçümü.

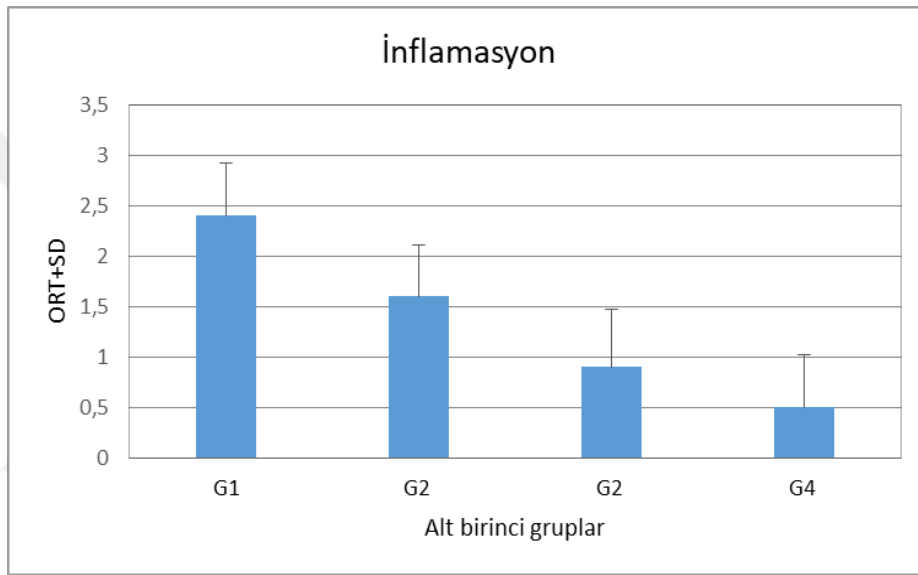
SOL UTERİN HORNLAR



Resim 6.3.5. Sol birinci alt grupların (G1-1, G2-1, G3-1, G4-1) İmagJ programı ile yapılmış endometriyum kalınlığı ölçümleri.

Sağ ve sol birinci alt grupların hepsinde endometriyum kalınlığı, lamina propriyadaki endometriyal bez sayısı ve inflamasyon açısından değerlendirme yapılarak gruplar arasındaki farklılıklar SPSS programında tek yönlü varyans analiz yöntemlerinden biri olan One-Way ANOVA Tukey testi ile istatistiksel olarak ortaya konulmuştur. Tüm parametrelerde KİMKGH + niş (G4-1) ve sadece KİMKGH (G3-1) uygulamaları sonrası endometriyal kalınlığın ve bez sayısının arttığı, inflamasyonun ise azaldığı belirlenmiştir.

Tablo 6.3.1. Alt birinci grupların inflamasyon oranı.



BY (G1-1) vs NİŞ (G2-1) **p<0,01,

BY (G1-1) vs KİMKGH (G3-1) **p<0,001

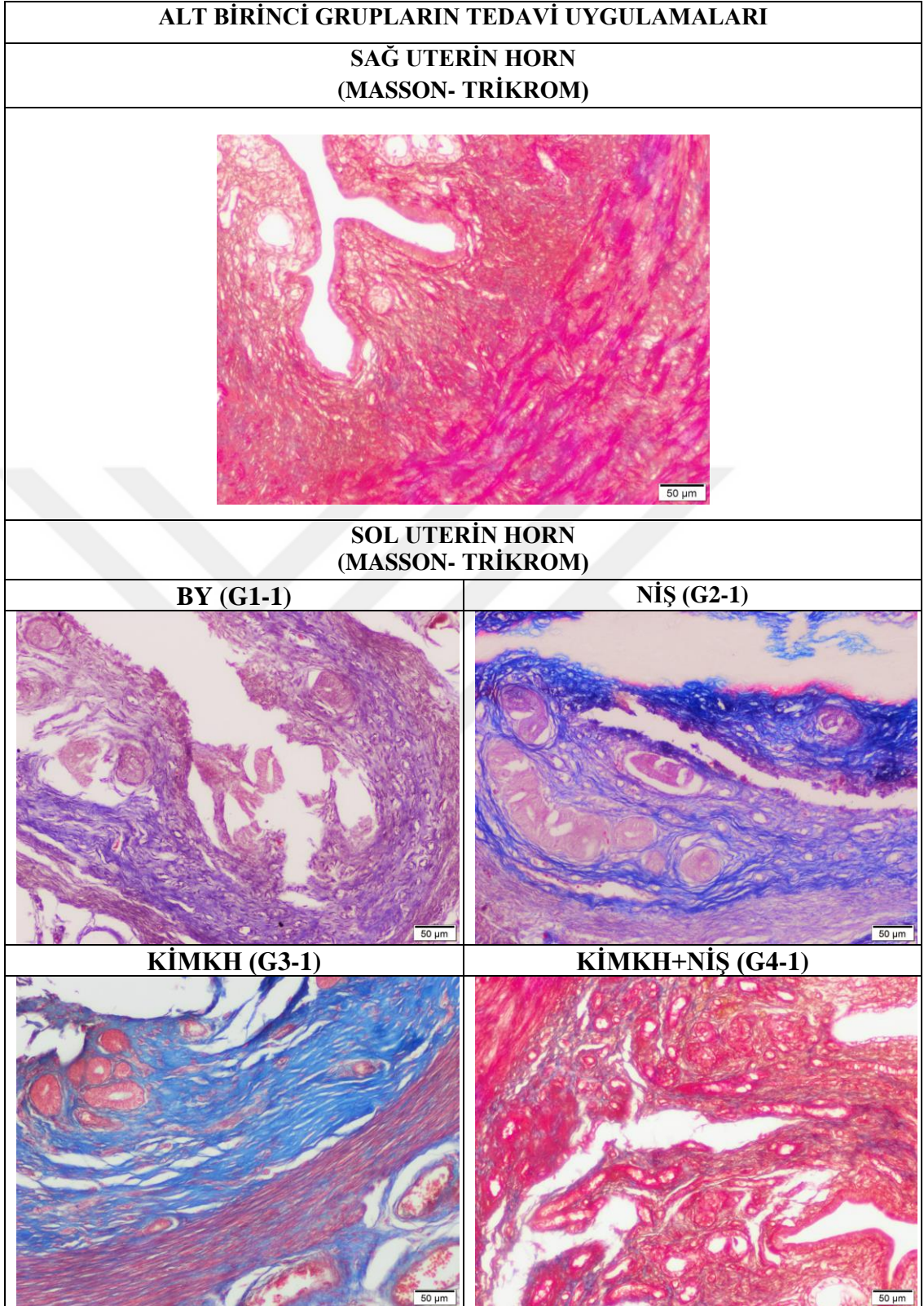
BY (G1-1) vs KİMKGH+NİŞ (G4-1) ****p<0,0001,

NİŞ (G2-1) vs KİMKGH (G3-1) *p<0,05

NİŞ (G2-1) vs KİMKGH+NİŞ (G4-1) **p<0,001,

KİMKGH (G3-1) vs KİMKGH+NİŞ (G4-1) p>0,05

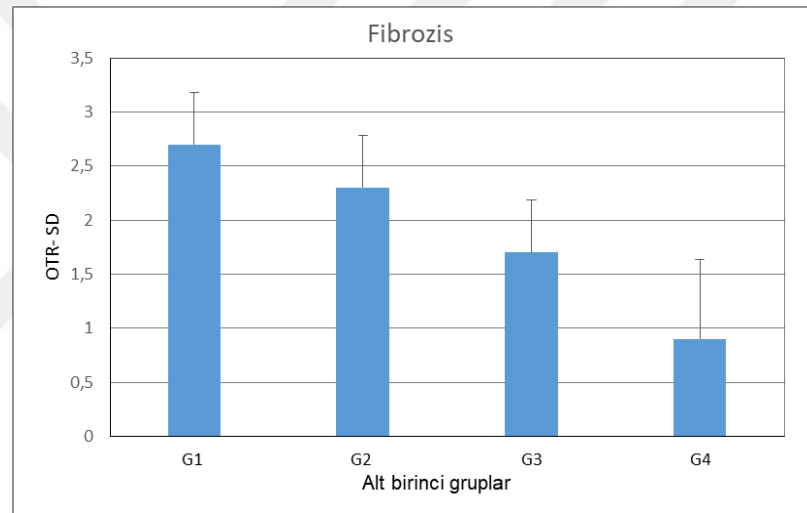
İnflamasyon açısından gruplar arasındaki istatistiksel (**Tablo 6.3.1**) olarak en fazla anlamlılık BY (G1-1) ve KİMKGH+ Niş (G4-1) grupları arasında (**p<0,0001), sonrasında Niş (G2-1) ile KİMKGH +Niş (G4-1) ve BY (G1-1) ile KİMKGH (G3-1) (**p<0,001) arasında olarak belirlenmiştir. Niş (G2-1) ile KİMKGH (G3-1) arasında inflamasyon yönünden *p<0,05 olarak tespit edilmiştir. KİMKGH (G3-1) ve KİMKGH + Niş (G4-1) grupları arasında inflamasyon yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).



Resim 6.3.6. Sol birinci alt grupların histokimyasal boyamayla fibröz alanların gösterildiği görüntüler, Masson-Trikrom.

Asherman deneysel modellerinde epitel dokudaki yapışıklıklar sonucunda lamina propriyadaki fibroblastların aşırı kollajen sentezlemesi sonucu fibröz bir yapıya dönüştüğü bildirilmektedir (Gan ve ark., 2017). Çalışmamızda tedavi grupları arasında fibrozis açısından farklılıklar olduğunu gözlemledik. Özellikle BY (G1) ve Niş (G2) gruplarında fibrozisin en fazla arttığı KİM KH (G3) grubunda biraz daha azaldığı ve KİM KH +Niş (G4) grubunda kontrol olarak tutulan sağ uterin hornların fibröz alanlarına benzer fibrotik alanlar oluşturduğu görülmüştür. Fibrozisi göstermek için histokimyasal boyalardan üçlü boyama olan Masson- trikrom boyaması yapılmıştır (**Resim 6.3.6**).

Tablo 6.3.2. Alt birinci grupların fibrozis oranları.



BY (G1-1) vs NİŞ (G2-1) $p > 0,05$,
 BY (G1-1) vs KİM KH (G3-1) $**p < 0,01$
 BY (G1-1) vs KİM KH+NİŞ (G4-1) $****p < 0,0001$,
 NİŞ (G2-1) vs KİM KH (G3-1) $p > 0,05$
 NİŞ (G2-1) vs KİM KH+NİŞ (G4-1) $****p < 0,0001$,
 KİM KH (G3-1) vs KİM KH+NİŞ (G4-1) $*p < 0,05$

Fibrozis açısından (**Tablo 6.3.2**) gruplar karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak en fazla anlamlılık BY (G1) ile KİM KH + Niş (G4) ve Niş (G2) ile KİM KH + Niş (G4) arasında $***p < 0,0001$, sonrasında BY (G1) ile KİM KH (G3) $**p < 0,01$ ve en az anlamlılık KİM KH (G3) ile KİM KH+Niş (G4) arasında $*p < 0,05$ tespit edilmiştir. BY (G1) ile Niş (G2) ve Niş (G2) ile KİM KH (G3) grupları arasındaki p değeri $p > 0,05$ olarak belirlendiğinden bu gruplar arasında fibrozis yönünden anlamlı fark bulunamamıştır.

Tablo 6.3.3. Alt birinci grupların fibrozis, inflamasyon, endometriyal kalınlık ve bez sayıları.

	<i>İnflamasyon</i>	<i>Fibrozis</i>	<i>Endometrial kalınlık</i>	<i>Bez sayısı</i>
<i>BY (G1)</i>	2,4 ± 0,51	2,7 ± 0,48	138,72 ± 26	5 ± 2
<i>NİŞ (G2)</i>	1,6 ± 0,51	2,3 ± 0,48	154,24 ± 26	5 ± 1
<i>KİMKEH (G3)</i>	0,9 ± 0,56	1,7 ± 0,48	228,96 ± 26	10 ± 2
<i>KİMKEH-NİŞ (G4)</i>	0,5 ± 0,52	0,9 ± 0,73	315,35 ± 32	14 ± 3
<i>Sağ horn</i>	0,2 ± 0,30	0,7 ± 0,53	333,15 ± 18	16 ± 3

İnflamasyon, endometriyal kalınlık, fibrozis ve bez sayısı açısından ölçümler (Tablo 6.3.3) ve semikantitatif analizler sonucu alt birinci grupların ortalama ve standart sapma değerleri karşılaştırıldığında inflamasyon ve fibrozisin BY (G1-1) ve NİŞ (G2-1) gruplarında yükseldiği, diğer gruplarda sağ uterin horn değerlerine yaklaştığı görülürken, bez sayısı ve endometriyal kalınlığın yine BY ve NİŞ gruplarında azaldığı, tedavilerinde kök hücre içeren gruplarda KİMKEH (G3-1) ve KİMKEH+ NİŞ (G4-1) ise yükseldiği saptanmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri üzerinden BY ile NİŞ grupları arasında anlamlı fark bulunmazken, BY (G1-1) ve NİŞ (G2-1) ile KİMKEH (G3-1) ve KİMKEH+NİŞ (G4-1) grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiştir.

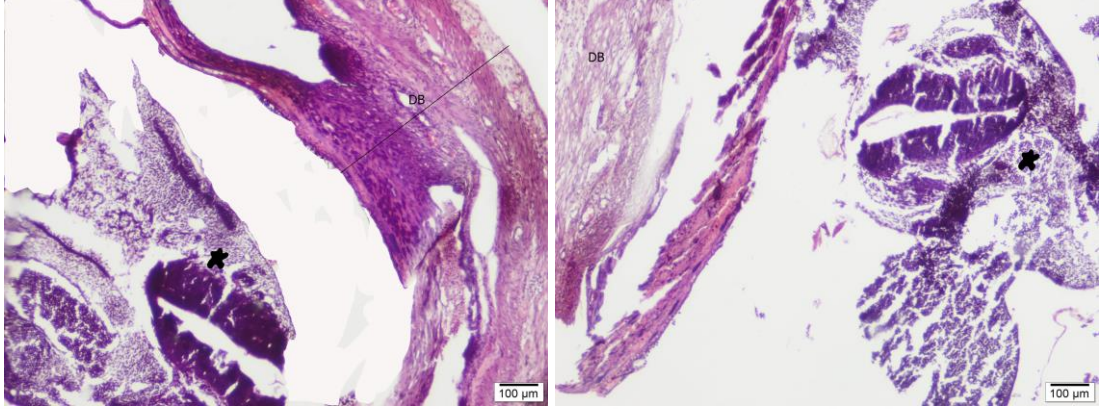
6.4. Gebelik Oluşturulan Grupların Histokimyasal Bulguları

Çalışmamızın alt ikinci gruplarını oluşturan deneklerin hepsinin gebe kalmaları sağlandı ve histokimyasal değişiklikler tespit edildi. Çalışmamızın alt ikinci grupların denekleri (BY (G1-2), NİŞ (G2-2), KİMKEH (G3-2) ve KİMKEH + NİŞ (G4-2)) proöstrus ve östrus döneminde olduğu belirlenerek çiftleştirilmek üzere erkek kafesine alındı. Vaginal smear metoduyla sperm varlığı belirlenen hayvanlar gebe kabul edildi. Gebelikleri tespit edilen denekler 12 gün sonra sakrifiye edilerek embriyolar fiksateye alındı ve histolojik takibi yapılarak H&E boyması yapıldı. BY (G1-2) ve NİŞ (G2-2) gruplarının sol hornlarında implantasyonu tamamlamış embriyolara rastlanmadı. Tüm alt ikinci grupların sağ uterin hornları (Tablo 6.4.1) ile KİMKEH (G3-2) ve KİMKEH + NİŞ (G4-2) gruplarının hem sağ hemde sol uterin hornlarında implante olmuş embriyolara rastlandı (Tablo 6.4.2).

ALT İKİNCİ GRUPLAR VE İMPLANTASYON ORANLARI

SAĞ UTERİN HORN

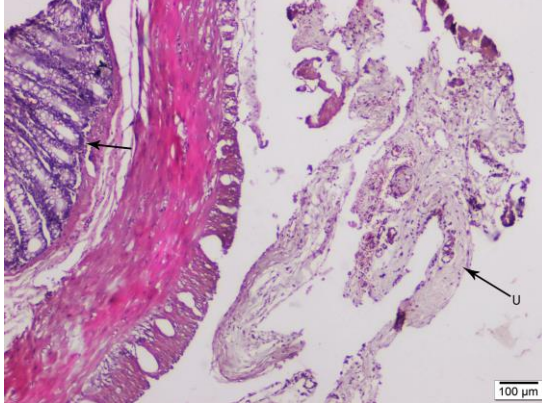
(Yıldız: Embriyo, DB: Desidua bazalis)



SOL UTERİN HORN (MASSON-TRİKROM)

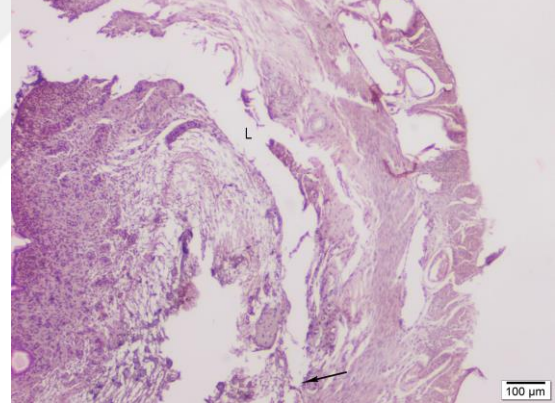
BY (G1-2)

(Kısa ok: Kalın bağırsak, uzun ok: sol uterin horn)



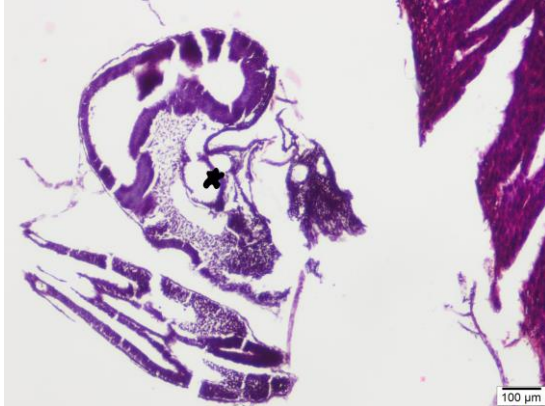
NİŞ (G2-2)

(Uzun ok: Sineşi, L: Lümen)



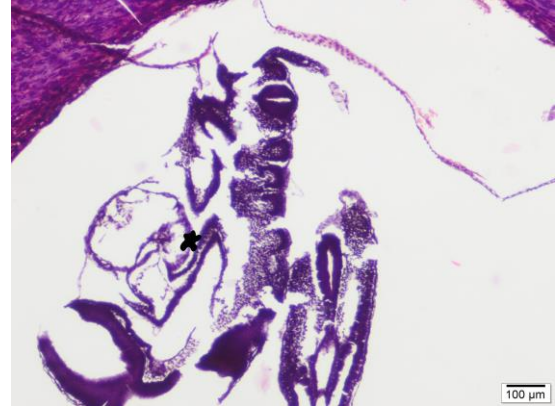
KİMKH (G3-2)

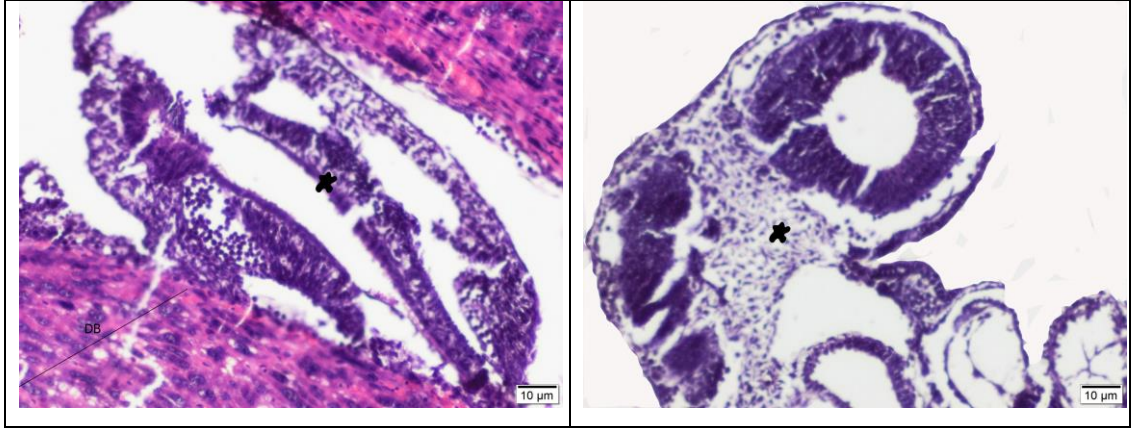
(Yıldız: Embriyo)



KİMKH + NİŞ (G4-2)

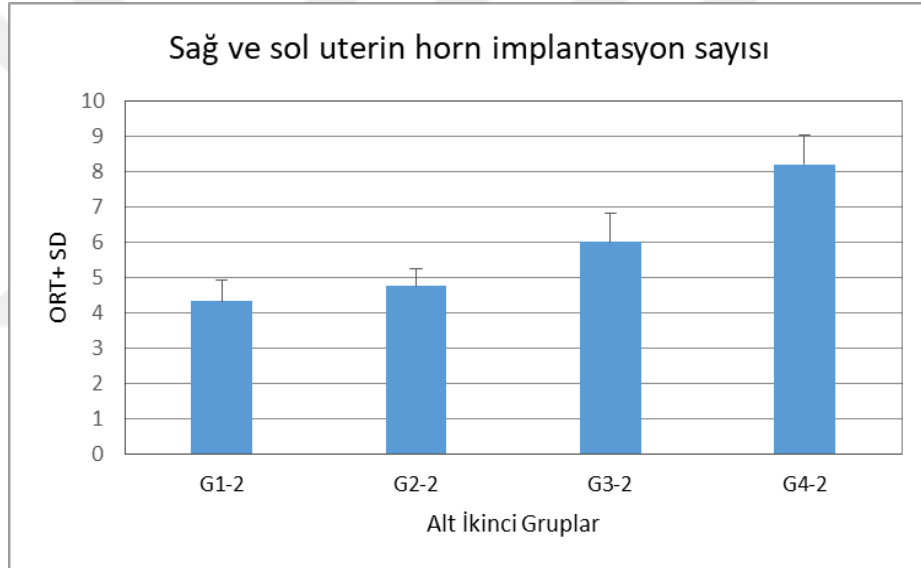
(Yıldız: Embriyo)





Resim 6.4.1. Asherman sonrası tedavi edilen gruplardaki sağ ve sol uterin hornlara implante olmuş embriyolar, H&E.

Tablo 6.4.1. Alt ikinci grupların sağ ve sol hornlarına implante olan embriyo sayıları.



BY (G1-2) vs NİŞ (G2-2) $p > 0,05$,

BY (G1-2) vs KİM KH (G3-2) $*p < 0,05$

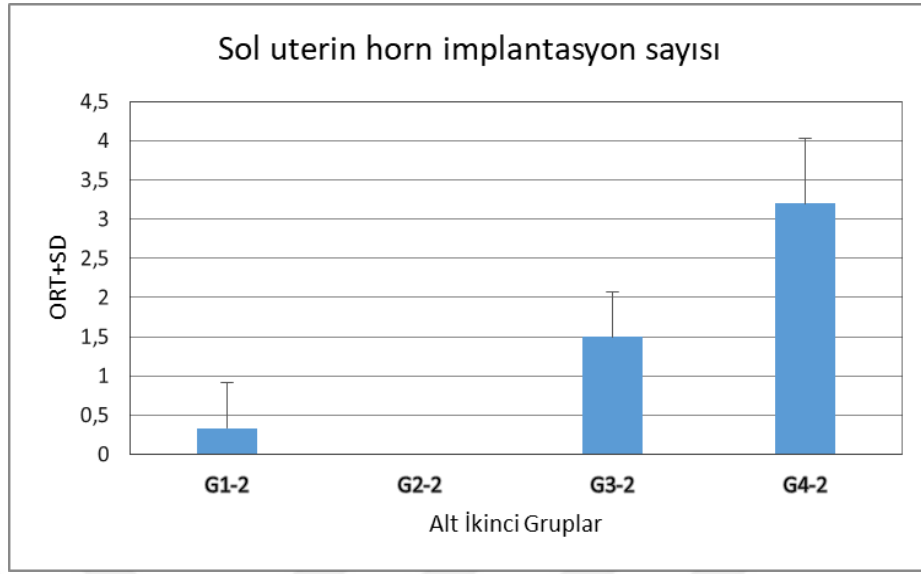
BY (G1-2) vs KİM KH+NİŞ (G4-2) $****p < 0,0001$,

NİŞ (G2-2) vs KİM KH (G3-2) $p > 0,05$

NİŞ (G2-2) vs KİM KH+NİŞ (G4-2) $****p < 0,0001$,

KİM KH (G3-2) vs KİM KH+NİŞ (G4-2) $**p < 0,01$

Tablo 6.4.2. Alt ikinci grupların sol horndaki implantasyon sayıları.



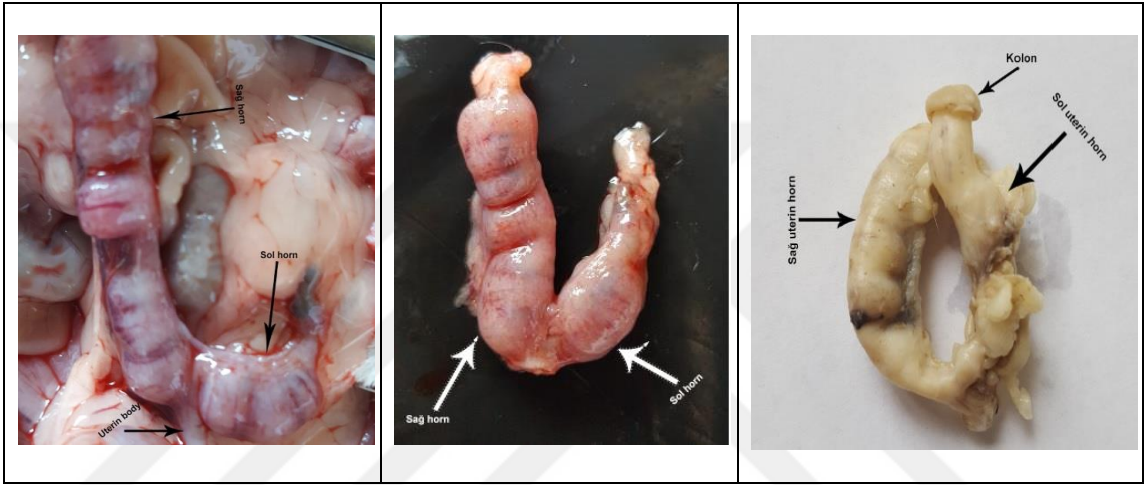
BY (G1) vs NİŞ (G2) $p>0,05$,
BY (G1) vs KİM KH (G3) $p>0,05$
BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) $***p<0,001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) $p>0,05$,
NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p<0,0001$,
KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) $*p<0,05$

Tablo 6.4.3. Alt ikinci grupların sol horndaki implantasyon sayıları ve alt üçüncü grupların yeni doğan sayıları.

	BY G1-2	NİŞ G2-2	KİM KH G3-2	KİM KH+NİŞ G4-2
<i>Sol horn implantasyon</i>	0,33 ± 0,5	0	1,5 ± 0,57	3,2 ± 0,83
<i>Sağ+ sol horn implantasyon</i>	4,33 ± 0,57	4,75 ± 0,5	6 ± 0,81	8,2 ± 0,83
	BY G1-3	NİŞ G2-3	KİM KH G3-3	KİM KH+NİŞ G4-3
<i>Yeni doğan yavrular</i>	4,66 ± 0,57	5 ± 0,81	6,6 ± 0,89	8,6 ± 0,54

Vajinal yayma preparatlarında sperm görülen hayvanların tümünün gebe oldukları deney sonlandırılırken gözlemlendi. Grupların ikinci ve üçüncü alt grupları vajinal yayma preparatlarındaki sperm bulgularına göre kategorize edildiler (**Resim 6.4.1** ve **Resim 6.4.2**). İkinci alt gruplar 12. günün sonunda üçüncü alt gruplar ise yavrular doğana kadar takip edildiler. İkinci alt grupların implante olmuş embriyo sayısı belirlendikten sonra takibe alınarak rutin boyamalardan H&E ve

immünohistokimyasal boyamalarla immünreaktiviteyi gösterildi. İmplantasyon sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,05$). BY ile NİŞ ve NİŞ ile KİMKG arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$), BY ile KİMKG arasında $*p < 0,05$, BY ile KİMKG+NİŞ arasında $***p < 0,0001$, NİŞ ile KİMKG+NİŞ $***p < 0,0001$ ve KİMKG ile KİMKG+NİŞ $**p < 0,01$ olarak istatistiksel anlamlılıklar belirlenmiştir. Ayrıca alt üçüncü grupların yeni doğan sayıları belirlendi alt ikinci gruptaki implantasyon sayılarıyla karşılaştırıldı ve beklendiği gibi karşılaştırma sonucunda anlamlı farklılık görülmedi ($p > 0,05$) (Tablo 6.4.3).

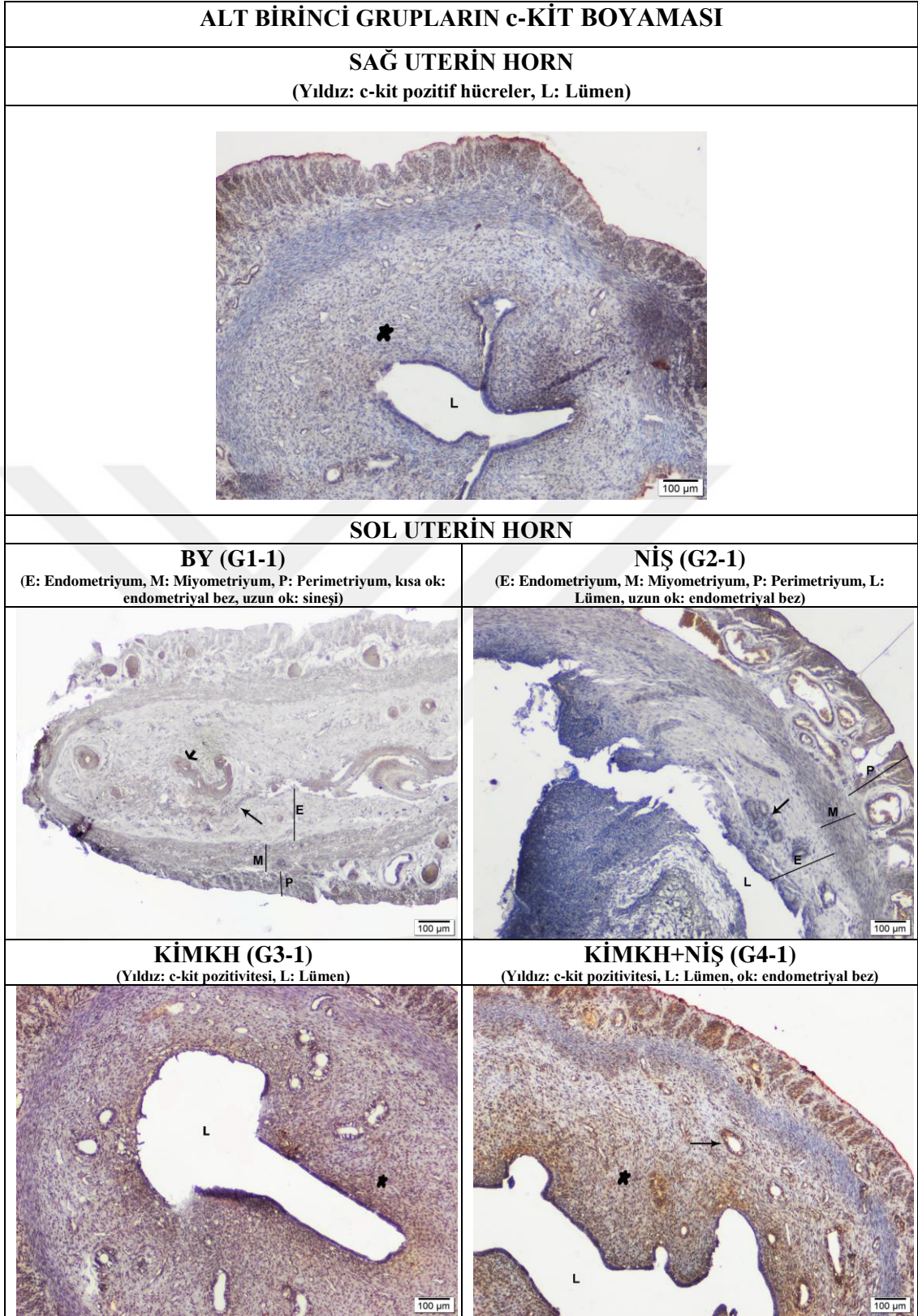


Resim 6.4.2. Asherman sonrası tedavi edilen gruplardaki sağ ve sol uterin hornlara implante olmuş embriyolar.

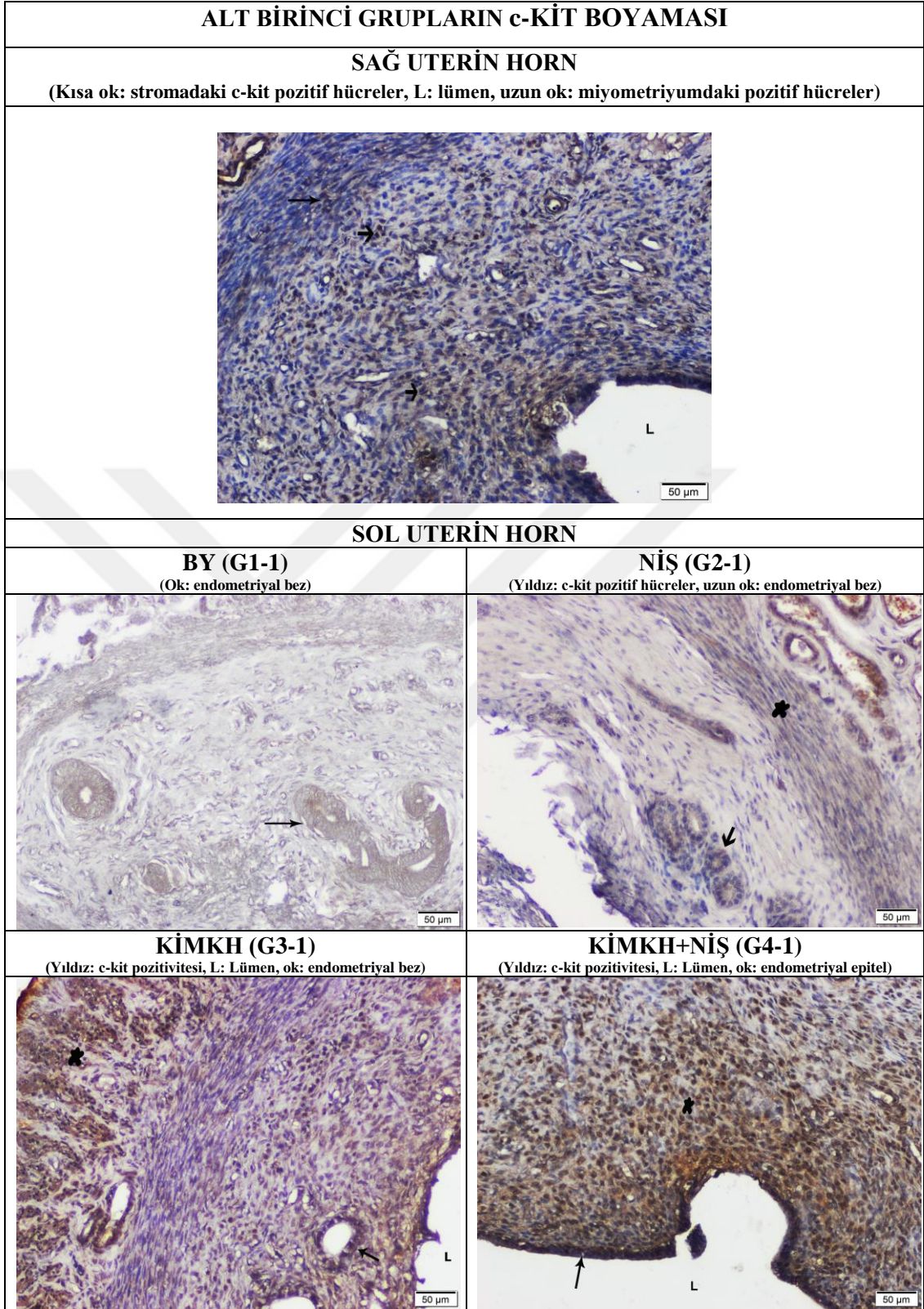
6.5. Gebelik Oluşturulmayan Grupların İmmünohistokimyasal Bulguları

6.5.1. c-Kit

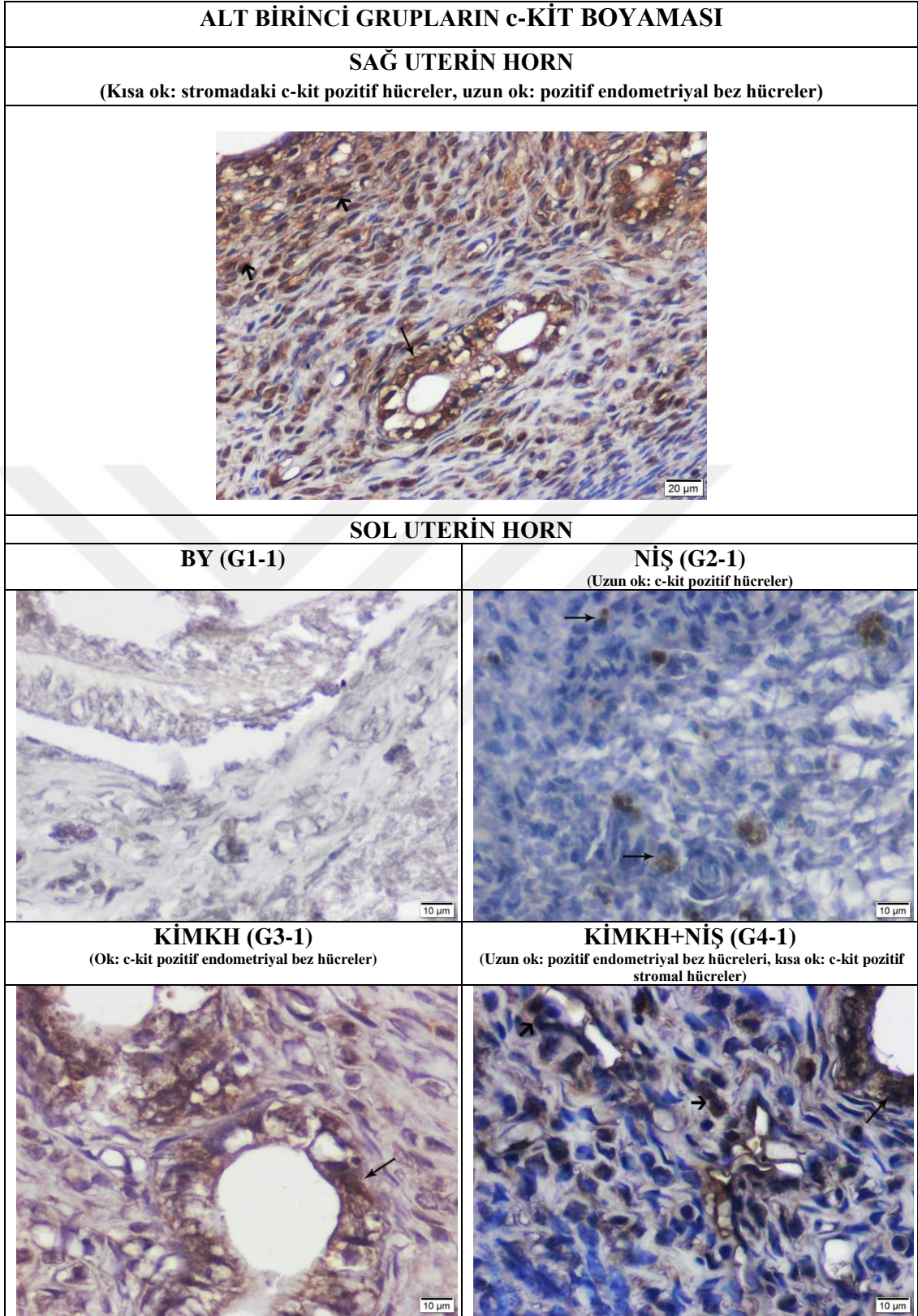
Sıçanlarda kimyasal ajan kullanılarak deneysel Asherman modeli oluşturulduktan sonra meydana gelen adezyonları ve önemli bir infertilite sorununu ortadan kaldırmak için KİMKG'ler kullanıldı. KİMKG'lerin endometriyum rejenerasyonundaki rolünü aydınlatmak için immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Deneysel modelin alt birinci grupları (BY-G1-1, NİŞ-G2-1, KİMKG-G3-1, KİMKG+NİŞ-G4-1) 10 günlük tedaviden sonra sakrifiye edilerek endometriyum kesitleri alındı ve immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. Gebelik olmayan grupların uterus kesitlerinin, c-kit antikoru ile boyanarak değerlendirilmesi yapıldı (Resim 6.5.1.1, Resim 6.5.1.2).



Resim 6.5.1.1. Alt birinci grupların endometriyumda c-kit boyanma görüntüleri.

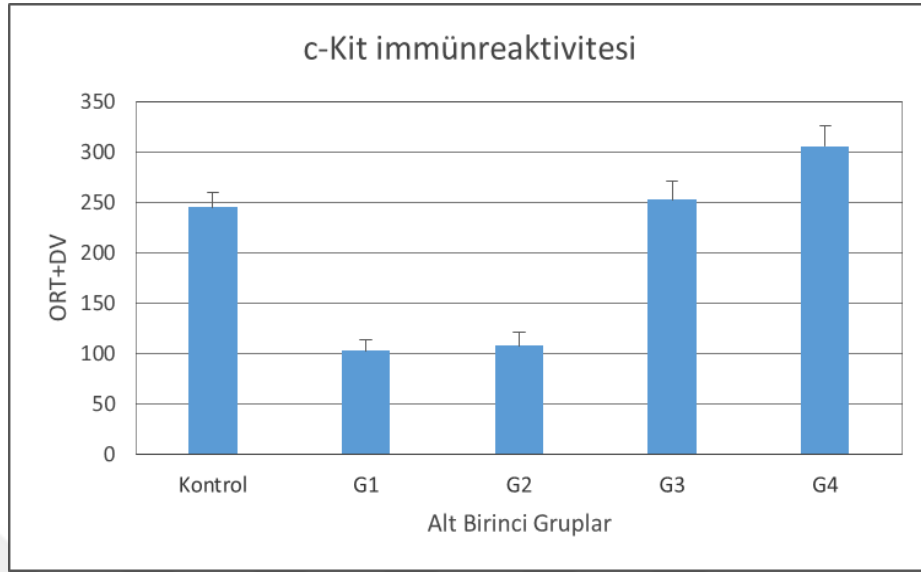


Resim 6.5.1.2. Alt birinci grupların endometriyumda **c-kit** boyanma görüntüleri.



Resim 6.5.1.3. Alt birinci grupların endometriyumda c-Kit boyama görüntüleri.

Tablo 6.5.1.1. Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki **c-Kit** dağılımına etkisi.



BY (G1) vs NİŞ (G2) $p>0,05$

BY (G1) vs KİM KH (G3) $***p<0,001$

BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p<0,0001$

NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) $**p<0,01$

NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p<0,0001$

KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) $*p<0,05$

KİM KH+NİŞ (G4) vs Kontrol (Sağ horn) $*p<0,05$

c-Kit antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda uterus yapısında yüzey epiteli, endometriyal bezler ve miyometriyumda pozitif alanlar gözlemlendi (**Resim 6.5.1.3**). Alt birinci ve ikinci grubun (BY-G1-1 ve NİŞ-G2-1) c-kit pozitifliğinin endometriyal bezler etrafında çok soluk boyanma şeklinde olduğu görüldü. Sadece kök hücre verilen grubun (KİM KH-G3-1) c-kit pozitifliğinin hem endometriyal bez hücrelerinde hem miyometriyumda hemde stromada oldukça yoğun boyanmalar şeklinde olduğu gözlemlendi. Özellikle c-kit antikorunun en fazla pozitif immünreaktivitesi KİM KH ve nişinin verildiği (KİM KH+NİŞ-G4-1) grup ile aynı grubun sağ uterus hornuna ait dokularda görüldü. Boyanmalar H-skor ile değerlendirildi ve KİM KH+NİŞ grubunda c-kit immunoreaktivitesinin diğer gruplara göre en fazla anlamlı artış gösterdiği saptandı (**Tablo 6.5.1.1**). Gruplardan BY ile NİŞ arasında istatistiksel anlamlılık olmadığı ($p>0,05$), yine KİM KH+NİŞ ile kontrol

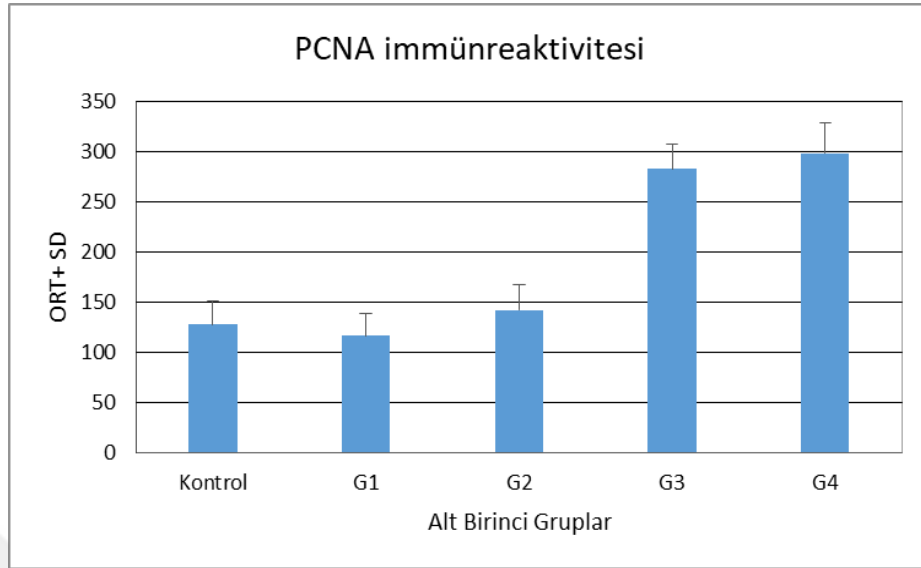
(sağ uterus horn) grubunun karşılaştırılmasında anlamlılığın diğer gruplara göre en düşük seviyede olduğu tespit edildi (* $p < 0,05$).

6.5.2. PCNA

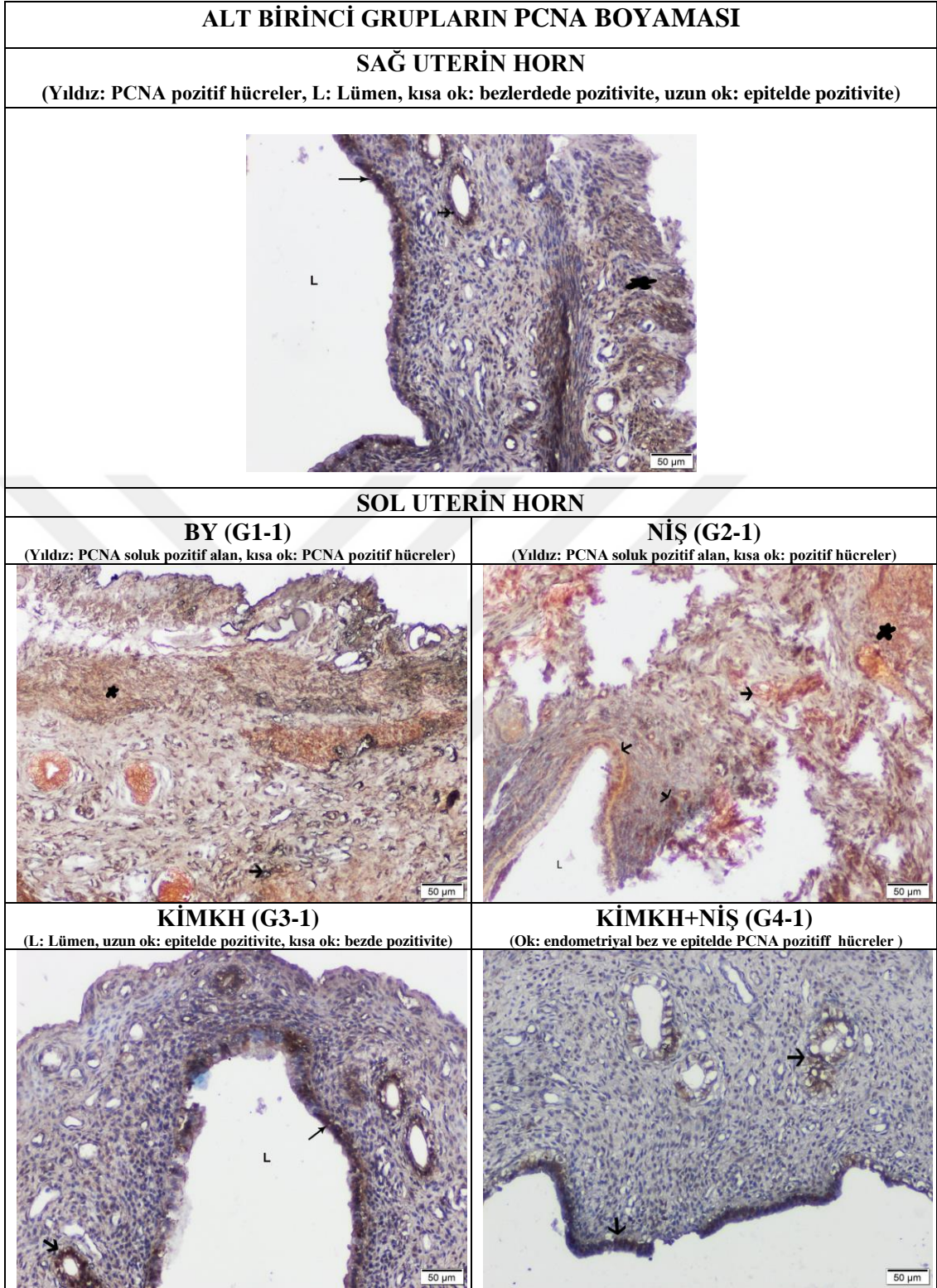
Deneysel Asherman modelinde meydana gelen adezyonları ortadan kaldırmak için KİMKGH'ler kullanıldığı çalışmamızda uterus örnekleri PCNA pozitifitesi yönünden değerlendirildi ve rejenerasyon hakkında bulgular ortaya konuldu. Deneysel modelin alt birinci grupları (BY-G1-1, NİŞ-G2-1, KİMKGH-G3-1, KİMKGH+NİŞ-G4-1) 10 günlük tedaviden sonra sakrifiye edilerek kesitleri alındı ve PCNA boyamaları yapıldı. Gebelik olmayan grupların uterus kesitlerinin, PCNA antikoru ile boyanarak değerlendirilmesi yapıldı (**Resim 6.5.2.1, Resim 6.5.2.2**).

Rejenerasyon belirteci olan PCNA immünohistokimyasal boyamasında alt birinci gruplar arasında istatistiksel anlamlılık belirlenmiştir (**Tablo 6.5.2.1**). PCNA immünreaktivitesi KİMKGH (G3) ve KİMKGH+NİŞ (G4) gruplarında uterus yüzey epiteli başta olmak üzere, endometriyal bezlerde ve miyometriyumda kaslar arasında yoğun olarak pozitifite gösterdiği gözlemlendi. BY (G1) ve NİŞ (G2) gruplarında boyanmalar daha çok endometriyal bez hücrelerinde görülmekte fakat immünreaktivite düşük olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında en fazla anlamlılık BY ile KİMKGH+NİŞ ve NİŞ ile KİMKGH+NİŞ arasında **** $p < 0,0001$ olduğu tespit edildi. En düşük anlamlılık ise KİMKGH ile KİMKGH+NİŞ arasında ** $p < 0,01$ gözlemlenmiştir. Kontrol olarak tutulan sağ horn örnekleri tedavi grubundan KİMKGH+NİŞ ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlılığın **** $p < 0,0001$ olduğu görülmüştür. Bu veriler esasında şu anlama geliyor ki kök hücreler hasarlı bölgeye bir şekilde ulaşarak ortamın çevresini değiştirerek veya salgıladığı faktörlerle sağlıklı hücreleri bölünmeye teşvik ederek proliferasyonun artmasına katkı sağlamaktadır. Böylece hasarlı bölge daha hızlı bir şekilde reaksiyon göstererek doku tamiratı yapılmaya başlar.

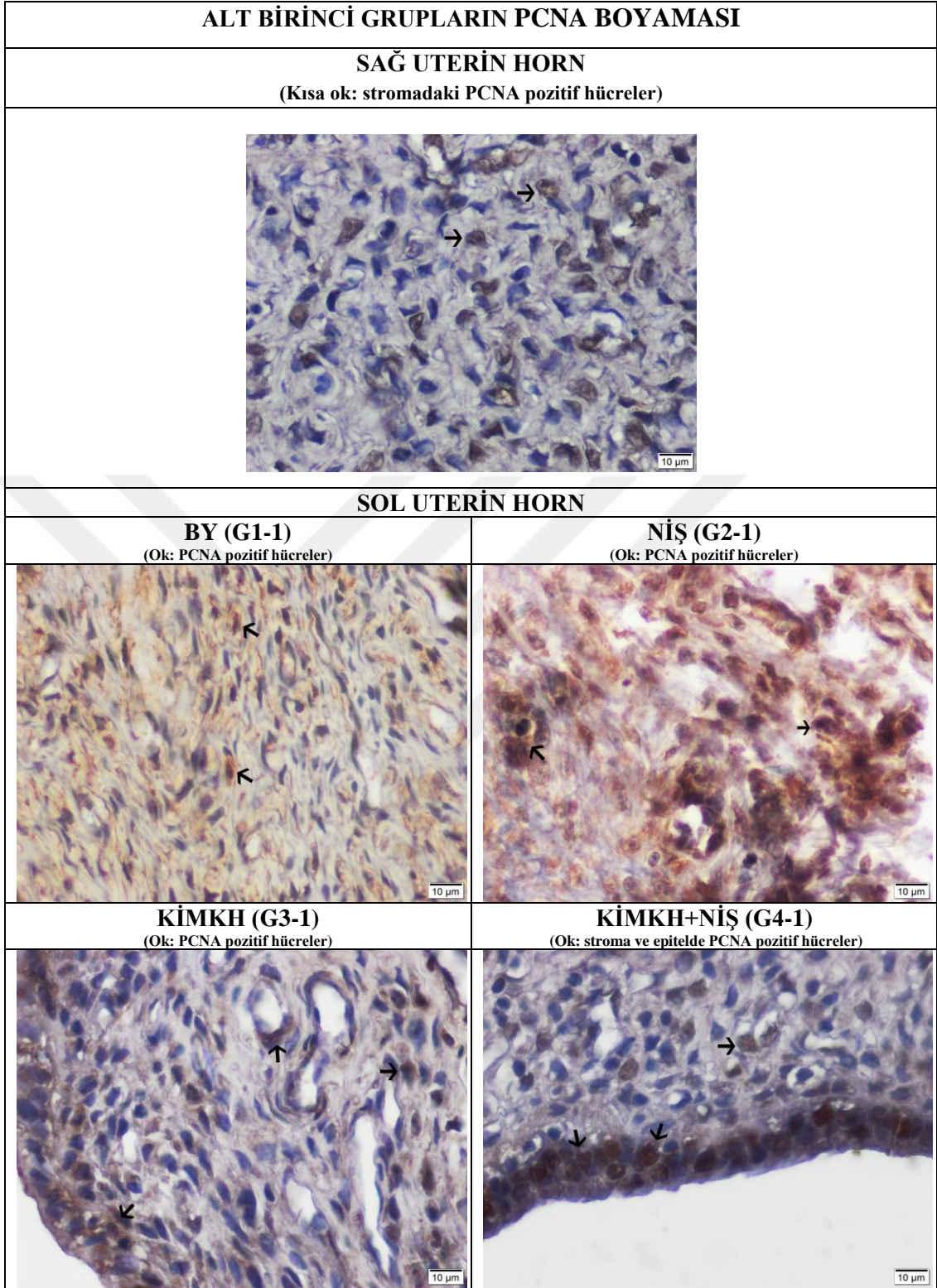
Tablo 6.5.2.1. Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki PCNA dağılımına etkisi.



BY (G1) vs NİŞ (G2) ***p<0,001,
BY (G1) vs KİM KH (G3) ***p<0,001,
BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) ****p<0,0001,
NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) ***p<0,001,
NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) ****p<0,0001,
KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) **p<0,01,
KİM KH+NİŞ (G4) vs Kontrol (Sağ horn) ****p<0,0001



Resim 6.5.2.1. Alt birinci grupların endometriyumda PCNA boyanma görüntüleri.

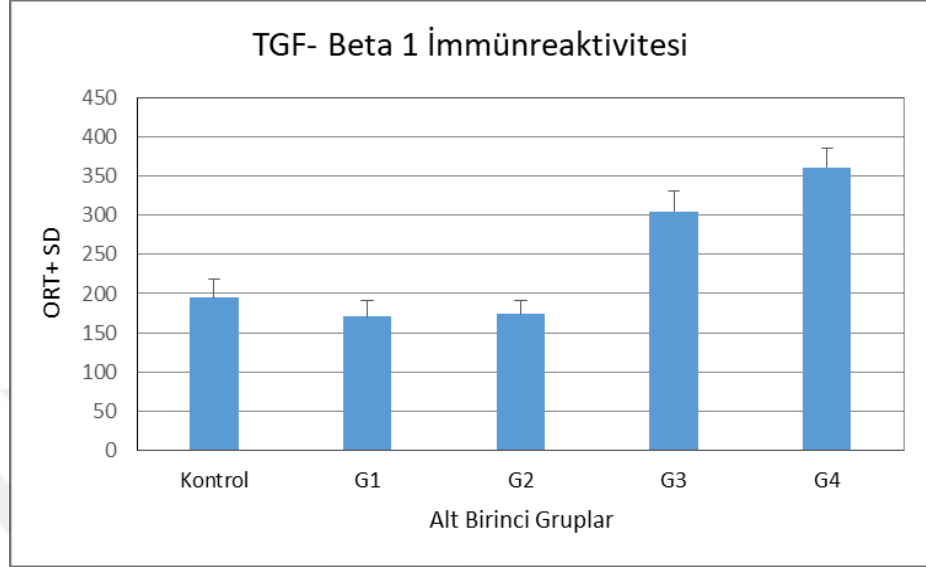


Resim 6.5.2.2. Alt birinci grupların endometriyumda PCNA boyanma görüntüleri.

6.5.3. TGF-β1

Uterus dokularının TGF-β1 immünohistokimyasal boyamasında özellikle miyometriyumdaki kas hücreleri arasında pozitifitenin arttığı, endometriyum epiteli ve bezlerin çevresinde de immünreaktivite yoğun olarak izlenmiştir (**Resim 6.5.3.1**). BY (G1-1) ve NİŞ (G2-1) alt gruplarının TGF-β1 pozitifitesi yönünden miyometriyum orta şiddette diğer alanlar ise soluk olarak boyanmıştır. KİMKG (G3-1) ve KİMKG+NİŞ (G4-1) alt gruplarında ise TGF-β1 reaktivitesi hem miyometriyum hem endometriyal bezler hemde yüzey epitelinde yoğun şekilde boyanmıştır (**Resim 6.5.3.2**). TGF-β1 antikor boyamaları gruplar arasında H-skor üzerinde değerlendirilip karşılaştırması yapılmıştır. BY ile NİŞ alt grupları arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p>0,05$). BY ile KİMKG alt grupları arasında anlamlılık ve BY ile KİMKG+NİŞ alt grupları arasındaki anlamlılık oldukça yüksek olarak tespit edilmiştir ($****p<0,0001$). NİŞ ile KİMKG ve KİMKG+NİŞ grupları arasında yine istatistiksel anlamlılık ($***p<0,001$) saptanmıştır. Alt birinci gruplardan KİMKG ile KİMKG+NİŞ arasındaki anlamlılık ($**p<0,01$) en az olarak gözlenmiştir. KİMKG+NİŞ ile Kontrol (sağ horn) grubu arasında da istatistiksel olarak ($***p<0,001$) anlamlılık tespit edilmiştir (**Tablo 6.5.3.1**). TGF-β1 immünreaktivitesi KİMKG+NİŞ (G4-1) grubunda en yüksek olarak belirlenmiştir. En az immünreaktivite görülenler ise BY ile NİŞ grupları olmuştur. Sonuç olarak bu durum bize kök hücrelerin doku yenilenmesinde ve dejenere olmuş dokunun fonksiyonel bütünlüğüne kavuşmasında ne kadar etkin rol oynadığını göstermektedir.

Tablo 6.5.3.1. Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki **TGF- β 1** dağılımına etkisi.



BY (G1) vs NİŞ (G2) $p>0,05$,

BY (G1) vs KİM KH (G3) **** $p<0,0001$,

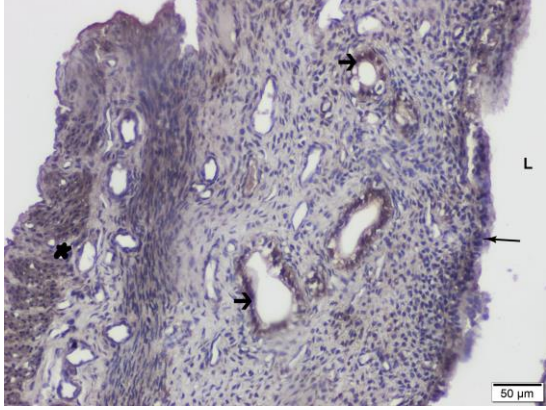
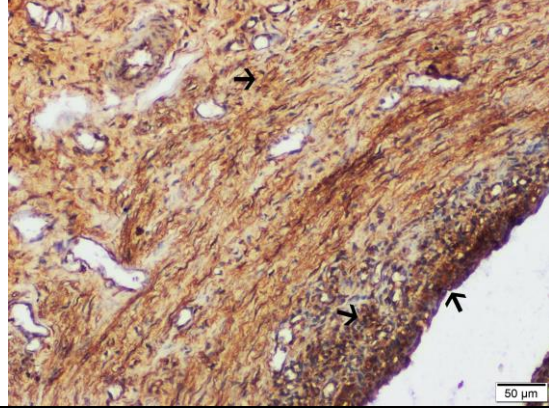
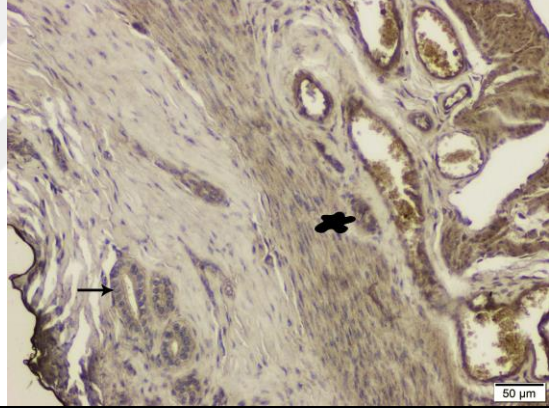
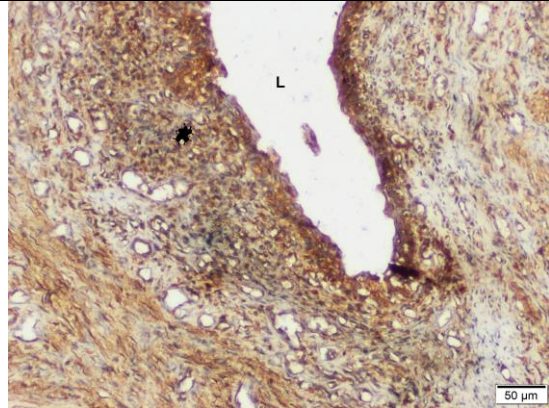
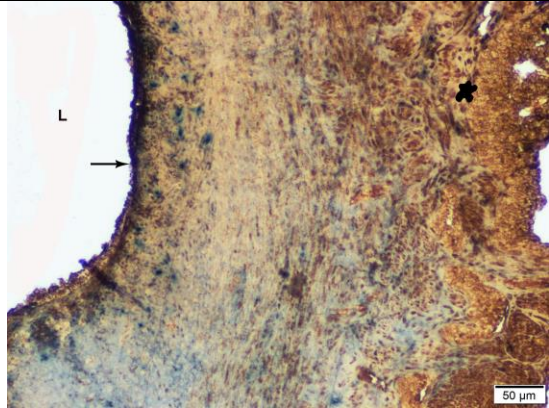
BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) **** $p<0,0001$,

NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) *** $p<0,001$,

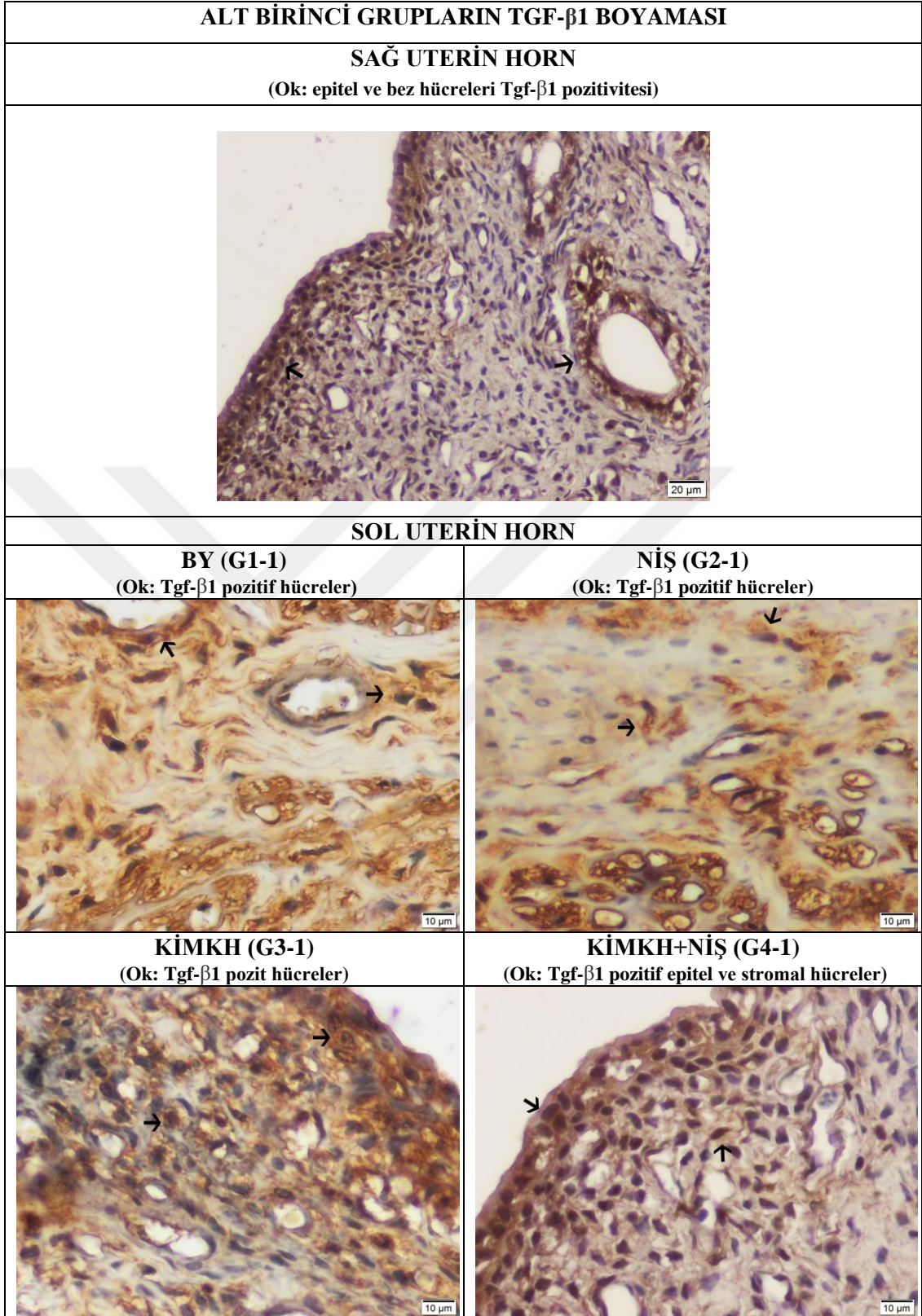
NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) **** $p<0,0001$,

KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) ** $p<0,01$,

KİM KH+NİŞ (G4) vs Kontrol (Sağ horn) **** $p<0,0001$

ALT BİRİNCİ GRUPLARIN TGF- β 1 BOYAMASI	
SAĞ UTERİN HORN	
(Uzun ok: epitel pozitivitesi, L: Lümen, Yıldız: Tgf- β 1 pozitif alan, kısa ok: bez pozitivitesi)	
	
SOL UTERİN HORN	
BY (G1-1) (Ok: Tgf- β 1 pozitif epitel ve stromal hücreler)	Niş (G2-1) (Ok: Tgf- β 1 pozitif bez hücreleri, Yıldız: Tgf- β 1 pozitif alan)
	
KİMKH (G3-1) (L: Lümen, Yıldız: Tgf- β 1 pozitif alan)	KİMKH+NİŞ (G4-1) (Uzun ok: epitel pozitivitesi, L: Lümen, Yıldız: Tgf- β 1 pozitif alan)
	

Resim 6.5.3.1. Alt birinci grupların endometriyumda TGF- β 1 boyanma görüntüleri.

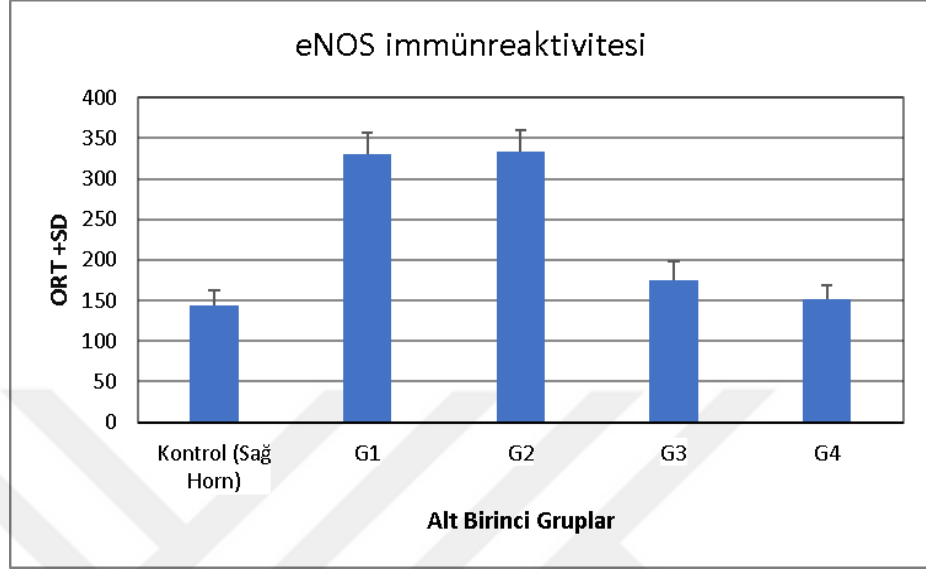


Resim 6.5.3.2. Alt birinci grupların endometriyumda TGF- β 1 boyanma görüntüleri.

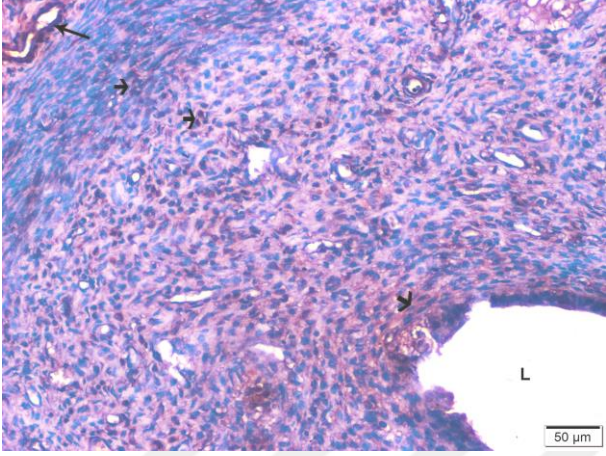
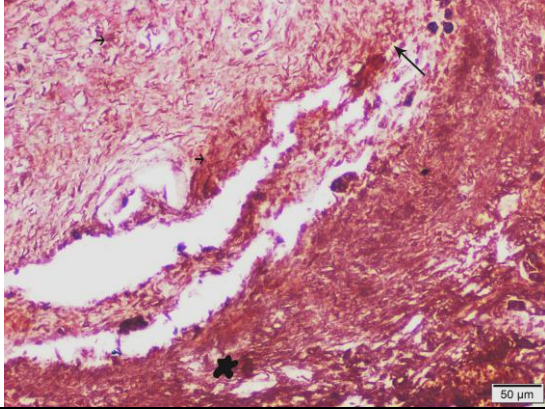
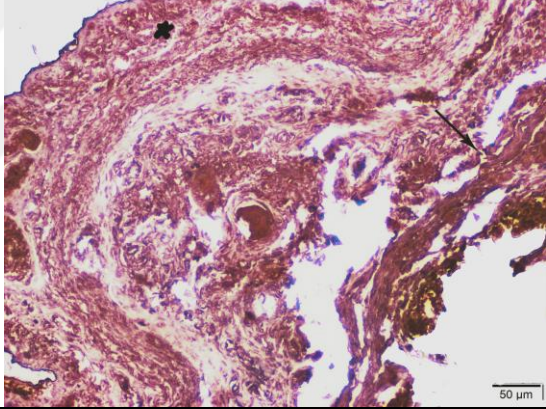
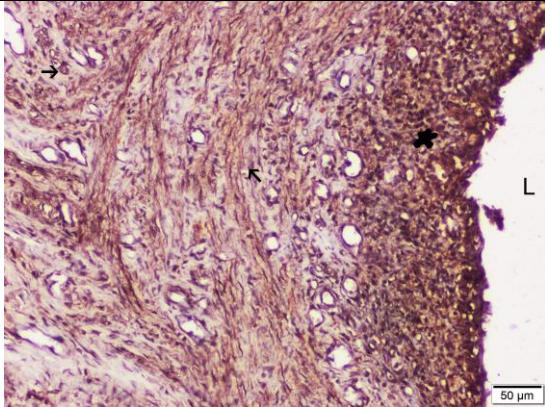
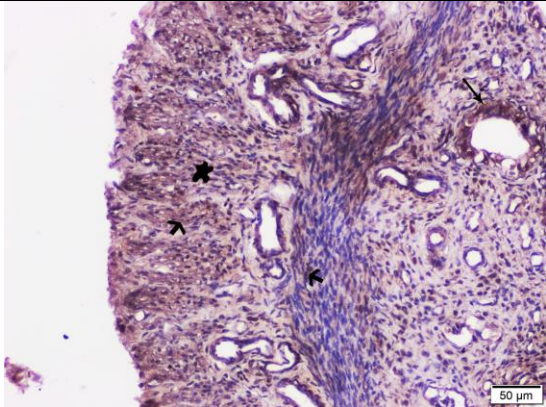
6.5.4. eNOS

Endometriyal adezyon oluşturmak için kimyasal ajanla Asherman modeli oluşturulan ve oluşan adezyonların ortadan kaldırılması, özellikle akut dönemde yapılacak tedavinin etkilerini ortaya koymak için gerçekleştirilecek doğru tedavi seçeneğini belirlemek adına çalışmamızı gerçekleştirdik. KİM KH'lerin uterin adezyonlar üzerindeki rolünü belirlemek amacıyla yapılan deneysel çalışmada oksidatif stresin Asherman oluşumundan sonra oluşan klinik tablo nedeniyle yükseldiği bilinmektedir. Nitrik oksit önemli bir oksidatif stres belirteçidir. Alt birinci gruplarımızdaki NOS aktivitesinde değişimini belirlemek adına uterin dokudaki endotelial NOS sentezinin immünohistokimyasal yöntemle dağılımı tespit edildi (**Resim 6.5.4.1**). Denejasyonun fazla olduğu, epitelin ortadan kalktığı, sineşilerin olduğu BY (G1-1)) ve NİŞ (G2-1) alt birinci gruplarında eNOS immünreaktivitesi en yüksek olarak gözlemlendi. BY ve NİŞ alt birinci gruplarında eNOS immünreaktivitesi oldukça yoğun olarak izlenirken, KİM KH (G3-1) ve KİM KH+NİŞ (G4-1) gruplarında pozitivitenin azaldığı, kontrol olarak tutulan sağ uterin dokudaki immünreaktiviteye yakın değerlere ulaştığı gözlemlendi. Kök hücre uygulamasının eNOS immunoreaktivitesini oldukça anlamlı şekilde azalttığı (****p<0,0001) tespit edildi. BY ile NİŞ ve KİM KH+NİŞ ile Kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı fark gözlemlenmedi (p>0,05). BY ile KİM KH, BY ile KİM KH+NİŞ, NİŞ ile KİM KH+NİŞ ve NİŞ ile KİM KH grupları arasında istatistiksel anlamlılık en yüksek olarak tespit edildi (****p<0,0001). En düşük anlamlılık KİM KH ile KİM KH+NİŞ grupları arasında gözlemlendi (*p<0,05) (**Tablo 6.5.4.1**).

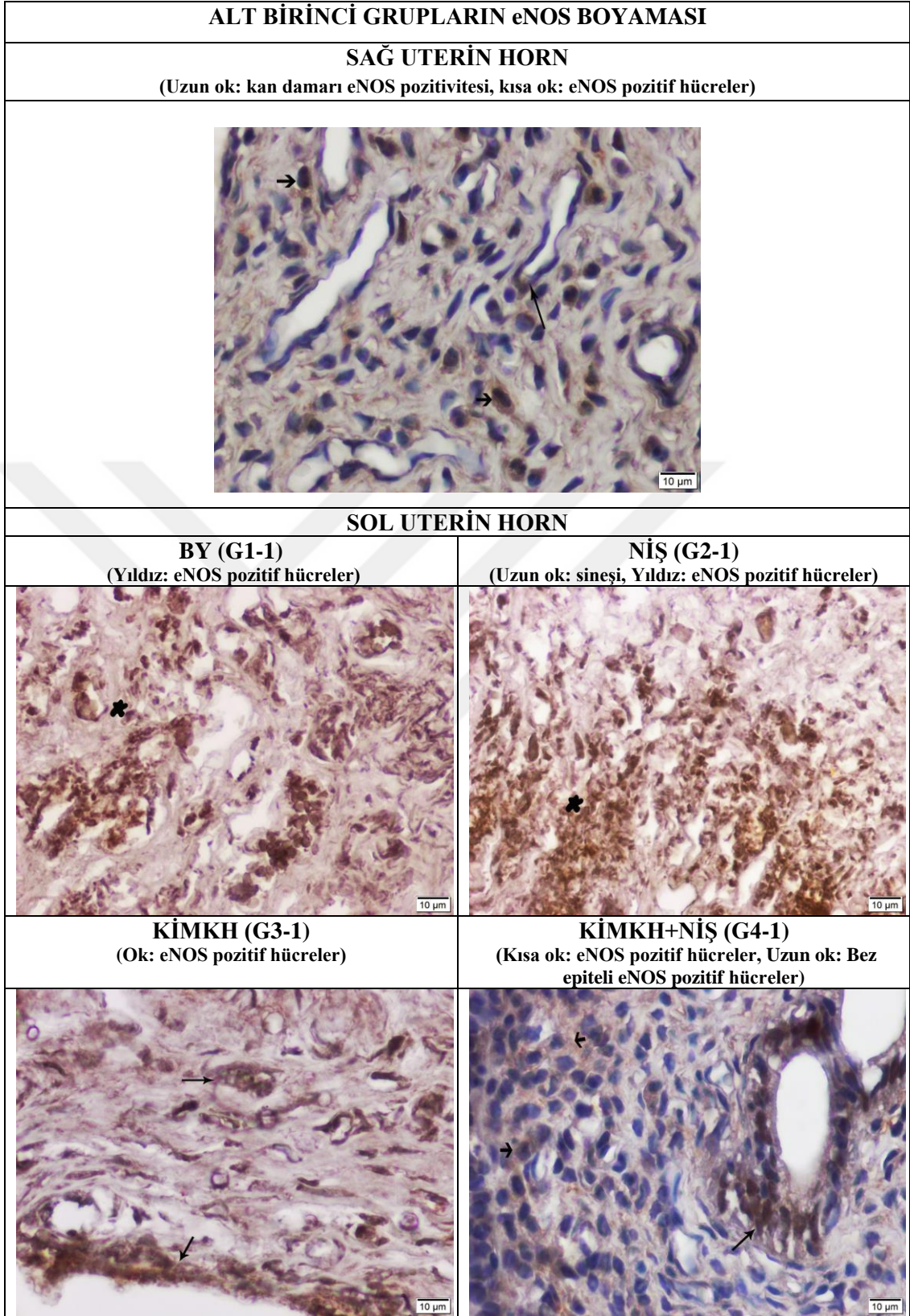
Tablo 6.5.4.1. Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki eNOS dağılımına etkisi.



BY (G1) vs NİŞ (G2) $p > 0,05$,
BY (G1) vs KİM KH (G3) **** $p < 0,0001$,
BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) **** $p < 0,0001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) **** $p < 0,0001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) **** $p < 0,0001$,
KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) * $p < 0,05$,
KİM KH+NİŞ (G4) vs Kontrol (Sağ horn) $p > 0,05$

ALT BİRİNCİ GRUPLARIN eNOS BOYAMASI	
SAĞ UTERİN HORN (Uzun ok: kan damarı eNOS pozitivitesi, L: Lümen, kısa ok: eNOS pozitif hücreler)	
	
SOL UTERİN HORN	
BY (G1-1) (Uzun ok: sineşi, Yıldız: eNOS pozitif hücreler)	NİŞ (G2-1) (Uzun ok: sineşi, Yıldız: eNOS pozitif hücreler)
	
KİMKH (G3-1) (Kısa ok: eNOS pozitif hücreler, L: Lümen, Yıldız: eNOS pozitif alan)	KİMKH+NİŞ (G4-1) (Kısa ok: eNOS pozitif hücreler, L: Lümen, Yıldız: eNOS pozitif alan)
	

Resim 6.5.4.1. Alt birinci grupların endometriyumda eNOS boyanma görüntüleri.

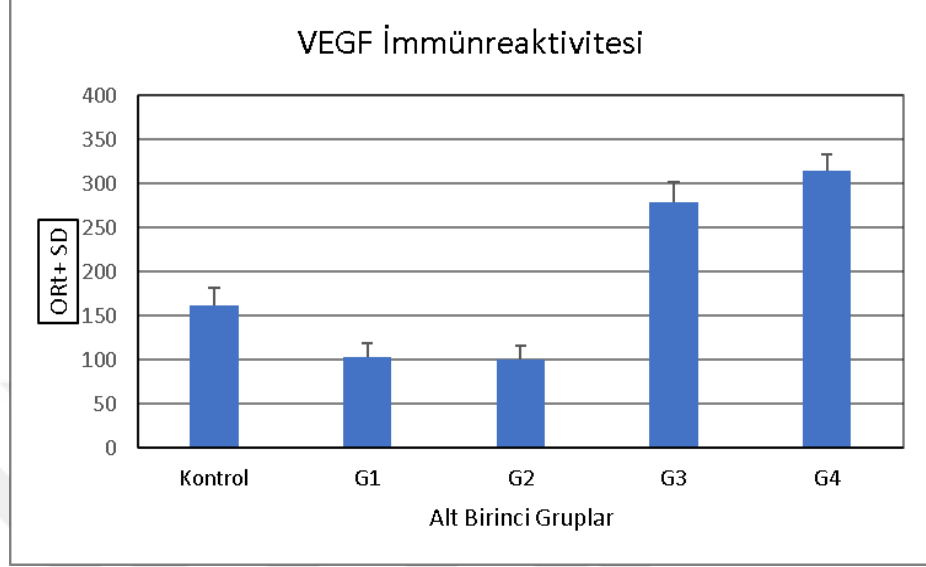


Resim 6.5.4.2. Alt birinci grupların endometriyumda eNOS boyanma görüntüleri.

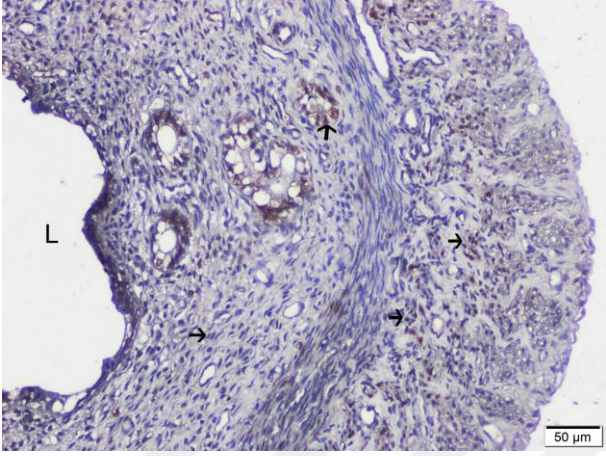
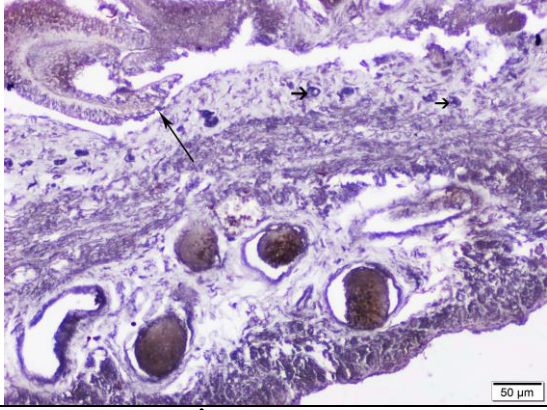
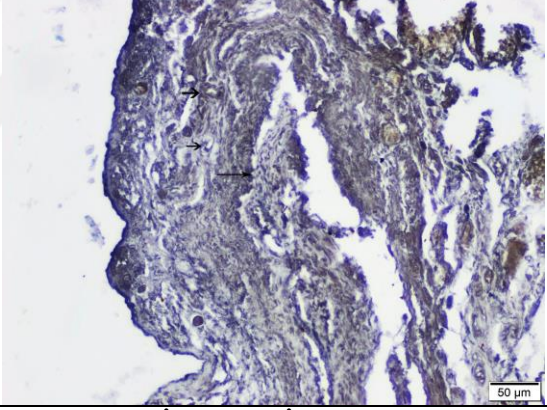
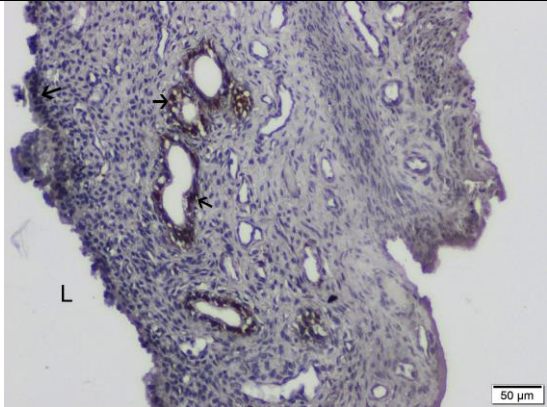
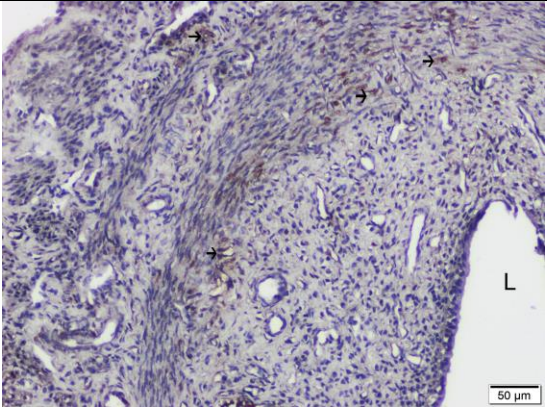
6.5.5. VEGF

Periton içi KİMKH uygulaması sonrası uteruslarda VEGF immunoreaktivitesi kan damarları etrafında görüldü (**Resim 6.5.5.1**). VEGF boyanmasının KİMKH+NİŞ (G4-1) grubunda diğer tedavi gruplarına göre artış ($*p<0,05$) gösterdiği izlendi (**Tablo 6.5.5.1**). VEGF'ün, vasküler endotelyal hücre mitozunu indükleyerek kan damarlarının geçirgenliğini artırdığı ve vasküler endotelyal hücrelerden gen ekspresyonunu modüle ederek endometriyal neovaskülarizasyonu desteklediği bilinmektedir. Özellikle fibröz alanların artışı vasküler alanlarının azmasına sebep olabilmektedir. Deney gruplarımızdan alt birinci gruplarda VEGF ekspresyonu için yapılan immünohistokimyasal boyamada VEGF immünreaktivitesinin damarların çevresinde yoğun olmak üzere lamina propriya ve miyometriyum içerisinde de meydana geldiği gözlenmiştir (**Resim 6.5.5.2**). KİMKH'lerin nişiyle (G4-1) birlikte verildiği grupta diğer gruplara göre anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir. BY (G1-1) ve NİŞ (G2-1) gruplarında immünreaktivitenin oldukça düşük değerlerde olduğu, KİMKH (G3-1) ve KİMKH+NİŞ (G4-1) gruplarında ise immünreaktivitenin oldukça arttığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak gruplar arasında karşılaştırmalarda BY ile NİŞ grupları arasında ($p>0,05$) istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmezken, BY ile KİMKH, BY ile KİMKH+NİŞ, NİŞ ile KİMKH ve NİŞ ile KİMKH+NİŞ grupları kıyaslandığında $***p<0,0001$ olarak oldukça anlamlı fark görülmüştür. KİMKH ile KİMKH+NİŞ grupları aralarında kıyaslandığında $*p<0,05$ ve KİMKH+NİŞ ile Kontrol grubu kıyaslandığında $***p<0,001$ olarak anlamlılık tespit edilmiştir (**Tablo 6.5.5.1**).

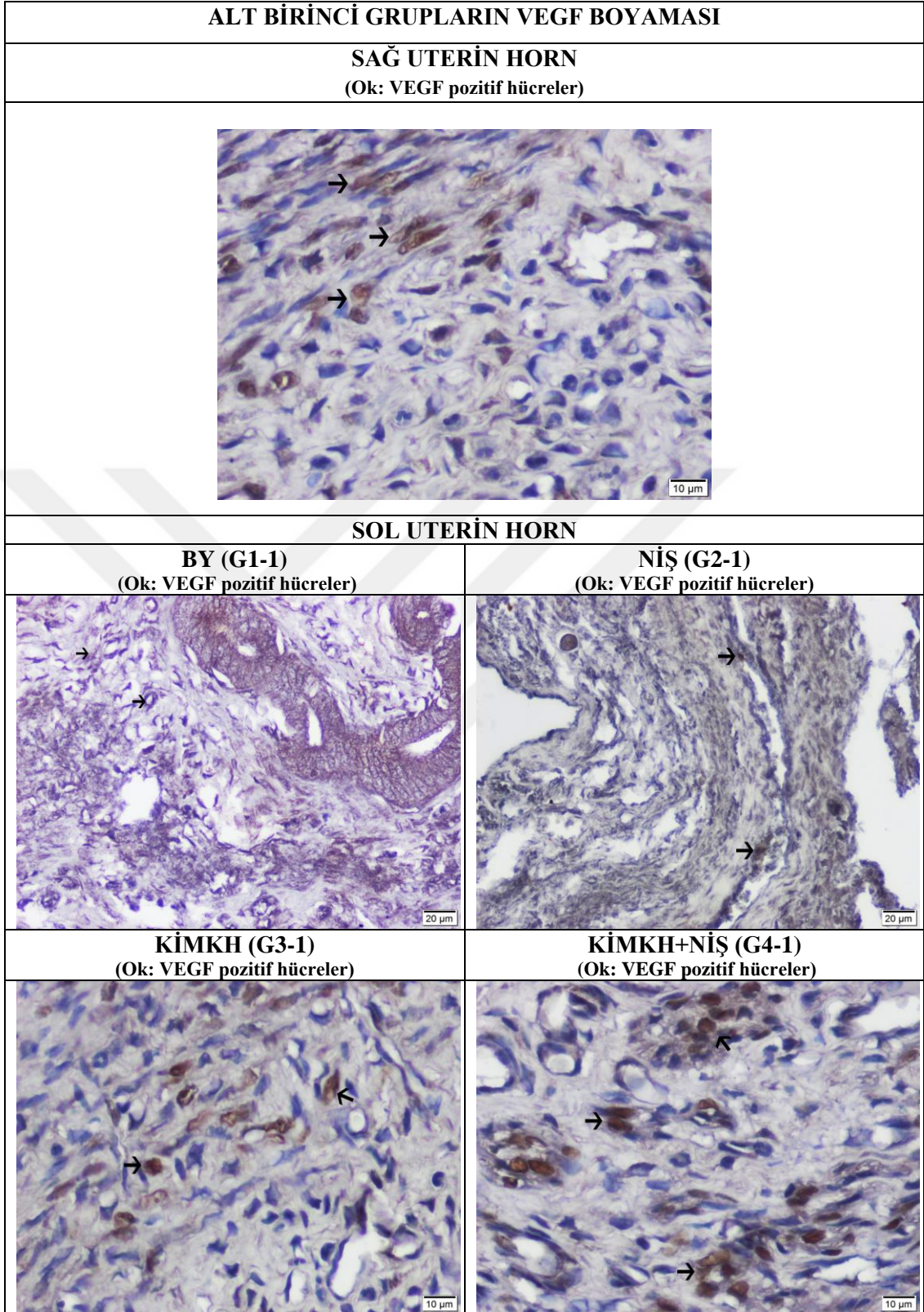
Tablo 6.5.5.1. Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki VEGF dağılımına etkisi.



BY (G1) vs NİŞ (G2) $p>0,05$,
BY (G1) vs KİM KH (G3) **** $p<0,0001$,
BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) **** $p<0,0001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) **** $p<0,0001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) **** $p<0,0001$,
KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) * $p<0,05$,
KİM KH+NİŞ (G4) vs Kontrol (Sağ horn) *** $p<0,001$

ALT BİRİNCİ GRUPLARIN VEGF BOYAMASI	
SAĞ UTERİN HORN (L: Lümen, kısa ok: VEGF pozitif hücreler)	
	
SOL UTERİN HORN	
BY (G1-1) (Uzun ok: sineşi, L: Lümen, kısa ok: VEGF pozitif hücreler)	NİŞ (G2-1) (Uzun ok: sineşi, L: Lümen, kısa ok: VEGF pozitif hücreler)
	
KİMKH (G3-1) (L: Lümen, kısa ok: VEGF pozitif hücreler)	KİMKH+NİŞ (G4-1) (L: Lümen, kısa ok: VEGF pozitif hücreler)
	

Resim 6.5.5.1. Alt birinci grupların endometriyumda VEGF boyanma görüntüleri.

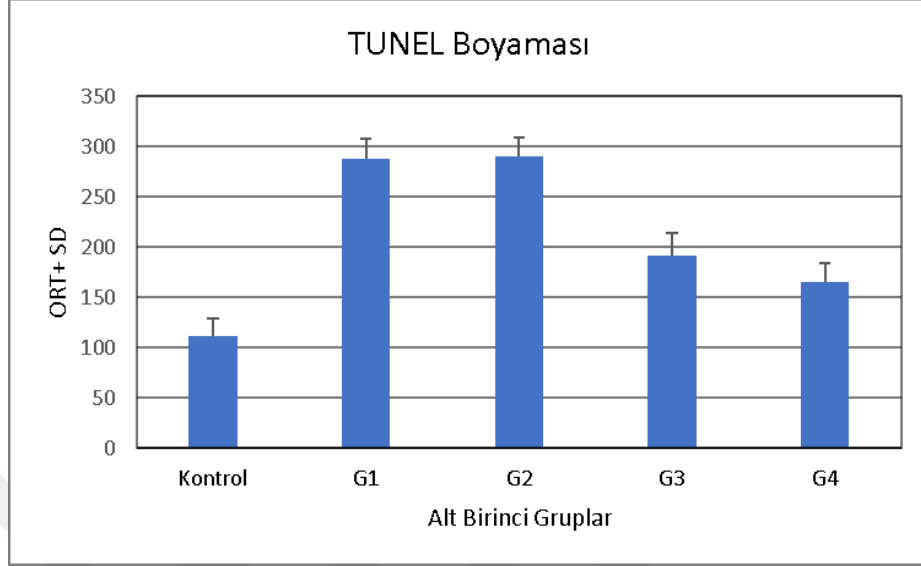


Resim 6.5.5.2. Alt birinci grupların endometriyumda VEGF boyanma görüntüleri.

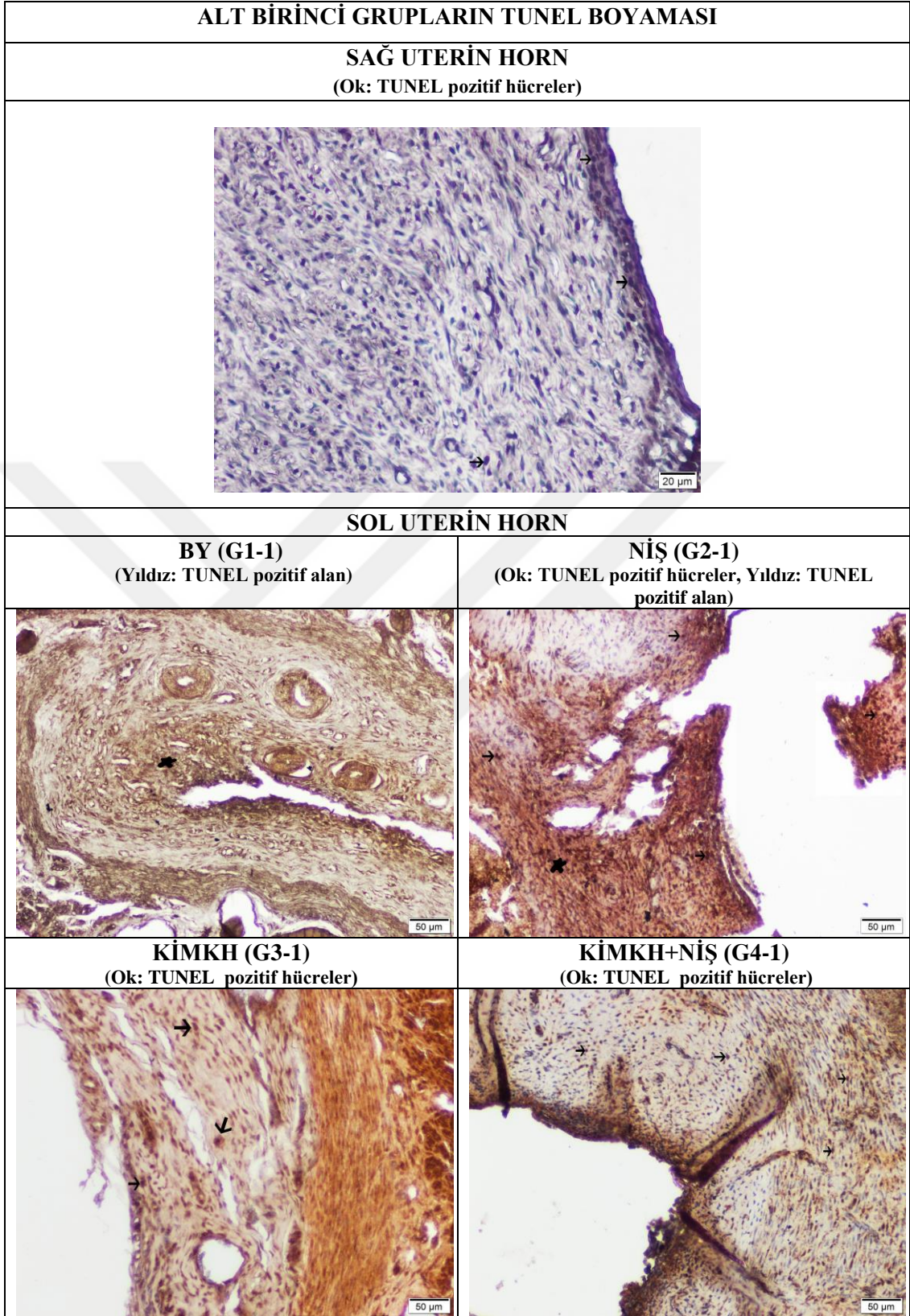
6.5.6. TUNEL

Programlı hücre ölümü mekanizması genellikle embriyonik dokularda meydana gelirken, erişkin dokuda oksidan antioksidan dengenin bozulması ve dokudaki dejenerasyon apoptozisi tetikleyen önemli süreçlerdendir. Endometriyal hasarda özellikle epitelde ki hasar lamina propriyadaki bezlerin oluşumunu engelleyerek fonksiyonel tabakanın oluşumunu durdurur. Dokudaki fonksiyonel işlemlerin aksaklığı apoptozis için önemli tetikleyici durumlardan biridir. Asherman modelinde adezyon oluşumu ile devam eden süreçte apoptozisin tetiklendiği ve dokuda apoptotik hücrelerin arttığı gözlemlenmiştir (**Resim 6.5.6.1 ve Resim 6.5.6.2**). Apoptotik süreç tedavi amaçlı kullanılan ajanlardan BY ve NİŞ gruplarında (G1-1 ve G2-1) en yüksek seviyede seyrederken, KİM KH ve KİM KH+NİŞ gruplarında (G3-1 ve G4-1) daha düşük seviyelerde seyrettiği gözlenmiştir. Bu da demek oluyor ki KİM KH'leri Asherman gibi dejeneratif hastalıklarda oluşan apoptotik mekanizmayı önemli derecede azaltabilmektedir. İstatistiksel karşılaştırmalarda da bu olumlu tablo anlamlılıklarla teyid edilmiştir. TUNEL pozitifliğinde gruplar arasındaki en fazla anlamlılık BY ile KİM KH ve NİŞ ile KİM KH+NİŞ grupları arasında gözlemlenmiştir (*** $p < 0,0001$). KİM KH ile KİM KH+NİŞ grupları arasında en az anlamlılık görülürken ($*p < 0,05$), BY ile NİŞ grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). NİŞ ile KİM KH grupları arasında anlamlılık *** $p < 0,001$ şeklinde tespit edilmiştir. Aynı zamanda kontrol grubu olarak tutulan sağ uterin hornlarda ise KİM KH+NİŞ grubuyla kıyaslama yapılarak ** $p < 0,01$ anlamlılık gözlemlendi (**Tablo 6.5.6.1**).

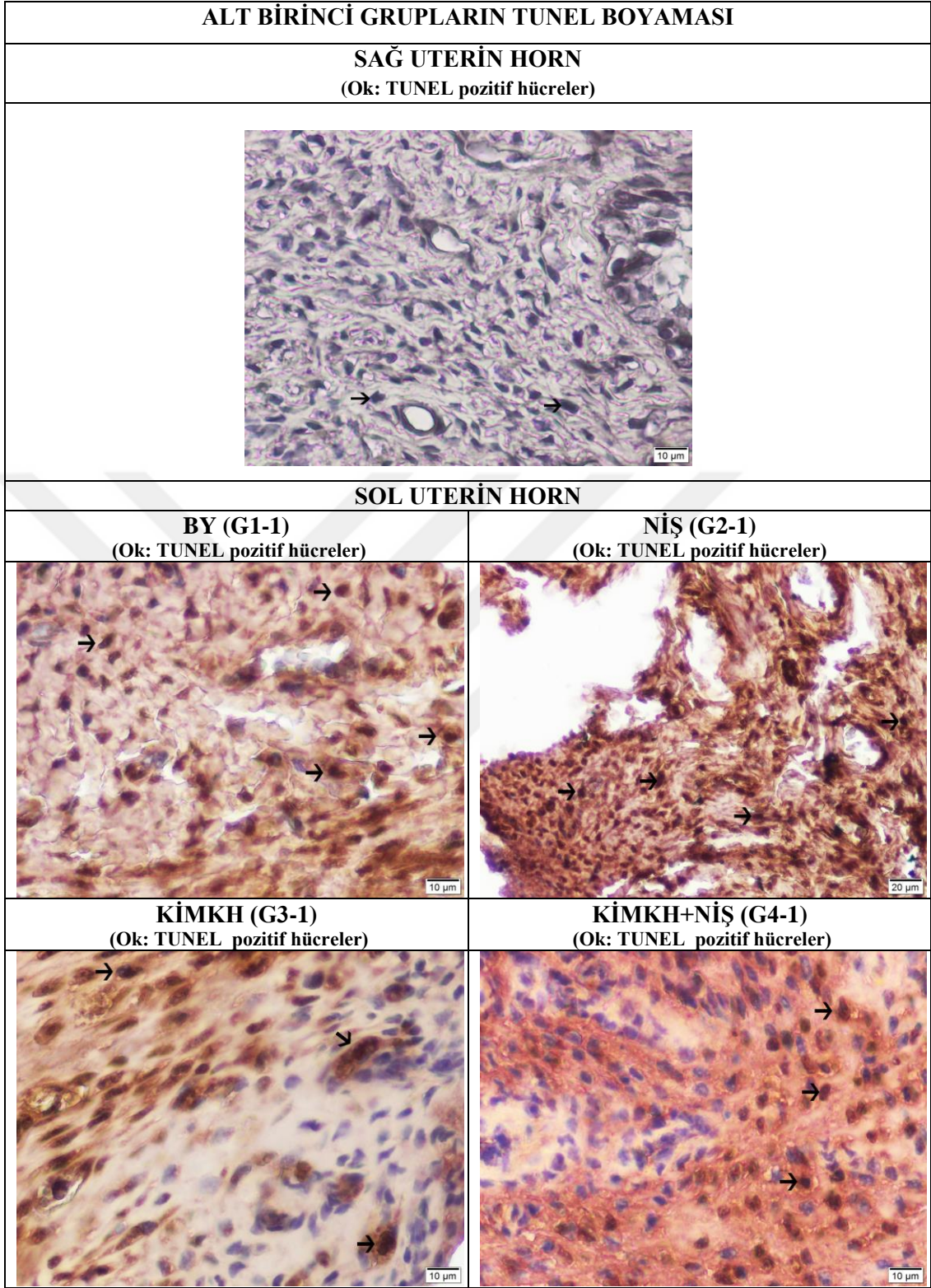
Tablo 6.5.6.1. Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki **TUNEL** dağılımına etkisi.



BY (G1) vs NİŞ (G2) $p>0,05$,
BY (G1) vs KİM KH (G3) $***p<0,001$,
BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p<0,0001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) $***p<0,001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p<0,0001$,
KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) $*p<0,05$,
KİM KH+NİŞ (G4) vs Kontrol (Sağ horn) $**p<0,01$



Resim 6.5.6.1. Alt birinci grupların endometriyumda TUNEL boyanma görüntüleri.



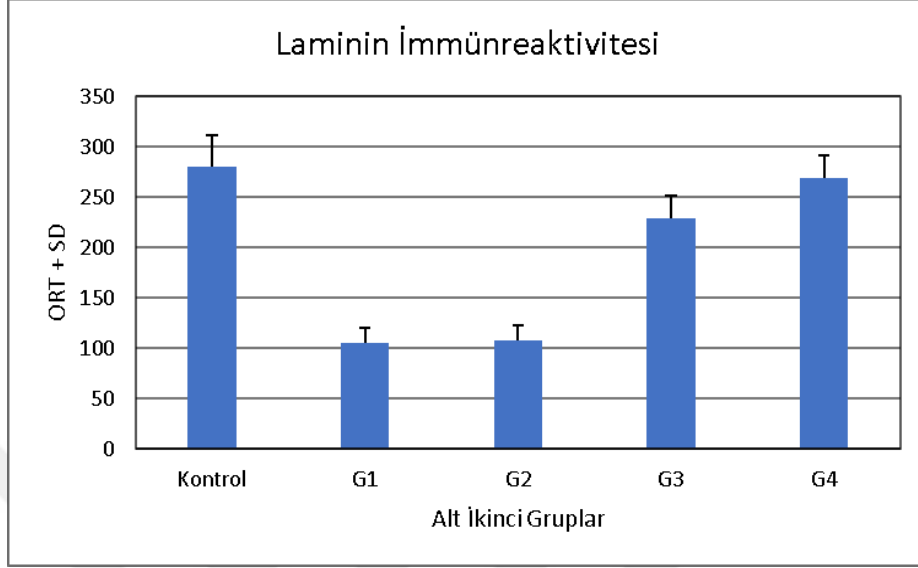
Resim 6.5.6.2. Alt birinci grupların endometriyumda TUNEL boyanma görüntüleri.

6.6. Gebelik Oluşturulan Grupların İmmünohistokimyasal Bulguları

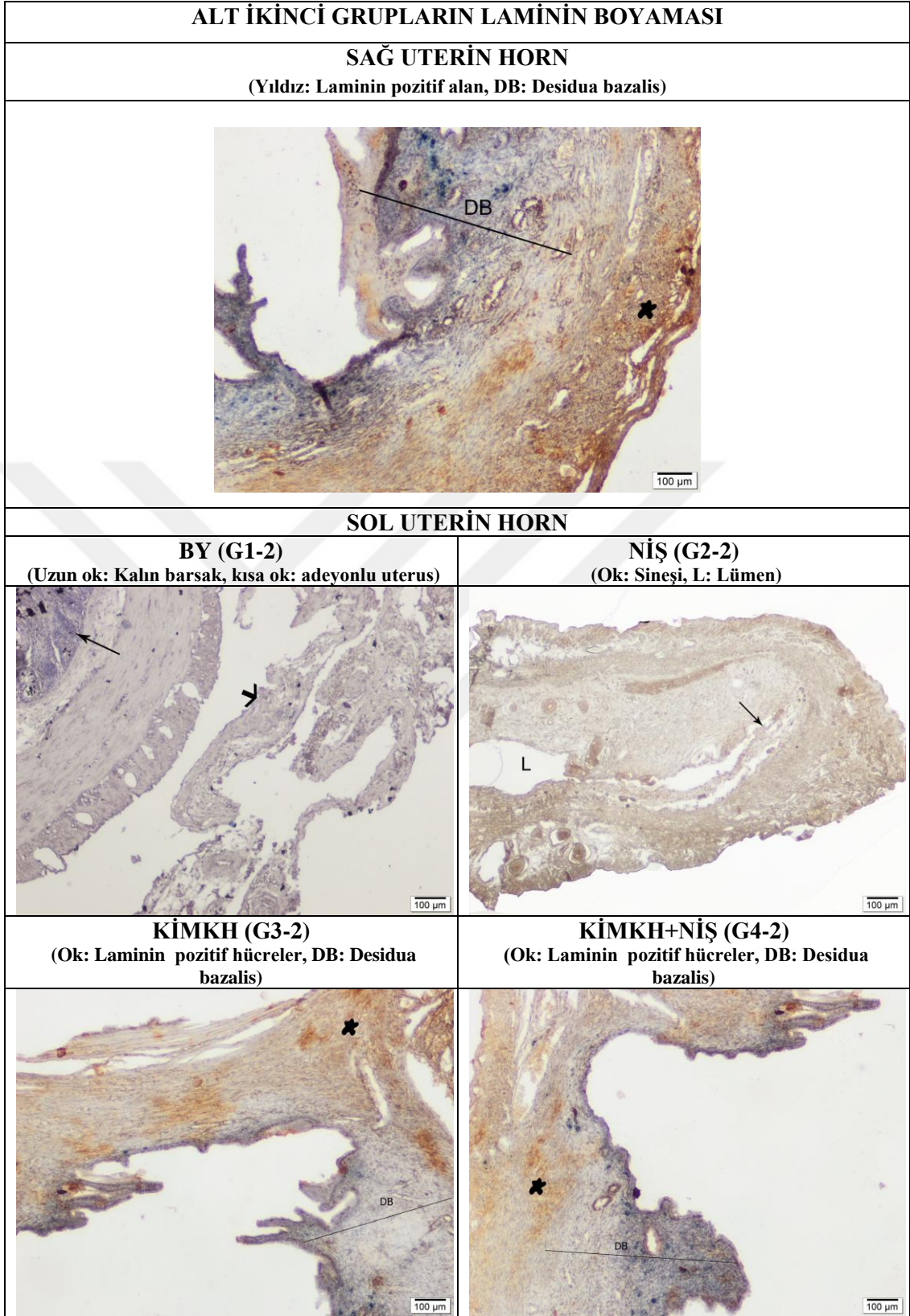
6.6.1. Laminin

Çalışmamızda periton içi BY (G1-2), NİŞ (G2-2), KİMKH (G3-2) ve KİMKH+NİŞ (G4-2) gruplarının uterus dokusu örneklerinde yapılan indirekt immünohistokimyasal boyanma sonucunda Laminin immunoreaktivitesinin özellikle membranlarda boyanmış olarak gözlemlendi (**Resim 6.6.1.1**). Embriyonun endometriyuma adezyonunda Laminin önemli rol oynayan moleküllerdendir. Bu nedenle implantasyonda önemi oldukça fazla olan Laminin gruplarda ki ekspresyonuna bakıldı ve istatistiksel olarak anlamlılıkları değerlendirildi. BY ve NİŞ gruplarında gebelik oluşturulmasına rağmen sol uterin hornda implante olmuş embriyolara rastlanmadı. Gebe bırakılan ve 12. Gün sakrifiye edilerek uterus dokuları alınan örnekler histolojik takipten sonra immünohistokimyasal boyama için anti-laminin ile boyanarak değerlendirildi. BY ile NİŞ arasında $p>0,05$ olarak tespit edilen istatistiksel değer anlamlılık olmadığını gösterdi. BY ile KİMKH kıyaslandığında $***p<0,001$, BY ile KİMKH+NİŞ arasında ise $****p<0,0001$ şekilde oldukça anlamlı fark saptanmıştır. NİŞ ile KİMKH arasında $***p<0,001$ anlamlılık, NİŞ ile KİMKH+NİŞ arasında da $****p<0,0001$ anlamlılık tespit edilmiştir. KİMKH ile KİMKH+NİŞ arasında ise anlamlılık $**p<0,01$ olarak belirlendi. Sağ gruplardaki implante olmuş embriyo dokuları ile KİMKH+NİŞ karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak $*p<0,05$ anlamlılık gözlemlendi (**Tablo 6.6.1.1**).

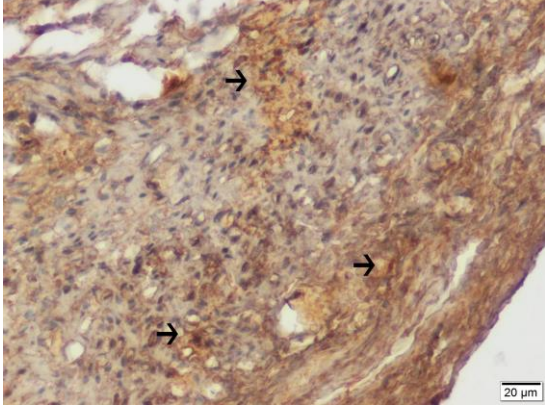
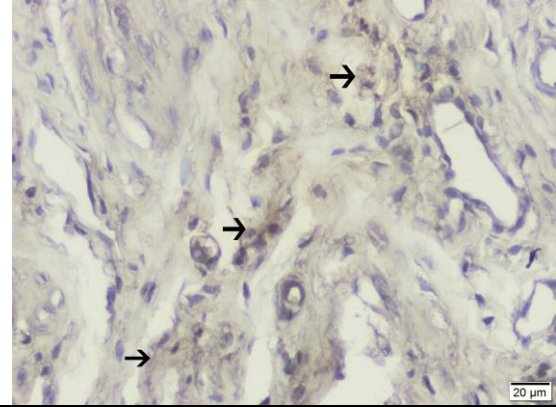
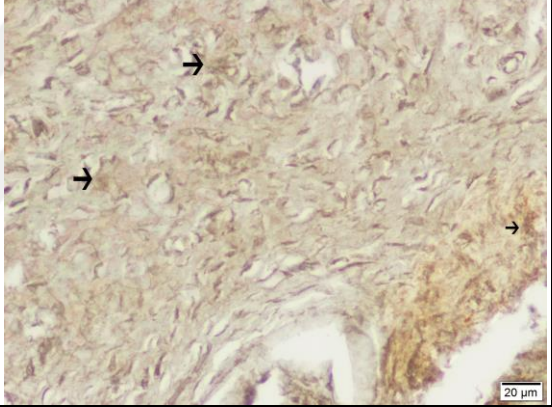
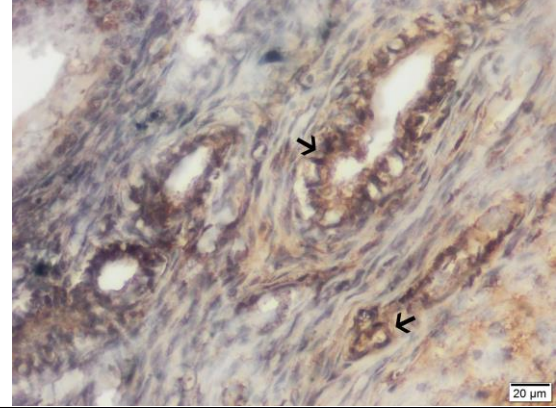
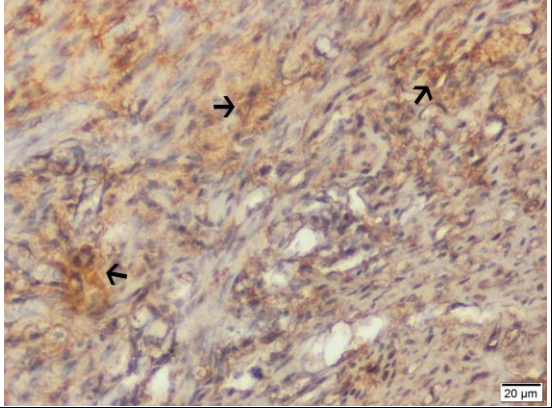
Tablo 6.6.1.1 Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki **Laminin** dağılımına etkisi.



BY (G1) vs NİŞ (G2) $p > 0,05$,
BY (G1) vs KİM KH (G3) $***p < 0,001$,
BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p < 0,0001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) $***p < 0,001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p < 0,0001$,
KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) $**p < 0,01$,
KİM KH+NİŞ (G4) vs Kontrol (Sağ horn) $*p < 0,05$



Resim 6.6.1.1 Alt ikinci grupların endometriyumda **Laminin** boyanma görüntüleri.

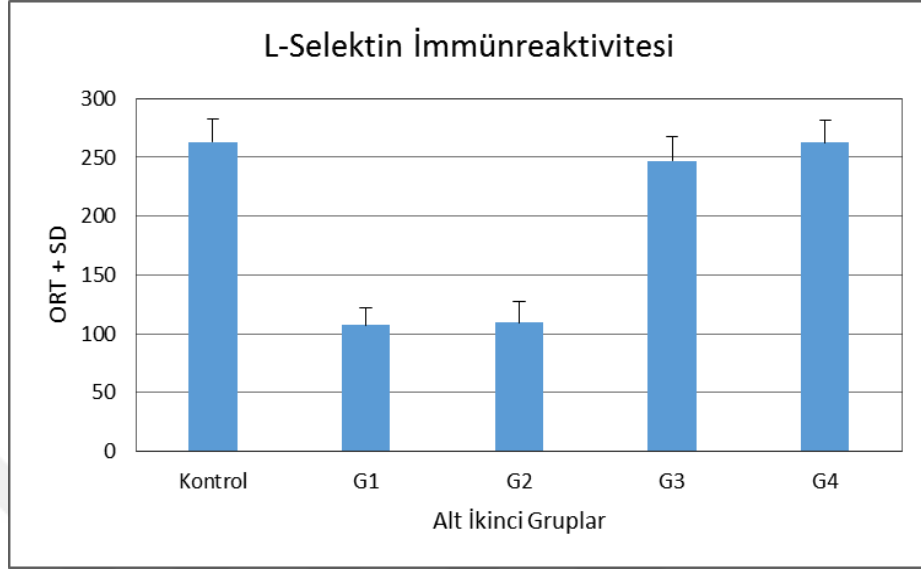
ALT İKİNCİ GRUPLARIN LAMİNİN BOYAMASI	
SAĞ UTERİN HORN (Ok: Laminin pozitif hücreler)	
	
SOL UTERİN HORN	
BY (G1-2) (Ok: Laminin pozitif hücreler)	NİŞ (G2-2) (Ok: Laminin pozitif hücreler)
	
KİMKH (G3-2) (Ok: Laminin pozitif hücreler)	KİMKH+NİŞ (G4-2) (Ok: Laminin pozitif hücreler)
	

Resim 6.6.1.2 Alt ikinci grupların endometriyumda **Laminin** boyanma görüntüleri.

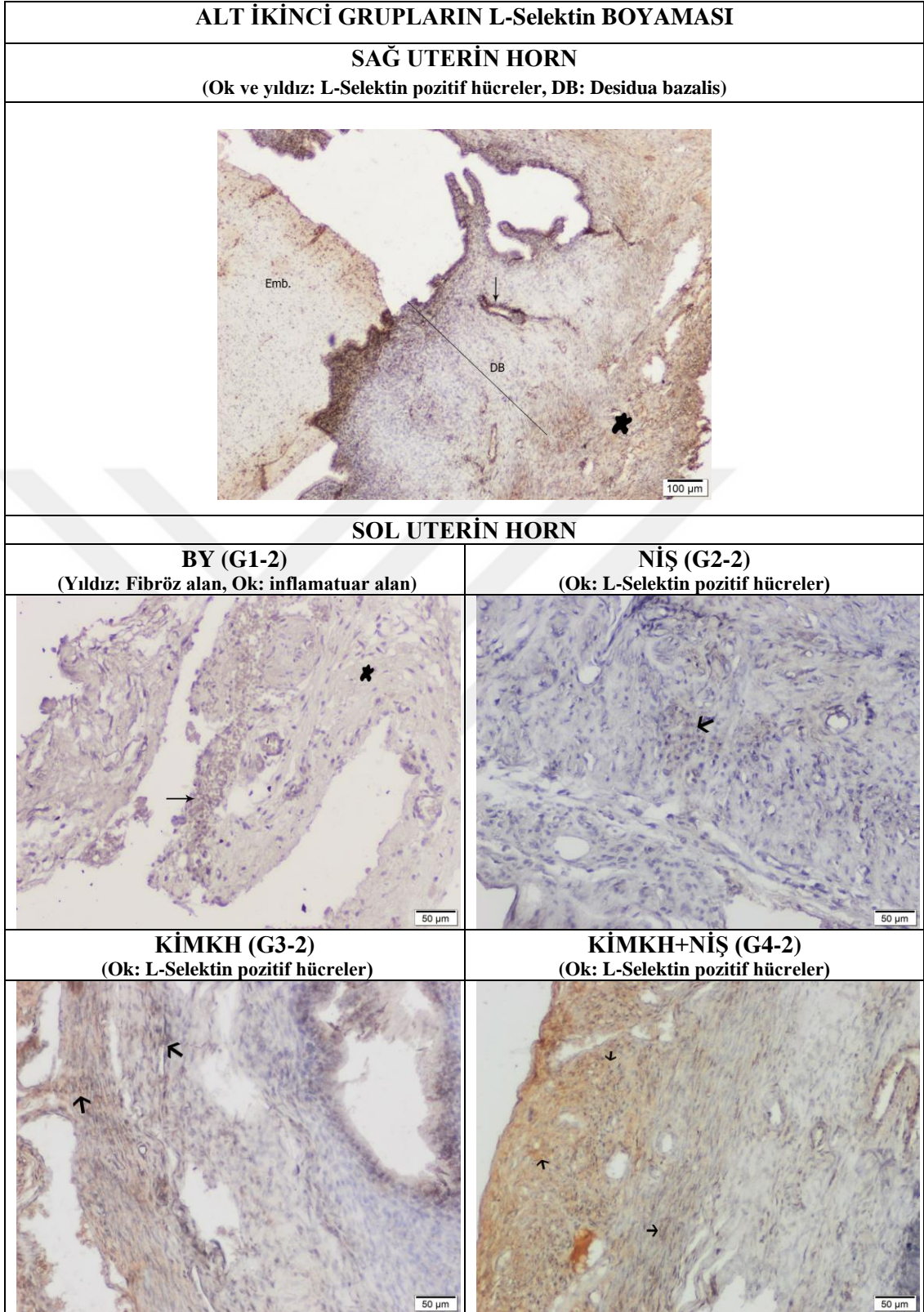
6.6.2. L-Selektin

Çalışmamızda periton içi besiyeri, niş, kök hücre ve kök hücre + niş (G1-2, G2-2, G3-2, G4-2) grubu uterus örneklerinde yapılan indirekt immunohistokimyasal inceleme sonucunda L-selektinin özellikle yüzey epiteli ve miyometriyum başta olmak üzere dokuların büyük çoğunluğunda boyanmış olarak bulundu (**Resim 6.6.2.1**). Bu moleküller embriyonun endometriyuma adezyonunda önemli roller üstlenirler. Bu nedenle implantasyonda önemi oldukça falza olan L-selektinin gruplarda ki ekspresyonuna bakıldı ve istatistiksel olarak anlamlılıkları değerlendirildi. BY ve NİŞ gruplarında gebelik oluşturulmasına rağmen sol uterin hornda implante olmuş embriyolara rastlanmadı. Embriyo implante olmuş ve olamamış dokular anti-L-selektin antikoru ile immünohitokimyasal olarak boyanarak değerlendirildiğinde BY ile NİŞ kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmamıştır. By ile KİM KH grupları arasında $***p<0,001$ anlamlılık, BY ile KİM KH+NİŞ grupları arasında $****p<0,0001$ şeklinde oldukça yüksek derecede anlamlılık olduğu, ayrıca NİŞ ile KİM KH grupları arasında $***p<0,001$ anlamlılık, Niş ile KİM KH+NİŞ arasında da oldukça yüksek anlamlılık tespit edilmiştir ($****p<0,0001$). KİM KH ile KİM KH+NİŞ arasında ise anlamlılık $*p<0,05$ olarak belirlendi. Sağ gruplardaki implante olmuş embriyo dokuları ile KİM KH+NİŞ grubu karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak $p>0,05$ şeklinde anlamlılık görülmedi (**Tablo 6.6.2.1**).

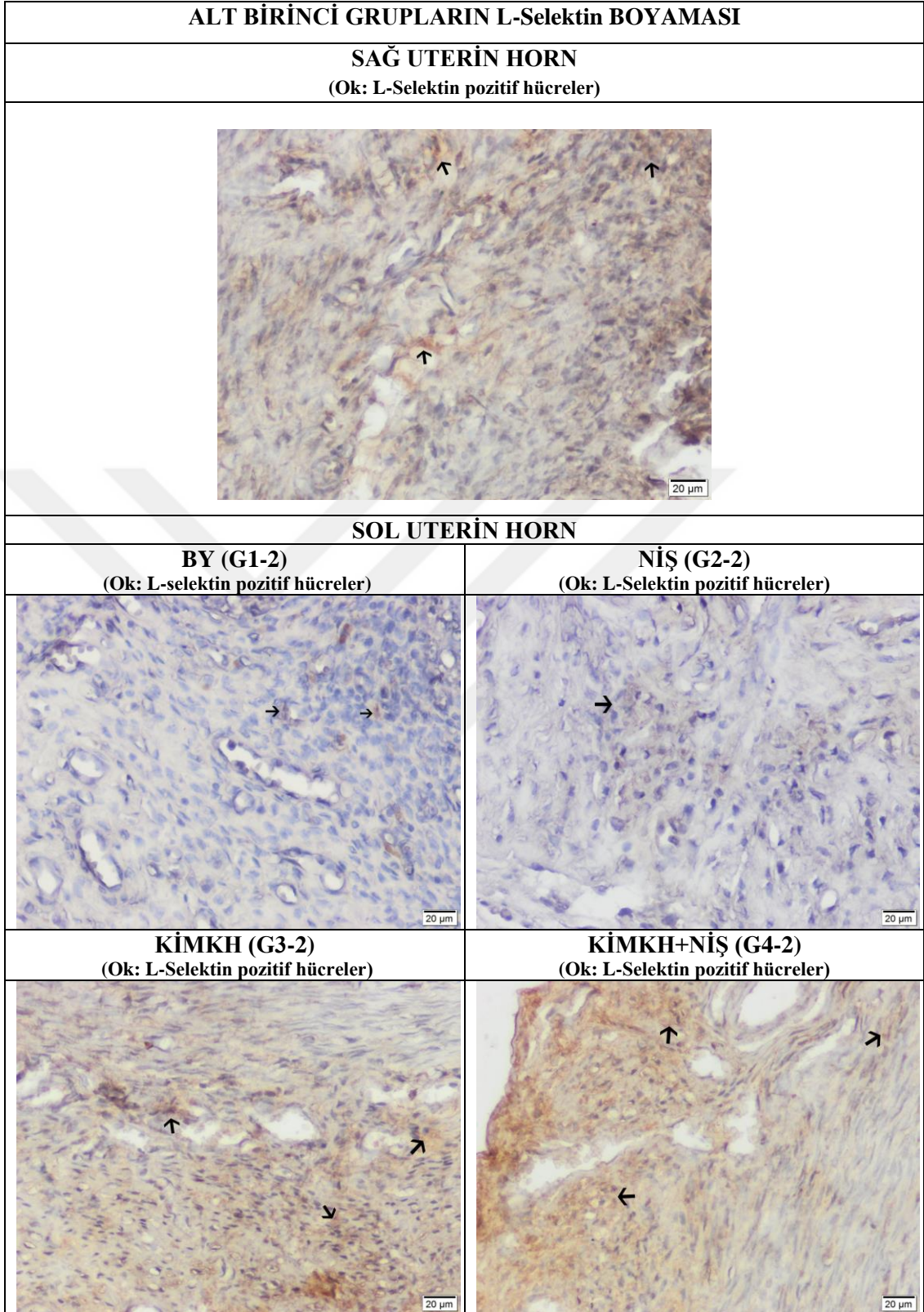
Tablo 6.6.2.1. Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki L-Selektin dağılımına etkisi.



BY (G1) vs NİŞ (G2) $p > 0,05$,
BY (G1) vs KİM KH (G3) $***p < 0,001$,
BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p < 0,0001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) $***p < 0,001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p < 0,0001$,
KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) $*p < 0,05$,
KİM KH+NİŞ (G4) vs Kontrol (Sağ horn) $p > 0,05$



Resim 6.6.2.1 Alt ikinci grupların endometriyumda L-Selektin boyanma görüntüleri.

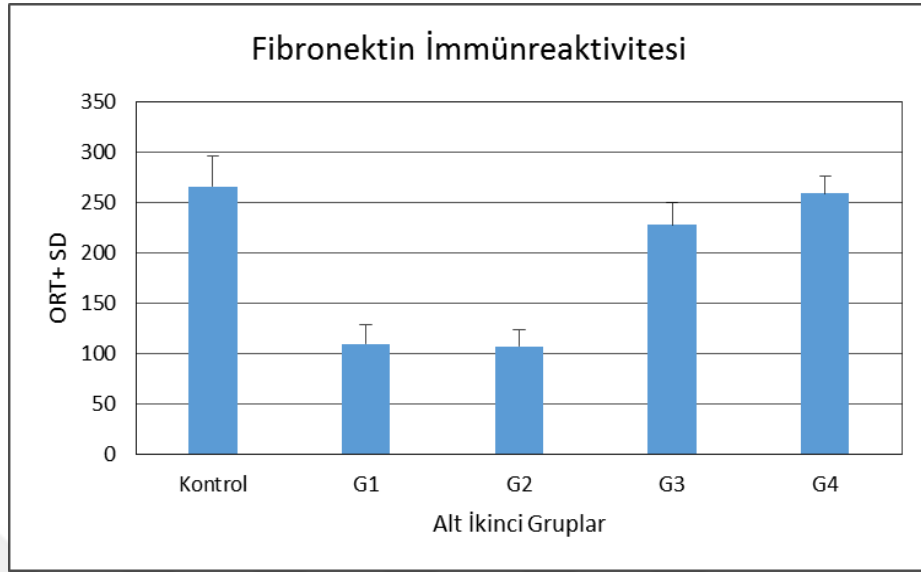


Resim 6.6.2.2 Alt ikinci grupların endometriyumda **L-Selektin** boyanma görüntüleri.

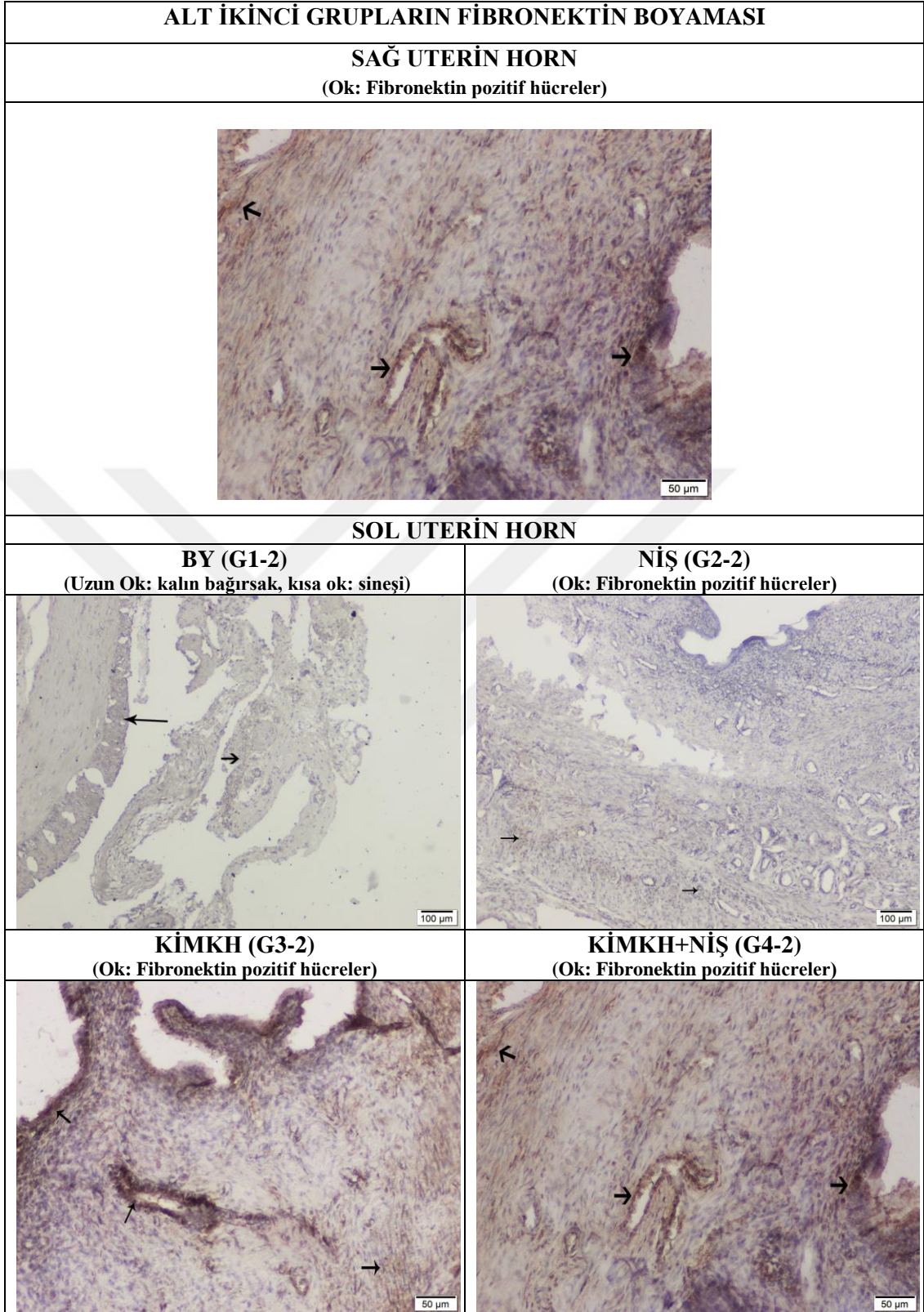
6.6.3. Fibronektin

Asherman deneysel modeli oluşturduğumuz çalışmamızda periton içi BY (G1-2), NİŞ (G2-2), KİM KH (G3-2) ve KİM KH+NİŞ (G4-2) tedavi gruplarında indirekt immunohistokimyasal boyama sonucunda fibronektin özellikle yüzey epiteli, bez epiteli ve miyometriyumda boyanmış olarak bulundu (**Resim 6.6.3.1**). Önemli adezyon moleküllerinden olan fibronektin implantasyon sırasında önemli roller üstlenir. Bu nedenle implantasyonda önemi oldukça fazla olan fibronektinin gruplarda ki ekspresyonuna bakıldı ve istatistiksel olarak anlamlılıkları değerlendirildi. BY ve NİŞ gruplarında $p>0,05$ şeklinde anlamlılık tespit edilememiştir. BY ile KİM KH grupları arasında gebelik oluşturulmasına rağmen sol uterin hornda implante olmuş embriyolara rastlanmadı. Embriyo implante olmuş ve olamamış dokular anti- fibronektin antikoru ile immünohistokimyasal olarak boyanarak değerlendirildiğinde, BY ile NİŞ grupları arasında $***p<0,001$ anlamlılık, BY ile KİM KH+NİŞ grupları arasında ise oldukça yüksek istatistiksel anlamlılık belirlenmiştir ($****p<0,0001$). NİŞ ile KİM KH grupları arasında $***p<0,001$ anlamlılık, NİŞ ile KİM KH+NİŞ grupları arasında $****p<0,0001$ anlamlılık, KİM KH ile KİM KH+NİŞ grupları arasında $**p<0,01$ anlamlılık ve sağ gruplardaki implante olmuş embriyo dokuları ile KİM KH+NİŞ grupları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak $*p<0,05$ anlamlılık tespit edilmiştir (**Tablo 6.6.3.1**).

Tablo 6.6.3.1 Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki **Fibronektin** dağılımına etkisi.



BY (G1) vs NİŞ (G2) $p>0,05$,
BY (G1) vs KİM KH (G3) $***p<0,001$,
BY (G1) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p<0,0001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH (G3) $***p<0,001$,
NİŞ (G2) vs KİM KH+NİŞ (G4) $****p<0,0001$,
KİM KH (G3) vs KİM KH+NİŞ (G4) $**p<0,01$,
KİM KH+NİŞ (G4) vs Kontrol (Sağ horn) $*p<0,05$



Resim 6.6.3.1 Alt ikinci grupların endometriyumda **Fibronectin** boyanma görüntüleri.

7. TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada; AS oluşturduğumuz sıçan uterusunda tedavi uyguladığımız BY, Niş, KİM KH ve KİM KH+ Niş gruplarının gebelik oluşmadan ve gebe kalan deneklerde implantasyon sürecinde uteruslarında oluşan değişiklikler makroskobik, histolojik, immunohistokimyasal boyamalarla değerlendirildi. Bu çalışmada histolojik görüntüler gebelik oluşmayan ve gebelik oluşan gruplardan elde edilen uterus örneklerinde incelendi. KİM KH ve nişinin AS neden olduğu adezyonlarda ki rolü ve 12. gün implantasyon oranına etkisi araştırıldı. Hücrelerin rejenerasyonun KİM KH ve nişi ile tedavi edilen gruplarda ilerlediği, yeni damar oluşumlarının arttığı ve bezlerin daha belirgin hale geldiği, AS patolojisinde kaçınılmaz olarak oluşan fibrozis ve inflamasyonun azaldığı, endometriyal kalınlığın arttığını gösteren histolojik bulgular elde edildi. Buna karşılık kök hücrelerin sebep olduğu hiçbir olumsuz patolojik bulguya rastlanılmadı. Gebe uterusunda KİM KH ve KİM KH+ Niş ile oluşan değişikliklerin protein düzeyinde yapılan analizinde endometriyum kendi kök hücrelerinin ve uygulamaya bağlı kök hücrelerin arttığı Stro-1 ve c-kit ile, matriks değişiklikleri laminin ve fibronektin ile, embriyo etkisi L-selektin ile, vaskülarizasyon VEGF ile, proliferasyon PCNA ile, rejenerasyon TGFbeta-1 ile, oksidatif stres NOS (eNOS) ile H-score üzerinden ve apoptoz TUNEL ile apoptotik indeks ile değerlendirildi. BY vNiş tedavisi uygulanan gruplarda ise immünreaktivitenin KİM KH uygulanan tedavi gruplarına göre tam tersi değişimler gösterdiği görüldü.

İUA'lara bağlı amenore gelişimi 20. yüzyılın başında ilk defa tanımlansa da, daha sonra Asherman tarafından 1948 yılında bir hastalık olarak tanımlanmıştır ve bu nedenle Asherman Sendromu olarak da adlandırılır. Bu sendromun patolojisini ortaya çıkarmak için gerçekleştirilen incelemelerde glandüler dokunun da eşlik edebildiği avasküler fibröz bağ doku bantlarının yoğun olarak izlendiği, genellikle elektif gebelik sonlandırılmasındaki intrauterin adezyon riskinin düşük olduğu bildirilmiştir. Doğum veya düşükten sonra ilk dört haftada, endometriyumun bazalis tabakası hasarlanmaya çok uygundur, bu sebeple gerekli olmadıkça bu dönemde küretaj işlemi yapılmamalıdır. AS insidansı son yıllarda artan sezeryan ve uterin cerrahiler sebebiyle yükselmesinin yanı sıra bu konuyla alakalı ayrıntılı tanı yaklaşımlarının belirlenmesi için farkındalığın da arttığı görülmektedir (March

2010). Böylece bu sendromun tedavisindeki gelişmelerin toplanıp daha etkili bir yöntemin belirlenmesi oldukça önemli hale geldi. Bizde yaptığımız çalışmamızla son yıllarda popülaritesi oldukça artmış olan kök hücreleri kliniğe sokabilecek deneysel modelleme üzerinden yola çıkmak istedik. Elde ettiğimiz sonuçların ve gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmelerin literatüre kazandırılmasıyla mezenkimal kök hücrelerin, tedavisi mümkün olmayan veya olumlu yanıtın geç alındığı klinik tablolarda alternatif tedavi seçenekleri arasında yerini almasını kolaylaştıracaktır.

İUA'ların tedavisine yönelik randomize kontrollü çalışmalar bulunmamaktadır. Standart tedavi direk gözlemleyerek cerrahi ile adezyonların giderilmesidir. Adezyonların giderilmesi ile gerek normal anatomiye sahip bir kavitenin oluşturulması gerekse fonksiyonel bir endometriyumun sağlanması amaçlanır. Güncel tedavi yöntemlerinde sıklıkla histeroskopi tercih edilir. Devamlı sıvı infüzyonu ile basınç uygulanarak gerektiğinde mekanik keskin makas, elektrocerrahi ve lazer eklenerek doğrudan gözlem altında yapışıklıklar giderilebilir. Çok daha ciddi adezyonlarda servikal kanalın dilatasyonu sırasında dikkat edilmelidir. Servikal kanalda oluşturulacak yanlış yollar nedeniyle kaviteye geçiş oldukça zor olabilir ve uterin perforasyona sebep olabilir. Hastalık ağır ise anatomi net olarak tanımlanamıyorsa transabdominal ultrasonografi veya laparoskopi eşliğinde işlem yapılmalıdır. Histeroskopik adezyolizis sırasında komplikasyon nadir olarak izlenir. Akut olarak uterin perforasyon, sıvı yüklenmesi, dengesiz elektrolit seviyesi, hemoraji ve enfeksiyon görülebilir. Geç dönem komplikasyonu olarak ise tekrarlayan adezyonlar ve sonraki gebelikte uterin rüptür ile kendini gösterir. Uterin yapışıklıklar sıklıkla inkomplet abortus (%50), postpartum kanama (%24) ve elektif gebelik sonlandırılması (%17) sonrasında izlenmektedir (Salzani ve ark. 2007). Etyolojide ise daha aza sıklıkla myomektomi, histeroktomi, tanısal küretaj, sezeryan, tüberküloz ve uterin kompresyon süturleri ile adezyonlar bildirilmiştir (Luk ve ark. 2007). Histeroskopi AS'da altın standart olarak görülse de birçok hastada operasyon sonrası yeniden adezyon oluşumu maalesef engellenmemektedir. Bu nedenle operasyon sonrasında yeni adezyon oluşumunu önlemek amacıyla hormonal takviye, rahim içi araç veya balon kataterler kullanılabilir. Bu yöntemlerin etkinliğini tedavi edilmeyen hastalarla karşılaştıran çalışma mevcut değildir. İşlemden sonra kullanılan östrojen

ve progestin takviyesinin adezyonları önlediği söylenmiş olmasına karşın etkinliği kanıtlanmamıştır (Goldenberg ve ark. 1995).

Rahim dokusu ameliyatla restore edilmesine rağmen, adezyonların yeniden oluşumu ve uterin ameliyatların komplikasyon riski, yeni tedavi seçeneklerine olan ihtiyacı ortaya çıkarmıştır. Sineşi gibi intrauterin oluşumların tedavisi için; seri esnek histeroskopiler (Robinson ve ark. 2008), intrauterin adhezyon bariyer sistemleri (Abbott ve ark. 2004), taze amniyon grefti (Amer ve ark. 2006), seprafilm'in intrauterin insersiyonu, (Tsapanos ve ark. 2002), histeroskopik cerrahi (Orhue ve ark. 2003) ve hyaluranik asit jelleri (Lin ve ark. 2013) gibi çeşitli girişimler vardı. İntrauterin dolgu maddeleri ile ilgili temel problemlerden biri, uterusu yabancı bir cisim bulduğundan eşzamanlı antibiyotiklerin kullanılmasına duyulan ihtiyaçtır. Vajina ile temas halinde klinik veya subklinik pelvik enfeksiyonlar sekonder infertiliteyi artırabilmektedir.

Son zamanlarda gelinen nokta şu ki; cerrahi işlemlerden sonra endometrial dokunun yeniden iyileşebilmesi ve fonksiyonel aktivitesine devam edebilmesi için östrojen ve progesteron takviyesi birincil seçenek olarak önerilmektedir. Tabii bu önerinin etkileri her hastada aynı şekilde etkisini göstermemektedir. Bazı araştırmacılara göre oral östrojen takviyesinin sistemik yan etkileri kaçınılmaz olduğundan mikro boyutta östradiolün vajinal uygulanmasının endometrial östradiol konsantrasyonunu daha fazla artırdığı rapor edilmektedir. Ama hala östrojenin bu şekildeki uygulamalarının da hastalarda çeşitli kontrendikasyonlara sebep olduğu bilinmektedir (Tourgeman ve ark. 1999). Bu tarz problemler araştırmacıların yeni tedavi anlayışları için daha çok çalışmalarına neden olmaktadır. Östrojen ile yapay hormon tedavisi, endometriyal proliferasyon ve anjiyogenezin desteklenmesi için sıklıkla kullanılmaktadır (Chen ve ark. 2013). Düşük östrojen, fibroblastların proliferasyonunu artırarak endometriyal fibrozis için bir risk faktörü olabilmektedir. Ayrıca, şiddetli AS'lu hastaların çoğu tek başına östrojene hiçbir yanıt vermemektedir. Araştırmalarda hormon uyarımı altında endometriyal büyümeyi indükleyen kök hücrelerin kullanımı etkinliğini artırmaktadır. Çünkü AS'da adezyonların ana nedeni olan kök / progenitor hücre kaybının olmasıdır. Bu nedenle, yetişkin olarak şiddetli AS'da hormon tedavisi tek başına yetersizdir. Kök hücreler, adet döngüsü sırasında yeni endometriyumun kaynağıdır. Gelecek çalışmalarda

hormon stimülasyonu altında proliferasyonu ve farklılaşmasının in vivo ve in vitro olarak doğrulamak için yeni hipotezler geliştirilmelidir.

Çalışmamızda alternatif yöntemlere katkı sağlayacak ve önümüzde ki yüzyılın belkide en önemli tedavi aracı olacak kök hücreleri kullanarak intrauterin adezyonları gidermeye ve önemli infertilite problemlerinden olan bu yapışıklıkları ortadan kaldırılmaya çalışıldı. Nitekim gruplardan elde edilen gerek makroskobik bulgular; embriyo sayısı, yeni doğan sayısı, sakrifikasyon sonrası endometriyumun anatomik yapısı gerekse mikroskobik olarak doku takibi sonucu elde edilen histopatolojik bulgular bunu kanıtlar nitelikte olmuştur. İmmünohistokimyasal bulgularımızda PCNA ve VEGF immünreaktivitesinin anlamlı artışlar gösterdiği gözlemlenmiştir. proliferasyonun tetiklendiği ve vaskülarizitenin artışının gerçekleştiği görülmüştür. PCNA, Ki-67 ve VEGF pozitivitesi değerlendirilen çalışmada ki bulgularla kıyaslandığında anlamlılık derecesi benzerlik göstermiştir. Yine mezenkimal kök hücre karakterizasyonunda kök hücre markerlarından anti-stro-1 ve anti- c-kit antikolarıyla tespit edilmiştir. Eksperimental As modelinde kullanılan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için CD(90+), CD(45+) ve CD(49+) markerlarıyla belirlendiği rapor edilmiştir (Kılıç ve ark., 2014).

Endometriyal restorasyon için kök hücre tedavisi son zamanlarda kenar tedavi olmaktan uzaklaşıp merkezi tedavi seçeneği olmaya başlamıştır. Özellikle kemik iliğinden elde edilen kök hücreler en sık kullanılan kök hücre kaynağı haline gelmiştir. Bu hücreler aspirasyon yoluyla direkt olarak kemik iliğinden izole edilirler. KİMKG'ler kapsamlı göç ve pluripotent potansiyeli nedeniyle hem insan hem de kemirgenlerden rahatlıkla elde edilebilirler. Endometriyal rejenerasyon ve anjiyogenez etkileri olan kök hücreler immüno-manyetik izolasyonu ile kemik iliğinden arındırılırlar (Nagori ve ark. 2014). Sonuçta endometriyumu implantasyona hazır hale getirirler.

Asherman sendromlu farelerde KİMKG intrauterin uygulaması sonrasında hücrelerin endometriyuma göç ettiği ve Y kromozomda CD45 içeren hücrelerin endometriyumdaki hücrelerin binde biri kadar olduğu görülmüştür. Hasarlı uteruslarda bu hücre sayısı iki katına çıkmaktadır. Hasar oluşturulmuş horn ile hasarlı olmayan horn arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fertilite açısından

3/10 olan oran, KİM KH ile 9/10'a çıkmıştır. Ancak doğum süreci ve bebeklerin büyüklükleri açısından bir fark oluşmamıştır. Bu çalışma KİM KH ile endometriyal alıcılığın artırılarak implantasyon başarısının kesinlikle geliştirildiğine işaret etmektedir. Özellikle endometriyumun kendi kök hücrelerinin oluşan hasara bağlı olarak endometriyal rejenerasyonu sağlayamadığından dışarıdan uygulanan transplantasyon kök hücrelerinin kalıcı oldukları ve fonksiyon göstererek implantasyon başarısını artırdıkları görülmüştür. Erkek KİM H kullanılması nedeniyle Y pozitif hücrelerin kolaylıkla gösterilebildiği bu çalışmada, transplante hücrelerin üç ay sonrasında bile uterusu kalabildikleri ispatlanmıştır (Alawadhi ve ark. 2014). İnsan endometriyal dokusu her menstrüel siklusa rejenerasyonunu kusursuz tamamlamada dinamizmi en kuvvetli dokulardanandır. Genel inanişaya göre endometriyumun fonksiyonals ve bazals katmanlarında bulunan öncü hücrelerin bu dinamizmde rol oynadıkları konusunda olsada, endometriyumun rejeneratif yeteneğinde KİM KH'lerin de olduğuna dair literatür bilgisi mevcuttur (Gargett ve Mesuda 2010).

Kök hücrelerin uterusu hareketi, menstrüasyonla kaybedilen endometriyal hücrelerin yerine konulmasından ziyade yaralanma veya gebeliğe karşı onarıcı bir mekanizma olabilir. Aslında, yeni bir çalışmada, bütün bu bahsedilenler için erkek kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin hiç katkıda bulunmayabileceğini düşündürmektedir (Cervello ve ark. 2012). Uterusa tutunan KİM KH'lerin sayısı düşüktür ve bu hücreler tüm endometriyumun yerini almak üzere klonal genişlemeye maruz kalmaz; daha çok, uterus onarımı ve rejenerasyonuna yardımcı olan trofik faktörleri salgırlar (Curley ve ark. 2012; Wang ve ark. 2012). Şiddetli Asherman sendromunda görüldüğü gibi, ağır hasar durumunda, kök hücrelerin kısıtlı tedariki onarım sürecinde sınırlayıcı faktör olabilir. Azalmış bir kök hücre havuzu veya bunları uterusu alma yeteneği, AS'ye muhtemelen katkıda bulunur. Lokalize uterus hornu hasarında KİM KH'leri her iki uterus boynuzunun endometriyal stromasına da sokulurlar. İnflamasyon ve yaralanma bu hücrelerin endometriyuma gelmesinde önemli rol oynayabilir. Kök hücreleri lokal olarak içine çeken sinyal yerine bu hücrelerin bütün uterus stromasına girişine neden olan sinyaller salındığı düşünülmektedir. Küçük bir hasar bile kök hücrelerin toplanmasına yeterli olabilir ve bu endometriyumun biyolojik yapısıyla alakalı olarak İV F oranını artırmaya yönelik

bir hamlesi olabilir. Erkek sıçanların tibia ve femur kemiklerinden elde ettiğimiz KİMKGH'leri AS oluşturduğumuz dişi sıçanlara periton içinden transfer ederek tedavi olanaklarını inceledik. Sonuçta bahsedilenin aksine erkek sıçanlardan elde edilen KİMKGH'ler Asherman modelinde etkisini çok yüksek seviyede göstererek kapanmış olan uterin hornlarda da embriyo implantasyonuna olanak tanıdığı gözlemlenmiştir. Son zamanlarda yapılmış güncel çalışmalardan birinde; fenol musilaj ile adezyon oluşturulmuş deneysel modelde NF-kB ekspresyonunun seviyesine bakılmış ve istatistiksel değerlendirmesi H-skor üzerinden yapılmıştır. Elde edilen bulgularda NF-kB seviyesinin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca implantasyon oranında bakılarak AS oluşturulan gruplarda ortalama 5,9 embriyo implante olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark. 2018). Bizde çalışma gruplarımızdan alt ikinci gruplarda sırasıyla ortalama (BY-G1-2: $4,33 \pm 0,57$, NİŞ-G2-2: $4,75 \pm 0,5$, KİMKGH-G3-2: $6 \pm 0,81$, KİMKGH+NİŞ-G4-2: $8,2 \pm 0,83$) implante olmuş embriyo gözlenmiştir. Bununla beraber alt üçüncü gruplardaki yeni doğan sayılarında bu sayısal verilere yakın değerlerde bulunmuştur.

Masson trikrom ile fibrozis oranları değerlendirilerek hesaplamalar istatistiksel olarak incelenmiştir. Skorlama semikantitatif olarak yapılarak fibrozisin gruplar arasındaki anlamlılıkları gösterilmiştir. Wang ve ark. yaptığı çalışmayla paralellik gösteren fibröz alanlar gözlemlenmiştir. Fibrozis açısından (**Tablo 6.3.2**) gruplar karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak en fazla anlamlılık BY ile KİMKGH+NİŞ ve NİŞ ile KİMKGH+NİŞ arasında (**p<0,0001), sonrasında BY ile KİMKGH (**p<0,01) ve en az anlamlılık KİMKGH ile KİMKGH+NİŞ grupları arasında tespit edilmiştir (*p<0,05). BY ile NİŞ ve NİŞ ile KİMKGH grupları arasındaki p değeri p>0,05 olarak belirlendiğinden bu gruplar arasında fibrozis yönünden anlamlı fark bulunamamıştır.

Son zamanlarda, endometriyum epitelyal ve stromal MKH'lerin, insan endometriyumundaki bazal tabakasında yetişkin MKH'ye benzeyen popülasyonları çok nadir tanımlanmıştır (Gargett ve ark. 2016). Endometriyal kök hücrelerin kaynağı henüz belirsizliğini koruyor. Fakat KİMKGH'ler, menstürel kan kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve adipöz kök hücreler dahil olmak üzere birçok kaynak içerdiği kabul edilmiştir (Tan ve ark. 2016). Bunların hepsi endometrial yaralanmalardan sonra meydana gelen doku hasarını iyileştirmek için güçlü bir

eğilim gösterir. Bu üç tip kök hücre arasında insan çalışmalarında kök hücre kaynağı olarak en yaygın kullanılanı KİMKH'lerdir. 2011'deki ilk klinik vakada, ağır İUA ve primer infertilitesi olan bir hastanın uterin kavitesine otolog KİMKH transplantasyonu uygulandı. Daha sonra, hastanın endometriyal kalınlığı 3,2'den 6,9 mm'ye çıkarıldı ve in vitro fertilizasyon-embriyo transferi ile pozitif biyokimyasal gebelik elde edilmiştir (Nagori ve ark. 2011). Bununla birlikte, KİMKH transplantasyonunun endometriyal rejenerasyonu geliştirdiği kesin mekanizma bilinmemektedir. Benzer şekilde, menstrüel kan kaynaklı kök hücrelerin 7 olgulu deneysel, kontrolsüz, prospektif 3 yıllık bir klinik çalışmada endometriyal kalınlık (7 deneğin 5'inde) ve gebelik oranını (7 deneğin 2'sinde) geliştirdiği bildirilmiştir (Tan ve ark., 2016). Bu hücrelerle ilgili endişeler ise; adet hücresi ürününün sterilizasyonu ve saflaştırma yöntemlerindeki belirsizliklerdir. Diğer taraftan AKH'ler, muhtemelen yağ dokusu eldesinde liposakşın için invaziv işleme ihtiyaç duyulması, yaşla birlikte azalan farklılaşma potansiyeli ve saf hücre elde edilmesinin düşük olması nedenleriyle insan çalışmalarında henüz kullanılmamıştır (Gargett ve ark. 2016). AKH'ler ilk olarak intarauterin uygulanmış diğer uygulamaları intravenöz uygulamayı taklit eden intra-peritoneal uygulama şeklinde olmuştur. İlk uygulama yolunun nedeni, hasarların akut fazında kök hücrelerin göçü, farklılaşması ve hayatta kalması oranına nötrofil aktivasyonu ve c-reaktif protein ile ilişkili zararlı etkilerin artmasından kaynaklanmaktadır (Gargett ve ark. 2016).

Asherman modeli üzerine tavşan ve kemirgenler başta olmak üzere birçok hayvan kullanılarak deneysel modeller tasarlanmaya çalışılmış ve uterin adezyonlar için alternatif tedavi yöntemleri denenmiştir. Özellikle tavşanlar ve kemirgenlerde mekanik hasarlar, fiziksel hasarlar, lazerli hasar oluşturma modeli, küretaj modeli, lipopolisakkaridli küretaj sütürü ile enfeksiyon oluşturularak adezyon geliştirilen model ve %10 formalin, trikloroasetik asit, polietilen spanç, fenil musilaj gibi kimyasallar kullanılarak oluşturulan deneysel modeller tasarlanmış ve fibrötik doku azaltılmaya, vaskülarizasyon artırılmaya çalışılmıştır (Birkenfeld ve ark. 1991; Chen ve ark. 2010; Liu ve ark. 2013). Biz bu modellerden, incelemelerimiz ve sunulan bulgular eşliğinde Kılıç ve ark. yaptığı asit kullanılarak oluşturulan modelle deneysel düzeneğimizi kurmayı tercih ettik (Kılıç ve ark. 2014). Çünkü asitin oluşturduğu sineşiyle AS için uygun adezyon şartları oluşturduğunu gözlemledik. Çalışmaya

başlamadan önce üç denekle ön çalışma oluşturuldu ve bu çalışma neticesinde gruplar ve deney düzeni oluşturuldu. Sonuçta dişi sıçanlarla gerçekleştirdiğimiz İUA modelinde hem morfolojik hem de histolojik pozitif sonuçlar elde edildi. Birinci ve ikinci grubumuzun alt gruplarından ilkinde H&E ve Masson boyama sonuçlarında tedavi gruplarımıza göre endometriyal kalınlığın azalması, endometriyum epitelinin dejenerasyonun maksimuma çıkarak miyometriyuma kadar hatta yer yer miyometriyumda da nekrozun artması, fibröz bağ dokusu bantlarının artması, inflamasyonun artması, bez sayısındaki azalma gibi bulgularımızla tercihimizde haklı çıkarıcı bulgular olarak rapor edildi. Burada tarif edilen sıçan İUA modeli ile endometriyal yaralanma sorunlarına yeni yaklaşımların etkinliğini ve güvenliğini artıracak, bu alanlarda yapılacak keşiflere yeterince hizmet edebilecektir. Yaptığımız çalışmada KİMKH'lerin deneysel bir modellemede endometriyum rejenerasyonunda rol oynadığını ve özellikle nişiyle birlikte hücrelerin transplante edilmelerinin çok önemli olduğunu gözlemledik.

KİMKH'lerin hematopoietik olmayan hücrelere farklılaşabileceği bilgisine dayanarak; 2004 yılında bir araştırma yapılmış ve tüm alıcıların endometriyal biyopsi örneklerinde kemik iliği kaynaklı endometrial hücreler tespit edilmiştir. Bu araştırmaya bulgularına göre kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin tüm epitelyal hücrelerin % 0,2 ila % 48'ini ve stromal hücrelerin % 0,3 ila % 52'sini oluşturduğu rapor edilmiştir (Taylor 2004). Başka bir çalışmada, kemik iliği transplantasyonundan sonra, dişi farelerin uterus endometriyumunda erkek donörden türetilmiş kemik iliği hücreleri bulunmuş ve bu hücrelerden bazılarının epitelyal hücrelere ayrıldığı gözlemlenmiştir (Du ve Taylor 2007). Aynı yıl, başka bir grup, dolaşımdaki CD45 + kemik iliği hücrelerinin, hamilelik sırasında fare uterus epitelinin % 80'inden fazlasına katkıda bulunduğunu göstermiştir (Bratincsák ve ark. 2007). Ayrıca, çok yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre hastanın kemik iliğinden izole edilen otolog kök hücrelerin intrauterin uygulamasının endometriyumu yeniden canlandırıldığı ve sonrasında gebeliğin oluştuğu rapor edilmiştir (Nagori ve ark. 2011).

Bu raporlar değerlendirildiğinde, deneysel intrauterin sineşi modeli Kılıç ve ark. tarafında denendikten sonra, endometriyumun rejenerasyonu için kök hücrelerin kullanılmasının faydalı olduğu ilk deneysel sıçan modeli ile rapor edilmiştir (Kılıç ve ark. 2014). Bu çalışmada adipoz kök hücreler tercih edilmiş ve kronik sineşi

oluşturulan deneklerde tedavi sağlanmaya çalışılmıştır. Adipoz kök hücrelerle kemik ilgi kaynaklı kök hücreler morfoloji ve belirteçler yönünden birbirine çok benzer kök hücrelerdir. Elde edilişleri farklılık gösterir. Çünkü adipoz kök hücreler yağ dokusundan basit bir liposakşınılada elde edilebilmektedir. KİM KH'ler ise biraz daha invaziv işlemler gerektiren ama etkinliği literatür bilgisine göre daha kuvvetli olan hücre gruplarıdır. Transpalntason yapılan çalışmalarda endometrial dokuda yüzdelik dilimlerinin daha fazla olduğuda bildirilmiştir (Taylor 2004). Bizde bu çalışma modelini referans alarak deneysel çalışmamızı gerçekleştirdik. Akut dönemde kemik ilgi kaynaklı kök hücrelerin yeterli konsantrasyonda transpalnte edildiğinde gerçek anlamda infertilite sebebi olan AS'nun üstesinden gelinebileceği kanaatindeyiz. Çünkü oluşturduğumuz deneysel modelde sadece kök hücrelerin endometriyum dokusunun rejeneratif aktivitesindeki rolünü göstermekle kalmadık, akut uygulanan ve hücre sayısının dokuda yeterli sayıya ulaştığında çok etkili bir antiadezyon ajan profili elde edilebileceğininide gözlemledik. Bulgularımızda bunu kanıtlayacak nitelikte sonuçlar elde edildi. KİM KH transplante edilen gruplarımızda PCNA ve VEGF aktivitesininde anlamlı şekilde yükseldiği gösterilmiştir. PCNA immünreaktivitesi KİM KH ve KİM KH+NİŞ gruplarında uterus yüzey epiteli başta olmak üzere, endometriyal bezlerde ve miyometriyumda kaslar arasında yoğun olarak pozitivite gösterdiği gözlemlendi. BY ve NİŞ gruplarında boyanmalar daha çok endometriyal bez hücrelerinde görülmekte fakat reaktivite soluk olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında en fazla anlamlılık BY ile KİM KH+NİŞ ve NİŞ ile KİM KH+NİŞ grupları arasında olduğu tespit edildi (****p<0,0001).

Deney gruplarımızdan alt birinci gruplarda VEGF ekspresyonu için yapılan immünohistokimyasal boyamada VEGF immünreaktivitesinin damarların çevresinde yoğun olmak üzere lamina propriya ve miyometriyum içerisinde de meydana geldiği gözlenmiştir. KİM KH'lerin nişiyle (G4-1) birlikte verildiği grupta diğer gruplara göre anlamlı bir atışın olduğu tespit edilmiştir. VEGF vasküler permabilitiyi artırarak neovaskularizasyonu indükler ve vasküler endotelial hücrelerde gen ekspresyonunu modüle eder. Ayrıca embriyo implantasyonunda da kilit roller üstlenir.

Deneysel çalışmalarda progenitor / kök hücrelerin uterus endometriyumunda yaralı veya hasarsız olarak yer alabileceğini ve uterus endometriyal stroma ve epitel

hücrelerine farklılaşabileceğini bildirmişlerdir (Taylor 2004). Adipoz kaynaklı kök hücrelerin ilk olarak intarauterin uygulanmış, diğer uygulamaları ise intravenöz uygulamayı taklit eden intra-peritoneal uygulama şeklinde olmuştur. İlk uygulama yolunun nedeni, hasarların akut fazında kök hücrelerin göçü, farklılaşması ve hayatta kalması oranına nötrofil aktivasyonu ve c-reaktif protein ile ilişkili zararlı etkilerin artmasından kaynaklanmaktadır (Wu ve ark. 2011).

Akut fazda kök hücrelerin intravenöz uygulamasının ardından bu hücrelerin hasarlı bölgeye gideceğinin bir garantisi yoktur. Miyokard enfarktüsü modelinde eks vivo uygulanan kök hücrelerin büyük çoğunluğunun akciğerde hapsedildiği bildirilmektedir. Aynı yazarlar, iskemik miyokardlı sol ventriküle kök hücre aşılmasının infüzyon kavitesini geliştirdiğini göstermişlerdir (Barbash ve ark. 2003). Diğer yandan; kronik fazda; nötrofil aktivasyonundaki azalma ve kök hücrelerin geliştirilmiş kemotaksisi nedeniyle, intrauterin uygulama gerekli değildir. Bu verilere dayanarak, kök hücre uygulamasını damar yolu yerine doğrudan hasarlı bölgeye yakın alandan intarperitoneal olarak uygulamayı tercih ettik.

Asherman sendromu, infertiliteyle ilişkili endometriyumun kaybı veya basal tabakanın hasarı sonucu ortaya çıkan intrauterin adezyonlar ve fibrozis ile karakterize bir hastalıktır. KİM KH'leri hasar olduğu zaman endometriyuma göç ederler fakat endometriyum rejenerasyonunda karakterize hücreler değildir. Travma oluşturularak gerçekleştirilen fare adezyon modelinde KİM KH'lerin transplante edilmesiyle iyileştirme ve hamilelik oluşturma oranları değerlendirilmiştir. Tek horna zarar verilen grupta hasarlı ve hasarsız boynuz arasında anlamlı fark saptanmamış olup gebelik oranı hücre verilen grupla verilmeyen grup arasında anlamlı fark saptanmıştır. KİM KH'leri gebelik için AS'lu hastalarda önemi bir tedavi seçeneği olmaktadır (Alawadhi ve ark. 2014). Murin endometriyumu, epitel ve stroma içeren tek bir tabakadan oluşur. Bu nedenle, murin endometriyumun uygun bir uterin endometriyal araştırma modeli olduğu düşünülmektedir.

Erişkin kök hücre popülasyonunun insan endometriyumunda var olduğuna dair önemli kanıtlar vardır ve bu nedenle endojen endometriyal kök/progenitor hücrelerin aktive olabileceği veya kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin AS'da endometriyal rejenerasyon için uterus kavitesine transplante edilebileceği önerilmektedir.

Menstürasyon ve doğurganlığa ulaşmada refrakter AS'lu kadınlarda sub-endometriyal otolog kök hücre implantasyonunun rolünü değerlendirildiği araştırmada; geçmişte standart tedavi seçeneği histeroskopik adezyolizis ile başarı sağlanmayan altı refrakter AS vakası olan kadın çalışmaya dahil edilerek mononükleer kök hücrelerin subendotelyal bölgeye implante edilmesiyle endometriyal kalınlık değerlendirilmesi yapılmıştır. Aynı zamanda östrojen tedavisi de uygulanan kadınların endometriyumlarındaki kalınlığın istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı rapor edilmiştir (Singh ve ark. 2014). Küretajdan önce transplantasyonunu içeren, bu çalışmada, embriyonun implantasyonu için ideal bir endometriyum (Endometriyal kalınlık < 7 mm) olmamıştır. Çünkü kemik iliğindeki gerçek kök hücre oranı nispeten düşüktü. Ayrıca, nakledilen hücreleri endometriyum yüzeyinde hareketsizleştirmek oldukça zordur. Bu nedenle mononükleer kök hücre kaynağı değil kültüre edilmiş mezenkimal kök hücreler implante edilmeli ve sayısının artırılması için tekrarlayan şekilde uygulanması yapılmalıdır. Çalışmamızda bu tarz olumsuzlukları göz ardı etmeden 10 gün boyunca tekrarlayan şekilde 1×10^6 /ml hücre deneklere intraperitoneal olarak verilmiştir. Özellikle benzer çalışmalardan farklı olarak kronik değil akut dönemde adezyonları ortadan kaldırmaya çalıştık. Çünkü fibröz doku arttıkça fonksiyonel endometriyumun geriye döndürülmesi oldukça zor olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızı akut düzende oluşturduk ve henüz doku tamamen dejenere olmadan kök hücreleri hasarlı bölgeye gidecek kadar transplante etmeyi hedefledik. Böylece elde ettiğimiz bulgularda da görüldü ki KİMKH'leri dokuda hasar meydana geldiği zaman o bölgeye hızlıca nüfuz ederek ortamın nişini değiştirir ve hücrelerin apoptoza sürüklenmesini engelleyerek rejnerasyonu artırmaktadır. c-Kit antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda uterus yapısında yüzey epiteli, endometriyal bezler ve miyometriyumda pozitif alanlar gözlemlendi (**Resim 6.5.1.3**). Alt birinci ve ikinci grubun (BY-G1-1 ve NİŞ-G2-1) c-kit pozitivitesinin endometriyal bezler etrafında çok soluk boyanma şeklinde olduğu görüldü. Sadece kök hücre verilen grubun (KİMKH-G3-1) c-kit pozitifliğinin hem endometriyal bez hücrelerinde hem miyometriyumda hemde stromada oldukça yoğun boyanmaların olduğu gözlemlendi. Özellikle c-kit antikorusunun en fazla pozitif immünreaktivitesi KİMKH ve nişinin verildiği (G4-1) grup ile aynı grubun sağ uterusuna ait dokularda görüldü.

İUA, endometriyal yüzeylerin fibrotik doku ile kısmi yer değiştirmesini içeren daha az şiddetli durumdan oluşur. İUA, özellikle estradiol seviyeleri düşük olduğunda gebelikten sonra, travma veya enfeksiyonun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Enfeksiyon ve inflamasyon, travmatize endometriyumun rejenere edilememesine ve fibrotik doku birikiminde rol oynayan önemli süreçlere katkıda bulunmasına bulunabilir (Gargett ve Healy 2011). Farelerde lipopolisakkarid kullanılarak yapılan akut enflamatuvar uterus hasarı modelinde, transkripsiyonel faktörlerinden SOX2, NANOG ve OCT4'ün ekspresyonunun tepe noktasına çıktığı ve inflamasyonun azalmasıyla bu faktörlerin alt çizgilerine indikleri bildirilmektedir. Bu durum akut hasarda onarım ve rejenerasyon için hayati cevap olabilir. Bununla birlikte, İUA'lu üreme çağındaki kadınlarda endometriyumda sadece NANOG aşırı eksprese edilir. Bu durum NANOG (Nanog homebox) ile SOX2 (Sex-determining Y-box2) ve OCT4 (Octamer-binding protein) arasında uyumsuzluk anlamına gelip İUA'da endometriyal onarımda ve fibrotik doku ile yer değiştirmede başarısızlığa ya da kusura yol açabilir. İUA'nın patogenezinde spesifik transkripsiyonel faktörlerin rolünü tanımlamak için daha fazla çalışma yapılmalıdır. Bununla birlikte, bu transkripsiyon faktörlerine ilgi uyandırmak akut uterus yaralanmasının yanı sıra İUA'nın oluşumuna veya restorasyonuna dahil olabileceğini belirlemek oldukça önemlidir (Xiao ve ark. 2017).

Uterus hasarı oluşturulmuş çalışmalardan birinde insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) potansiyel yararlı etkisini araştırmak üzere sıçan adezyon modeli oluşturularak KİMKGH'lerin salgıladığı IGF-1 ve IL-10 seviyeleri RT-PCR ve immüblotlama ile tespit edilmiştir. Ayrıca bu moleküllerle ilişkili α -SMA (alfa düz kas aktin) immünhistokimyasal olarak tespit edilerek NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) yolağındaki rolleri endometriyal rejenarsyonda rol oynayan moleküler yolaklar araştırılmaya başlanmıştır. IGF-1'ün aşırı eksprese eden KİMKGH'lerinin hasarlı uterusu transplantasyonu, NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonunu artırarak IL-10 ekspresyonunu ve sekresyonunu indükleyerek yaralanmış uterusun fonksiyonel rejenerasyonunu geliştirdiği gösterilmiştir (Wang ve ark. 2018).

Uteruslarında kesi atılarak hasar oluşturulmuş sıçanların uterin kavitelerine tedavi olarak doğrudan enjekte edilen KİMKGH'lerin, hücre enjekte edilemeyen

sıçanlara göre daha kalın bir endometriyuma ve daha yüksek bir endometrial hücre protein markerları olan sitokeratin ve vimentin ekspresyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. Bu, KİMKGH'lerin sıçanların uterus boşluklarına doğrudan infüzyonunun, hücre hasarına karşı koruyan ve endometrial hücrelerin rejenerasyonunu teşvik eden özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2015). Güncel çalışmalarda bir taraftan deneysel olarak oluşturulan hasar ortadan kaldırılmaya çalışılmakta diğer taraftan ise kavite içi, damar içi, yada periton içi gibi uygulama seçenekleri denenmekte ve en etkili kök hücre transfer yöntemi belirlenmeye çalışılmaktadır. Bütün bu gelişmeler yakın gelecekte önemli bir infertilite problemi olan AS'nun kök hücre tedavileriyle üstesinden gelineceğini düşündürmektedir. Endometrial kalınlık grupları arasında alt birinci gruplarda İmagej görüntüleme programı ile ölçülerek yapıldı. Endometrial kalınlığın BY ve NİŞ gruplarında azaldığı, tedavilerinde kök hücre içeren gruplarda (G3-1 ve G4-1) ise yükseldiği saptanmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri üzerinden BY ile NİŞ arasında anlamlı fark bulunmazken, BY ve NİŞ ile KİMKGH ve KİMKGH+NİŞ kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiştir (**Tablo 6.3.3**).

Hu ve ark. İUA'larda endometrial kök hücre ve fibrozisin markerlarının rolünü tanımlayan ilk raporu 2015 yılında sunmuşlardır. Endometrial kök hücreler ve mikro çevre (niş), endometriyumun yenilenmesinden sorumludur. Fibrozis markerlarını fare adezyon modeli oluşturarak gerçekleştirilmiş. Elde edilen bulgularda fibroziste ekspresyonunları artış gösteren α -SMA, TGF- β , CTGF, Kollajen III ve Kollajen I endometrial kök hücre farklılaşma nişini değiştirdiğinden rejenerasyona engel olduğu bildirilmiştir. Endometrial kök hücreler, İUA'lardaki fibroblastlar nedeniyle yanlış yönlendirilirler. Bununla birlikte, İUA'larda spesifik mekanizma ve fibrozisin yolunun daha fazla araştırılması gerekir (Hu ve ark. 2015). TGF- β Hasarlı dokuda homestazi regüle eden önemli bir sitokindir. Bizim bulgularımızda ise AS oluşturulan deneklerin uteruslarındaki indirekt immünohistokimyasal boyamalarda TGF- β 1 rejenerasyonla anlamlı şekilde G4-1 ve G3-1 gruplarında yükseldiği tespit edilmiştir. TGF- β İmflamasyonda da ekspresyonu yükselen bilen, fibroziste de yükselebilen bir marker olmasına rağmen rejeneratif dokuda da ekspresyonunun arttığı bildirmiştir.

c-Kit için yapılan çalışmalarda kronik endometriyal iskemi modelinde sıçanlarda iskemi sonrasında endometriyal hücrelerin apoptoza uğradığı endometriyal kalınlığın, luminal ve bez epitel kalınlığının ve bez sayısının azaldığı görülmüştür. Bu azalmaya paralel bir şekilde c-kit sentezleyen hücrelerin de azaldığı saptanmıştır. Bu proteinin c-kit olarak endometriyal kök hücreler için farklılaşma ve çoğalma potansiyeli ile ilgili bir belirteçtir (Hu ve Yuan 2011). Bizde çalışmamızda kök hücre uyguladığımız gruplarda c-Kit pozitivitesinin arttığını, BY ve Niş verilen gruplarda ise endometriyal hasarla paralel olarak pozitivitenin azaldığı gösterilmiştir.

Selektin boyamalarının incelendiği çalışmalarda da adezyon moleküllerinin en önemlilerinden biri olan selektinler implantasyon penceresi oluşumu ve blastosistlerin buradan geçişleri ile ilgili önemli rol oynamaktadır. İmplantasyon öncesinde endometriyumun bu bölgesi kemokinler, büyüme faktörleri ve MUC-1 gibi adezyon molekülleri ile blastosistlerin yapışacağı pinopodlar olarak ortaya çıkmaktadır. Bir iki gün gibi kısa sürede olgunlaşan bu pinopodlar mikrovillusların uçlarında belirerek embriyo ile endometriyum arasındaki ilişkiyi gerçekleştirirler (Sharma and Kumar 2012). Çalışmamızda da desidual alan, epitel ve miyometriyumda belirgin L-selektin pozitifliği saptandı.

Fibronektin için yapılan çalışmalarda kollajen, fibrin gibi diğer moleküllere bağlanan bu ekstraselüler matriks proteini reseptörleri aracılığı ile adezyon ve migrasyonu yönlendirdiği bilinmektedir. Özellikle gastrulasyonda hücre göçü için önemli rol oynayan fibronektin trofoblastik invazyonun da önemli düzenleyicilerindedir. Desidual olgunlaşma ilerledikçe boyanma miktarı azalan fibronektinin, yedinci günde iyice azaldığı literatürde bildirilmektedir. Ekstraselüler matriks proteinlerinin desidual dokunun olgunlaşması sırasında yeniden yapılması implantasyon başarısının önemli anahtarlarından biridir (Kayışlı ve ark. 2000). Çalışmamızda da fibronektinin implantasyon gerçekleşen gruplarda (G3-2, G4-2) pozitivitesinin anlamlı şekilde arttığı bulundu.

Laminin ile ilgili çalışmalarda ekstraselüler matriks proteini olan laminin ve benzeri proteinler desidual oluşum sırasında endometriyal stromada değişik kompozisyonlar içerisinde gözüktür. İmplantasyon döneminde blastokist üzerinde bulunan tüm membranlarda var olması nedeniyle implantasyon penceresinde önemli olduğu düşünülmektedir (Kayışlı ve ark. 2000). Çalışmamızda uterus örneklerinde

yapılan indirekt immünohistokimyasal inceleme sonucunda Laminin immünoaktivitesi; çalışmamızda benzer bulgular özellikle de membranlar da olmak üzere pozitif alanların varlığı gösterildi.

İntrauterin adezyon, hasarlı endometriyumun yetersiz rejenerasyonu ile karakterize olan yaygın bir uterus kavitesi hastalığıdır. Son zamanlarda, iyileşme sürecini teşvik etmek için kök hücre nakli önerilmiştir. İnsan amniyotik mezenkimal kök hücreleriyle yapılan çalışmada; transplantasyon tedavisi için değerli bir kaynak olan insan amniyotik mezenkimal stromal hücrelerinin (hAMSC) kemirgen İUA modellerinde endometrial rejenerasyonu geliştirip geliştiremeyeceği araştırılmıştır. Uterus hornlarından birinde mekanik hasar oluşturularak gerçekleştirilen çalışmada insan amniyotik stromal kök hücreler transplante edilen grupta hasarlı gruplara göre fibröz alanlardaki azalma ve bez sayısındaki artışta istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir. Kök hücre grubunda antieflamatuvar sitokinlerin mRNA seviyelerinde de artış belirlenmiştir. Sonuç olarak insan amniyotik stromal kök hücrelerinin immünmodulator özellikleri ile hasarlı dokuda rejenerasyonu hızlandırdığı rapor edilmiştir (Gan ve ark. 2017). Tedai uygulamalarından 10 gün sonra uterus örnekleri alınarak endometriyum kalınlığı, stromadaki bez sayısı, infalamasyon ve fibrozis açısından sonuçları incelendi. Besiyeri ve niş uygulanan (G1-1, G2-1) gruplarımızda endometriyumun yoğun bir şekilde dejenere olduğu, sineşi alanlarının aşırı arttığı, bez sayısının KİM KH ve KİM KH+NİŞ göre anlamlı şekilde azaldığı ($p<0,001$) gözlemlenmiştir. Birinci ve ikinci grupların epitelinin ortadan kalktığı, lamina propriyasını ise yoğun fibröz alanların oluşturduğu izlenmiştir. Bezlerin hem sayısında düşüş hemde bez epitelinin tübüler yapısının bozulduğu görülmüştür (**Resim 6.3.1**). İnflamasyon açısından gruplar arasındaki istatistiksel (**Tablo 6.3.1**) olarak en çok anlamlılık BY ve KİM KH+NİŞ arasında ($***p<0,0001$), sonrasında NİŞ ile KİM KH+NİŞ ve BY ile KİM KH ($**p<0,001$) arasında olarak belirlenmiştir. NİŞ ile KİM KH arasında inflamasyon yönünden $*p<0,05$ olarak tespit edilmiştir. KİM KH ile KİM KH+NİŞ grupları arasında inflamasyon yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Asherman deneysel modellerinde epitel dokudaki yapışıklıklar sonucunda lamina propriyadaki fibroblastların aşırı kollajen sentezlemesi sonucu fibröz bir yapıya dönüştüğü bildirilmektedir (Gan ve ark. 2017). Çalışmamızda tedavi grupları arasında fibrozis

açısından farklılıklar olduğunu gözlemledik. Özellikle besiyeri (G1) ve niş (G2) gruplarında fibrozisin en fazla arttığı KİMKG (G3) grubunda biraz daha azaldığı ve KİMKG +NİŞ (G4) grubunda kontrol olarak tutulan sağ uterin hornların fibröz alanlarına yaklaştığı görülmüştür. Sonuç olarak gebelik oluşturmadığımız gruplardaki histokimyasal bulgularda; İnflamasyon, endometriyal kalınlık, fibrozis ve bez sayısı açısından ölçümler (**Tablo 6.3.3**) ve semikantitatif analizler sonucu alt birinci grupların ortalama ve standart sapma değerleri karşılaştırıldığında inflamasyon ve fibrozisin BY ve NİŞ gruplarında yükseldiği, diğer gruplarda sağ uterin horn değerlerine yaklaştığı görülürken, bez sayısı ve endometriyal kalınlığında yine BY ve NİŞ gruplarında azaldığı, tedavilerinde kök hücre içeren gruplarda (KİMKG ve KİMKG+NİŞ) ise yükseldiği saptanmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri üzerinden BY ile NİŞ arasında anlamlı fark bulunmazken, BY ve NİŞ ile KİMKG ve KİMKG+NİŞ grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiştir.

Rejenerasyon endometriyal onarımda oldukça önemlidir. Bunun için özellikle geçen on yılın oldukça dikkat çeken tedavi seçeneği olarak kök hücreli tedaviler düşünölmeye başlanmıştır. Farklı kaynaklardan kök hücreler izole edilerek birçok hastalığın üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır. Bu konuda kök hücreler çok umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Sistemik veya lokal uygulama seçenekleri denenerek en etkili yol belirlenmeye çalışılmaktadır. AS'yla ilgili kök hücreli tedavi çalışmaları çok kısıtlı olmakla birlikte deneysel modelin oluşturulması ve prelinik fazın tamamlanması açısından intrauterin adezyonlarda kullanımı yok denecek kadar azdır. Önemli bir infertilite ve genel yaşam aktivitesini olumsuz etkileyen sorunları beraberinde getiren sineşilerin giderilmesi için yeni tedavi yöntemleri üzerinde durulmaktadır.

Başlangıçta endometriyumun yenilenmesi için üç yöntem önerilmişti. Birincisi, doku mühendisliğinin endometriyal tamir için alternatif bir seçenek sağlamış olmasıdır. Uterusun eşsiz fiziksel özellikleri ve komplike hormonal ortamı nedeniyle, uterus rekonstrüksiyonuna yönelik raporlar nadir olmuştur (Lin ve ark. 2013; Kuramoto ve ark. 2015). İkincisi, skar oluşumunu önlemek için endometriyal epitelyal hücre infüzyonlarının epitel onarım teknikleri için kullanılmasıdır. Bununla birlikte, endometriyal epitelyal hücrelerin toplanması, bu hücrelerin son derece sınırlı

in vitro proliferasyon kapasitesi ve oldukça invaziv toplama prosedürleri nedeniyle basit bir işlem olmamasıdır (Song ve ark. 2015). Üçüncüsü, kök hücre tedavisi, hasarlı dokunun onarımı ve / veya yenilenmesi için büyük umut vaat etmesi olmuştur (Cervello ve ark. 2015). Çalışmamızda üçüncü tedavi önerisi olan kök hücreleri deneysel olarak oluşturulan gruplarımızda kullanarak hücreleri transplante ettiğimiz gruplarda infertilite açısından yeni çözüm yolları bulmayı amaçladık.

1900'lü yılların başlarında araştırmacılar farklı kan hücrelerinin hepsinin tek bir hücreden kökenlen aldığını fark etmişlerdir. 1958 yılında ilk in vitro fertilizasyon İVF tavşanlarda gerçekleştirilmiştir. Teratokarsinomaların embriyonik germ hücrelerinden köken aldığı ve embriyonal karsinoma hücrelerinin bir çeşit ana hücre kaynağı olduğu 1960 yılında farelerde gösterilmiştir. Kanada'lı araştırmacılar Ernest McCulloch ve James Till; Fare kemik iliği hücrelerinin nakilden sonra kendilerini yenileyebildiklerini kantitatif olarak tanımlamışlardır. 1968'de İlk insan yumurtası İVF olarak elde edilmiştir. 1978: İlk tüp bebek Louise Brown, İngiltere'de dünyaya gelmiştir. Blastosistlerin iç hücre kitlelerinden fare embriyonik kök hücreleri (EKH) elde etmişlerdir. İn vitro ortamda pluripotent fare EKH'lerini çoğaltmak için, gerekli kültür şartlarını tanımlamışlardır (Evans ve Kaufman 1981). Thomson ve ark. 1995'te Rhesus maymunlarından ve marmosetlerden primat EKH'leri elde etmişler ve in vitro olarak yerleştirilmiştir (Thomson ve ark. 1998). Böylece insan EKH'lerinin de in vitro ortamda çoğaltılmasının mümkün olabileceğine işaret edilmiştir. Wisconsin Üniversitesi'nden James Thomson ve ekibi, İVF laboratuvarında 36 embriyodan beş adet insan EKH serisi ürettiklerini rapor etmişlerdir (Thomson ve ark. 1998). Bu kök hücreler için milad sayılırdı çünkü sonrasında araştırmalar ve beraberinde tartışmalar hızla yayıldı. 2003 yılında Science Dergisi "Kök Hücreler" ile ilgili gelişmeleri en önemli 10 tıp olayı arasında göstermiştir. Peki neden kök hücreler bu kadar önemli, bu hücrelerle hastalıklar nasıl tedavi edilebilir? (Rejeneratif tıp yada Reparatif tıp); Vücudumuzdaki bütün hücrelerin ana kaynağı ve dokuların, organların ana yapı taşı olan KH'ler; sınırsız bölünebilme ve kendi kendilerini yenileyebilen; farklılaşmamış, ancak farklılaşmış hücrelere kaynaklık edebilen ve bu özelliğiyle hasarlı dokuyu tekrardan proliferate edip eski fonksiyonunu geri kazandırabilme özelliğine sahip olan hücrelerdir. 1960'lı yıllarda KİMKH'leri ile başlayan kök hücrenin hastalıklarda tedavi amaçlı

kullanılma umudu; bugün bilimsel, etik ve sosyal tartışmalar altında son hızla ilerlemektedir. KH'lerle tedavide veya son yıllarda tedavi seçenekleri arasında en çok umut veren hücrenel tedavide amaç; hasar görmüş veya fonksiyonunda sıkıntılar olan bir hücre/doku veya organın işlevini KH'leri kullanarak, tamir etmek veya yenilemektir. Bunu gerçekleştirebilmek için “zarar görmüş dokuya, hasarlı dokunun fonksiyonunu yerine getirmeye olanak sağlayacak sayı ve kalitede, izole edilerek saflaştırılmış olan hücrelerin transferi” gerekmektedir (Ates 2016). Kök hücre merkezli uygulama tedavi yöntemlerinin başarısı için, doku mühendisliği, moleküler biyoloji, genetik, embriyoloji, hücre biyolojisi ve klinik bilimlerin de bulunduğu multidisipliner bir yaklaşıma ihtiyaç vardır. Herhangi bir doku veya organ hasarında; o organın fonksiyonlarını yeniden eski haline getirmeye yetecek sayı ve kalitede hücreyle tedavi sağlanabilir. Hücreye dayalı ya da hücre tabanlı tedaviler; insanlardaki pek çok hastalık için böyle bir tedavi stratejisi olarak ortaya çıkmıştır. KH'ler, hücre tabanlı tedavilerin vazgeçilmezidir. Bizde bütün bu tarihsel gelişimi ve gelecek için umut veren gelişmelerinden dolayı kök hücreleri AS' tedavisi için öngördük. Deneysel aşaması denenmeden hücrenel tedavideki başarı görülemez ve klinik her zaman bir sonraki adım olarak kalır. Bu nedenle önemli bir infertilite sorun olan uterin adezyonların ortadan kaldırılması için cerrahi işlemlere alternatif ve tekrar nüks etmeyen bir tedavi unsuru belirlemeye çalıştık. Bulgularımız hipotezimizi fazlasıyla destekler nitelikteydi. Çünkü gerçek anlamda gruplar arasındaki gerek morfolojik gerekse istatistiksel veriler. KİMKH endometriyal hasarda yeterli sayıda uygulandığında iyi bir tedavi başarısı sağlanacağı ışığını yakmıştır. Benzer çalışmalarda da sonuçlar olumluydu. Dolayısıyla bilim dünyasına kök hücre araştırmaları açısından katkı sağlanmaya çalışıldı.

Kök hücrelerin kendini yenileyebilme, farklılaşabilme, çoğalabilme, doku ve organları oluşturabilme yeteneklerinden dolayı organ nakillerinde ve birçok hastalığın tedavisinde organ nakillerine veya olumsuz yan etkileri bulunan ilaçlara alternatif olarak kullanılma imkânı bulunmaktadır. Günümüzde tedavi amaçlı kullanılmak üzere, birçok kaynaktan kök hücre elde edilebilmekte ve üzerinde en çok çalışılan kaynaklar embriyonik kök hücreler, hematopoietik ve mezenkimal kök hücreleri içeren kemik iliğidir (Kollar ve ark. 2009).

AS'da klasik tedavilerle incelenmiş endometriyumun düzeltilmesi mümkün olmamakta ve MKH uygulaması ile başarı sağlanacağı düşünülmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada dişi sıçanlara kemik iliği stromal kök hücre 50.000 hücre/mikrolitre olacak şekilde introvenöz infüzyonu yapılmış ve üçüncü östruslarında uterusları alınarak histolojik olarak incelenmiştir. Kök hücre uygulaması sonrasında endometriyal kalınlığın arttığı, bez ve kapillerin çoğaldığı görülmüştür. Sitokeratin, integrin β -3 ve LIF ekspresyonlarının özellikle endometriyal epitel sitoplâzmasında, vimentinin ise endometriyal stromal hücrelerde sitoplâzma pozitif olduğu görülmüştür. Kök hücre uygulaması ile daha güçlü bir boyanmanın olduğu saptanmıştır. İntrovenöz yolla verilen 10^7 kök hücrenin erkek donörlerden alınması yoluyla alıcı uterusu Y kromozomunun gösterilmesi mümkün olmuştur. Ayrıca Bromodeoxyuridine (BrdU) boyaması ile hücrelerin üçüncü siklusa orada oldukları özellikle de damar çevresinde yerleştikleri saptanmıştır. Kök hücre uygulamasından sonra TNF-alfa, IL-1 ve IL-6 mRNA'larında da önemli bir azalma bulunarak kök hücrenin etkisini inflamatuvar sitokinler üzerinden gösterdiği ortaya konmuştur (Jing ve ark. 2014).

İnsan endometriyum yaklaşık 400 siklus gösteren oldukça rejeneratif bir doku olup her siklusa yaklaşık 4-10 mm kalınlaşmaktadır. Normalde endometriyumun fonksiyonel tabakasındaki mitotik hücreler bu rejenerasyonun gerçekleşmesini sağlar. Buradaki kök hücrelerin eksikliği veya bozukluğu yeterli bir endometriyum kalınlaşmasını sağlayamadığından implantasyonu engeller. Erişkin kök hücrelerin insan endometriyumunda olduğunun ilk kanıtı, epitelden izole edilen hücrelerde EpCAM+ ve stromal hücrelerde EpCAM- olarak %1'den daha az olacak şekilde klonlanmasıdır. Bunlar otuz yakın bölünme gösterirken matrijel içerisinde büyük bez benzeri yapılar oluşturmuş ve birçok farklı hücreye farklılaşmışlardır. Özellikle stromal olanların MKH benzeri hücre oldukları düşünülmüştür. Kenar popülasyonu denilen bir grup hücre de vital DNA bağlama boyası Hoechst 33342 ile boyanarak ayrıştırılmış ve bunların menstrual ve proliferatif fazda en çok oldukları bulunmuştur. Bu hücreler normal stromal kök hücrelere oranla çok daha hızlı çoğalmakta ve bazal tabakada özellikle de kan damarlarının etrafında görülmektedirler. Bu hücrelerin kültür ortamında endometriyal dokuları yaptıkları in vivo şartlarda ise rejenerasyonu sağlayarak implantasyon başarısını artırdıkları

gösterilmiştir. MKH'lar adet kanında da saptanmış olup endometriyal olanlara çok benzemekte MHCII molekülü içermedikleri için de çok az immunojenik olmaktadır. Kemik iliği kökenli kök hücreler endometriyumda çok az miktarda bulunmakta ancak burada bütün hücrelere dönüşebilmektedir. Transplante edildiklerinde çok daha başarılı bir şekilde bu hücrelerin desidualize olmuş endometriyal fibroblastlara dönüştükleri gösterilmiştir. Dolaşan endotelyal progenitör hücrelerin de uterusu bulduğu ve %10 civarında endometriyal damarlanmaya katkı sağladığı düşünülmektedir. Endometriyumun kendi kök hücreleri veya progenitörleri endometriyumda olabilecek rejenerasyon açısından en kapasiteli hücrelerdir. CD146 ve PDGF reseptör beta ile ayrıştırılan bu hücrelerin MKH gibi davrandığı gösterilmiştir. Oldukça etkin çoğalan bu hücrelerin hücre sel tedaviler için kullanılabilmesi düşünülmüştür (Gargett ve Ye 2012). Bununla beraber birçok çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulamasının hasarlı fare uterusunda GFP+ (yeşil floresan proteini) hücreler olarak stromal ve epitelyal bölümlerde 1. ay sonu itibarıyla görülmüştür. Bu hücrelerin inflamasyonu engelleyip damarlanmayı artırarak etkili olduğu gösterilmiştir. Kök hücrenin transplantasyon sonrası epitelyal, stromal ve endotelyal hücrelere farklılandıkları insan endometriyumlarında da gösterilmiştir (Gil-Sanchis ve ark. 2015). Sonuç olarak yapacağımız çalışmamızda da öngörüldüğü üzere kök hücre uygulamaları diğer birçok hastalıkta olduğu gibi önemli bir infertilite sebebi olan Asherman sendromunda ortaya çıkan ve implantasyon başarısızlığı ile sonuçlanan intrauterin adezyonlar için giderek artan bir şekilde kullanılacak hücre davranışının anlaşılması klinikteki etki için en önemli faktör olacaktır.

Kardiyovasküler hastalılarla ilgili yapılan kök hücre çalışmalarında Akut miyokard enfarktüsü geçiren 69 hastaya koroner damar yoluyla otolog kemik iliği MKH'si verilmiş ve ventrikül işlevlerini artırdığını göstermişlerdir (Chen ve ark. 2004). 2011 yılında kronik iskemik kalp hastalığı olan sekiz hastaya miyokard içine otolog KİMKH verilmiş, bölgesel olarak kasılabilirliğinin arttığını ve diyastol/sistol sonu hacimlerin küçüldüğünü gözlemlemişlerdir (Williams ve ark. 2011). 2015 yılında yapılan randomize çift-kör ve plasebo-kontrollü bir çalışmada, iskemik kalp yetmezliği olan 30 ila 80 yaş aralığında bulunan 37 hastaya miyokard içine otolog KİMKH, 18 hastaya ise plasebo verilmiştir. Birinci son nokta altı aylık takipte sol

ventrikül sistol sonu hacmi değişikliğinin MRG ve bilgisayarlı tomografi ile ölçülerek belirlenmiştir. Altıncı ayda MKH'li grupta değeri azalırken, plasebo grubunda artmıştır (Mathiasen ve ark. 2015). Kronik total oklüzyonu üzerine 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada; 15 hastaya rastgele göbek kordonundan elde edilmiş MKH'leri nakletmişler ve hastaların enfarktüs alanlarında belirgin bir azalma saptarken, sol ventriküldeki ejeksiyon fraksiyonunun belirgin bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir (Li ve ark 2015).

Koroner arterlerin tıkanması sonucu miyokard enfarktüsü sonucu kalp kasının zedelenmesi bölgesel kalp işlevlerinde önemli kayıplara yol açmaktadır. Hücresel tedavilerle bu hasarın giderilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla hasarlı miyokarda MKH aktarılması, kalp hastalıkları için kalp nakli dışında tedavi seçeneği olmayan hastalar için umut verici görülmektedir. By-pass cerrahisi ve reperfüzyon tedavisi bu hastalıklar için sınırlı tedavi seçenekleri olmalarına rağmen ölüm riskini de arttırmaktadır. MKH tedavisi ile hasarlı kalp dokusuna göç etmeleri sağlanacak bu hücrelerle doku yenilenmesine bağlı olarak iyileşmenin mümkün olabileceği gösterilmiştir. Kök hücresel tedavinin en büyük getirisi ve sık tercih edilmesinin sebebi, cerrahi bir işlem gerektirmemesidir (Ke ve ark. 2011; Lai ve ark. 2011).

Nörolojik hastalıklarda, MKH'ler özellikle omurilik yaralanmaları, MS, Parkinson ve amiyotrofik lateral skleroz gibi hastalıkların tedavisinde ilgi çekici olmuştur (Ucelli ve ark. 2011). Mezenkimal kök hücreler bu hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olup, uzun dönem sonuçları beklenmektedir. 2014 yılında yapılan randomize, plasebo kontrollü faz II çalışmasında dokuz MS hastasına kilogram başına $1-2 \times 10^6$ olacak şekilde MKH damar içi yolla verilmiştir. Hastalarda daha düşük proinflatuvar T hücre profili, IFN-c oranında azalma gibi tutarlı immünolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Sonuç olarak hastalara verilen MKH'ler immünmodülatör özellikleri ile inflamatuvar parametrelerin düşürülmesini sağlamıştır (Llufriu ve ark. 2014).

Omurilik yaralanması üzerine, yapılan çalışmada 10 hastaya intramedüller olarak MKH vererek uzun dönem sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Hastalardan MKH'ler kemik iliğinden izole edilmiş, dört hafta boyunca kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Hastalara 8×10^6 MKH doğrudan omuriliğe, 4×10^7 MKH ise intradural boşluğa enjekte edilmiş olup dört ve sekiz hafta sonra her bir hastaya ilave olarak

5×10^7 hücre daha enjekte edilmiştir. Sonuçları değerlendirmek için MRG ve elektrofizyolojik kayıtları alınmış, altı aylık takipte 10 hastanın altısında üst ekstremitenin motor gücü iyileşme göstermiş, üçünün günlük yaşam aktiviteleri artarak iyileşmiş ve MRG’lerde boşluk boyutunun azalması gibi değişimler gözlemlenmiştir (Park ve ark. 2012). Omurilik yaralanmalarında etkin rejeneratif tedavilerin yakın bir gelecekte mümkün olabileceği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (Assunção-Silva ve ark. 2015).

Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada ALS olan 26 hastaya nörotrofik faktör (NTF) salgılayan MKH’leri tek doz olarak nakletmişlerdir. Hastaların %87’sinde ALS fonksiyonel derecelendirme skorunda düşüş, tedaviden altı ay sonra hastalarda en az %25 iyileşme gözlemlenmiş olan bu çalışmayla ALS hastalarında NTF salgılayan MKH tedavisi ile klinik yarar sağlanabileceği sonucuna varılmıştır (Petrou ve ark. 2016).

İskelet sistemi ile ilgili olan gelişimsel anomaliler, kemik enfeksiyonları, travma, osteoartrit ve osteoporoz gibi dejeneratif hastalıklar ve tümörlerde MKH kullanılması yönünde çalışmalar planlanmaktadır. Kırık ve kemik onarımı gerekecek hasarlarda, travma ve yaşlılık sonucu ortaya çıkan osteoartritte mezenkimal kök hücrelerin kullanılması daha uygun görülmektedir. En başarılı sonuçlar osteogenesis imperfektalı hastalarda elde edilmiş; hastaların boylarında uzama, kırıklarda azalma ve motor fonksiyonlarda düzelmeler bildirilmiştir. Ancak bu amaçla tedavi edilen hasta sayısı oldukça azdır (Chanda 2010). Başka bir çalışmada MKH’ler menisküs tedavisinde de önemli bir alternatif olarak gösterilmiştir. Tedavi uygulamaları kırık doku hücreleri üzerinde yoğunlaşırken, kemik ve kas dokusuna yönelik MKH uygulamaları için deneysel düzeyde birçok araştırma sürmektedir (Kömürcü ve Özkan 2006). İmmünesupresif ve immünmodulator etkileri nedeniyle MKH’ler otoimmün hastalık tedavisinde umut vericidir. Bu konuda deneysel araştırmalar olmakla beraber klinik uygulama deneyimi günümüzde son derece kısıtlıdır (Ben-Ami 2011). Ancak bu hücrelerin kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Tip 1 diyabet tedavisinde kullanılan ilk hücresel tedavi “Edmonton yöntemi” olarak bilinen ve donörün pankreas dokusundan çeşitli enzimatik işlemler sonrasında elde edilen hücrelerin, çeşitli kemoterapötiklerle immün sistemi baskılanmış olan alıcıya nakledilmesiyle 1999 yılında uygulanmıştır (Scully 2012). Günümüzde halen

diyabet tedavisine yönelik MKH nakli çalışmaları deneysel aşamadır ve çeşitli kök hücre tiplerinde yapılan araştırmalara göre CD34+ kemik iliği ve kordon kanı kök hücreleri, diğer kaynaklardan elde edilen mezenkimal hücrelere oranla daha iyi sonuçlar vermiştir (El- Badri ve Ghoneim 2012). Yapılan ilk uygulamalar çok verimli bir sonuç göstermemiştir. Her ne kadar yöntem geliştirilmiş olsa da donör sayısındaki azlık, elde edilen hücre sayısında yetersizlik ve alıcının uzun süre boyunca immün sisteminin baskılanması, söz konusu yöntemin kullanılabilirliğini azaltmaktadır.

Graft versus host hastalığı, kemik iliği nakillerinde donörden alınıp hastaya kök hücrelerle birlikte verilen sağlıklı T-lenfositlerin aracılık ettiği şiddetli immünolojik reaksiyon sonucu organ fonksiyon bozukluğu ile giden kompleks bir klinik sendrom olup allojenik kök hücre naklinden sonra en önemli mortalite ve morbidite nedeni olarak kabul edilir. Mezenkimal kök hücreler son zamanlarda immünmodülatör etkileri ve immün yanıtı düzenlemeleri nedeniyle graft versus host hastalığının tedavisinde alternatif bir yaklaşım olarak kullanılmaya başlanılmışlardır (Vianello 2008).

Karaciğer sirozu ve hepatit hastalığı için MKH'ler umut kaynağı olmuştur. Bu alanda yapılan faz I çalışmasında dekompanse karaciğer siroz hastalığı bulunan dört hastaya periferik damar yoluyla otolog MKH ($31,73 \times 10^6$) vermişlerdir. Değerlendirirken birincil olarak yapılan işlemin güvenliği ve fizibilitesi, ikincil olarak ise son dönem karaciğer hastalığı skoru ve hastaların yaşam kalitesi göz önünde bulundurulmuş, hastalarda takip sürecinde herhangi bir yan etki gözlemlenmemiştir. Son dönem karaciğer hastalığı skoru 1'den itibaren 3-4 puan artarak iyileşme göstermiştir (Mohamadnejad ve ark. 2007). Yine progresif ve destrüktif seyir gösteren kronik inflamatuvar bir gastrointestinal sistem hastalığı olan Crohn hastalığında oluşan fistül onarımında MKH uygulamasıyla ilgili faz I ve faz II klinik çalışmaları yürütülmektedir. Faz I çalışmalarında, MKH'ye spesifik ekspresyonları gösterilmiş ve büyüme hızları çalışılmış otolog adipoz doku kaynaklı MKH uygulayarak güvenilirliği ve uygulanabilirliği çalışılmıştır. Kültüre edilen hücrelerin üçüncü pasajında verilen MKH'lerin etkisi dört hastanın sekiz adet fistülünde sekiz hafta boyunca haftada bir kontrol edilerek fistüllerinin altısında

sekizinci haftanın sonuna doğru dışı bakan kısımlarının epitelizasyonu ile kapandığı, diğer iki fistülün ise kısmen düzeldiği görülmüştür (Garcia-Olmo ve ark 2009).

Endometriyumun uyarılmasını, çoğalmasını, oksidatif stres faktörlerine karşı antioksidan tepkisini, büyüme faktörlerinin ekspresyonunu göstermek için; PCNA, eNOS, TGF- β ve VEGF antikorlarıyla sıçan uterus dokularında proliferasyon belirteçleri olarak analiz ettik ve kök hücre gruplarında endometriyal dokuda belirgin bir proliferasyon olduğunu saptadık.

Bu veriler, hücre terapisinin şiddetli AS hastalar için umut verici bir araç olduğunu gösterir. Bununla birlikte dezavantajları da mevcuttur. Kemik iliği yada yağ dokusundan elde edilme şekline göre enfeksiyon gelişebileceği gibi ağrıları da şiddetlendirebilir. Bu nedenle hücre elde edilme yöntemi de önemlidir. Yöntem seçerken hasta durumu mutlaka göz önünde bulundurulmalı ve enfeksiyona sebebiyet verecek şartlar ortadan kaldırılmalıdır. Deneysel aşamada nitekim bu problemlerin bir kısmı yaşandı. Hücre elde edilmesinde değil fakat Asherman modeli oluşturulduktan sonra bazı hayvanlarda enfeksiyon gelişti ve bir kısmı enfeksiyon sebebiyle öldü.

İmmünohistokimyasal bulgularımızla tutarlı olarak, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin de endometriyal proliferasyonun desteklenmesinde östrojen kadar etkili olduğunu bulduk. Özellikle fibrozisin giderilmesi ve proliferasyonun artırılmasında oldukça etkili olduklarını gözlemledik. Çalışmamızın özgünlüğünü, intrauterin sineşi için yeni deney modellerinin oluşturulması ve bu modelleri geliştirecek yeni bulgular ortaya koyması ve kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin, herhangi bir cerrahi adezyonlara sebep olmadan endometrial dokunun rejenerasyonu üzerindeki restoratif etkilerinin oldukça fazla olmasıdır.

Biz biliyoruz ki, cerrahi operasyonlar sadece kavite içindeki adezyonları bölmeye hizmet eder, ancak endometriyal rejenerasyon ve adezyon nüksü hakkında çok az şey yapabilir. Yani Asherman sendromlu kadınlar optimal klinik sonuçlar sağlamak için birden fazla yaklaşım gerektirir. Kök hücreler hala araştırma aşamasında olmasına rağmen, bu alandaki yeni ilerleyen keşifler her gün yeni terapötik stratejilere yol açmaktadır. Bu çalışmadaki bulguların üreme tıbbında kök hücre uygulamalarına ışık tutacağını umuyoruz.

8. SONUÇLAR

Endometriyal adezyon oluşturmak için kimyasal ajanla Asherman modeli oluşturulan ve oluşan adezyonların ortadan kaldırılması, özellikle akut dönemde yapılacak tedavinin etkilerini ortaya koymak için gerçekleştirilecek doğru tedavi seçeneğini belirlemek adına çalışmamızı gerçekleştirdik. Endometriyal hasarlarda KİMKGH'lerin tedavi edici özelliklerinin araştırıldığı çalışma sonuçlarında; endometriyal kalınlığın, bez sayısının ve vaskülarizasyonun artması, fibröz alanların azalması, adeziv alanlarda da embryoların implante olması ve yeni doğan sayının artmış olması deneysel Asherman çalışmalarının kliniğe taşınabilmesi açısından ümit vericidir. Asherman modeli gerçekleştirilen sıçanlarda gebelik öncesi ve implantasyon süreçlerinde rol oynayan TGF- β 1, PCNA, Laminin, Fibronektin ve L-selektin gibi moleküllerin, KİMKGH uygulaması ile meydana gelen endometriyumdaki dağılımları ortaya konuldu. KİMKGH ve Niş uygulamalarının, infertiliteye neden olan mekanizmaların içerisinde yer alan adezyon molekülleri üzerinden tedavi ile kliniğe katkı sağlayabileceği gösterildi.

9. KAYNAKLAR

Abbott J, Thomson A, Vancaillie T. SprayGel following surgery for Asherman's syndrome may improve pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol.* 2004;24(6):710–1.

Aplin JD, Meseguer M, Simón C, Ortíz ME, Croxatto H, Jones CJ. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29: 153–156.

Asherman JA. Amenorrhea traumatica (atretica). *J Obstet Gynaecol Br Emp* 1948;55:22-30.

Assunção-Silva RC, Gomes ED, Sousa N, Silva NA, Salgado AJ. Hydrogels and Cell Based Therapies in Spinal Cord Injury Regeneration. *Stem Cells Int.* 2015; 2015:948040. doi: 10.1155/2015/948040.

Aksin M. İkinci trimester tarama testi sonrasında amniyon sıvısı ve maternal kanda oksidatif stres değerlendirmesi. Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2012, Şanlıurfa (Danışman: Doç. Dr. Mehmet VURAL).

Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2008;19(1): 55-63.

Alawadhi F, Du H, Cakmak H, Taylor HS. Bone marrow- derived stem cell (BMDSC) transplantation improves fertility in murine model of Asherman's syndrome. *PLoS One.* 2014;12:9(5):e96662.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357(Pt 3):593-615.

Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem. Cells and Dev.* 2004;13(4):436-448.

Ates U. Kök Hücreyi Tanıyalım. FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi. 2016;1(1):19-28. doi: 10.5606.

Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. Trends Mol Med. 2009;15:59-68.

Amer MI, Abd-El-Maeboud KH. Amnion graft following hysteroscopic lysis of intrauterine adhesions. J Obstet Gynaecol Res. 2006;32: 559–66.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014:360438.

Aydın M, Selçoki Y, Nazlı Y, et al. Relationship between total antioxidant capacity and the severity of coronary artery Disease. J Clin Exp Invest. 2012;3:22-28.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. Circulation. 2003;108(7):863–8.

Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases, Autoimmunity Rev. 2011; 10: 410-5.

Bender L M, Morgan M J, Thomas L R, Liu Z G, Thorburn A. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. Cell Death and Differentiation. 2005;12:473–481.

Bentin-Ley U, Sjögren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod.* 1999; 14: 515-520.

Birkenfeld A, Mor-Joseph S, Schenker JG, Navot D, Levij I, Okon E. Regeneration of the normal and pseudopregnant rabbit endometrium after neodymium YAG laser photocoagulation. *J Gynecol Surg.* 1991;7:167–73.

Bratincsák A, Brownstein MJ, Cassiani-Ingoni R, Pastorino S, Szalayova I, Tóth ZE, et al. CD45-positive blood cells give rise to uterine epithelial cells in mice. *Stem Cells.* 2007;25(11):2820–6.

Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: A multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia, *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;7(2):4.

Bulgurcuoğlu S, Özsaıt B, Attar E. Büyüme faktörlerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerindeki etkisi. *Artemis* 2003;4(1):18-26.

Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis.* 2013;34(3):503-12.

Caligioni C. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. *Curr Protoc Neurosci.* 2009; 41: 1-11.

Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature.* 1996;380:64-6.

Carson DD, Tang JP, Julian J. Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Dev Biol.* 1993; 155: 97-106.

Can A. Kök Hücre: biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. *Akademisyen Tıp Kitabevleri*, Ankara, 2014, s:201-311.

Campisi J, Leem TH, Fleshner M. Acute stress decreases inflammation at the site of infection: A role for nitric oxide. *Physiol Behav.* 2002;77:291-299.

Cervello I, Gil-Sanchis C, Mas A, Faus A, Sanz J, Moscardó F, Higuera G, Sanz MA, Pellicer A, Simón C. Bone marrow-derived cells from male donors do not contribute to the endometrial side population of the recipient. *PLoS One.* 2012;7(1):e30260. doi: 10.1371/journal.pone.0030260.

Cervelló I, Gil-Sanchis C, Santamaría X, Cabanillas S, Díaz A, Faus A, Pellicer A, Simón C. Human CD133(+) bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertil Steril.* 2015. pii: S0015-0282(15)01878-6.

Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol.* 1996; 16: 107-122.

Chanda D, Kumar S, Ponnazhagan S. Therapeutic Potential of Adult Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Diseases of the Skeleton. *J Cell Biochem.* 2010; 111:249-57.

Chervenak JL, Illsley NP. Episialin acts as an antiadhesive factor in an in vitro model of human endometrial-blastocyst attachment. *Biol Reprod.* 2000;63: 294-300.

Chen XM, Levine SA, Splinter PI, Tietz PS, Ganong AL, Jobin C, Gores GJ, Paya CV, La Russo NF. Cryptosporidium parvum activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology.* 2001;120: 1774-1783.

Chen Y, Chang Y, Yao S. Role of angiogenesis in endometrial repair of patients with severe intrauterine adhesion. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6:1343–1350.

Chen CP, Liu SH, Lee MY, Chen YY. Heparan sulfate proteoglycans in the basement membranes of the human placenta and decidua. *Placenta.* 2008;29(4):309-16. doi: 10.1016/j.placenta. 2008.01.002.

Chen F, Duan H, Zhang Y, Wu YH. Effect and mechanism of formation of intrauterine adhesion at different dose of estrogen. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2010;45:917–20.

Colter CD, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Cell Biol.* 2001;98(14):7841-7845.

Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 1999;181(1): 67-73.

Conway A, Schaffer DV. Biophysical regulation of stem cell behavior within the niche. *Stem Cell Res Ther.* 2012; 3(6):50. doi: 10.1186/scrt141.

Cumhur M. Temel Anatomi. İçinde: Kadın Genital Organları. 1. Baskı. ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş., Ankara; 2001: s.281-287.

Cunningham GF, Gant FN, Leveno JK, Gilstrap CL, Hauth CJ, Wenstram DK. *Williams Obstetrics.* 21. st ed. North America: Medical Publishing Division, McGraw-Hill Companies; 2001.p.39-83.

Curley GF, Hayes M, Ansari B, Shaw G, Ryan A, et al (2012) Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat. *Thorax.* 2012;67:496–501.

Dai D, Wolf DM, Litman ES, White MJ, Leslie KK. Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: down-regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors. *Cancer Res.* 2002;62, 881-886.

Das C, Kumar VS, Gupta S, Kumar S. Network of Cytokines, Integrins and Hormones in Human Trophoblast Cells. *Journal of Reproductive Immunology.* 2002; 53 (1-2): 257-268.

Dawson VL. Nitric oxide: role neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol (Australia)* 1995;22(4):305-8.

Dayan Y B, Kaveri S V, Kazatchkine M D, Shoenfeld Y. Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies?. *Medical Hypotheses.* 2000;55(2):103–108.

Deans R, Abbott J. Review of intrauterine adhesions. *J.Minim inv.surg.* 2010;17(5): 555-569.

Deliloglu-Gurhan I, Tuglu I, Vatansever HS, Ozdal-Kurt F, Ekren H, Taylan M, Sen BH. The effect of osteogenic medium on the adhesion of rat bone marrow stromal cell to the hydroxyapatite. *Saudi Med J.* 2006; 27(3):305-11.

Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews.* 2004; 25: 341–373.

Diefenderfer DL, Osyczka AM, Reilly GC, Leboy PS. 2003. BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect. Tiss. Res.* 2003; 44: 305-311.

Dilsiz YÖ. Deneysel Sıçan Endometriyozis Modelinde İmplantasyon Kusurunun Histolojik Olarak Değerlendirilmesi. E.Ü. Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2008, İzmir (Danışman: Prof. Dr. Mine ERTEM YURTSEVEN).

Dixon D, Alison R, Bach U Colman K, Foley GL, Harleman JH, Haworth R, Herbert R, Heuser A, Long G, Mirsky M, Regan K, Van Esch E, Westwood FR, Vidal J, Yoshida M. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *J Toxicol Pathol.* 2014;27(3-4 Suppl):1S-107S.

Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. Bone marrow mesenchymal stem cells:biological properties and clinical application. *J. Biol. Reg.* 2001;15:28-37.

Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells.* 2007;25(8):2082–6.

Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferré F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999 Mar;83(1):85-100.

Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Pourmorad F. Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(32):5212-5217.

El-Badri N, Ghoneim MA. Mesenchymal stem cell therapy in diabetes mellitus: progress and challenges. *J Nucleic Acids.* 2013;2013:194858.

Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi.* 2003;4:165-174.

Erdoğan D, Hatiboğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. Özel histoloji. Hatiboğlu Yayınları. Ankara; 1996: 120-4.

Eroschenko VP. diFiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişlileriyle. 10.baskı, Palme Yayınevi, Ankara; 2008.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. *Nature*, 1981, 29:154-6.

Farini A, Sitzia C, Erratico S, Meregalli M, Torrente Y. Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases. *Stem Cells Int*. 2014;2014:306573.

Fidancı ŞB ve Gümüş LT. Nitrik oksit ölçüm yöntemleri. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Dergi*. 2011; 4(3):1-8.

Friedler S, Margalioth EJ, Kafka I, Yaffe H. Incidence of post-abortion intra-uterine adhesions evaluated by hysteroscopya prospective study. *Hum Reprod*. 1993;8:442-4.

Fukuda MN, Sugihara K. Cell adhesion molecules in human embryo implantation. *Acta Physiologica Sinica*. 2012;64(3): 247-258.

Galle PR. Apoptosis in liver disease. *Journal of Hepatology*. 1997;27:405-412.

Gan L, Duan H, Xu Q, Tang YQ, Li JJ, Sun FQ, Wang S. Human amniotic mesenchymal stromal cell transplantation improves endometrial regeneration in rodent models of intrauterine adhesions. *Cytotherapy*. 2017; 19: 603-616.

Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adiposederived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum*. 2009;52:79-86.

Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(11):818-34.

Gargett CE, Healy DL. Generating receptive endometrium in Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci*. 2011;4:49-52.

Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod.* 2016;22:137–63.

Gargett CE, Ye L. Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertil Steril.* 2012;98(1):11-20. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.004.

Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology.* 3rd edition. Baltimore: W.B. Saunders Company, 2007, p.463-489.

Gan L, Duan H, Xu Q, Tang YQ, Li JJ, Sun FQ, Wang S. Human amniotic mesenchymal stromal cell transplantation improves endometrial regeneration in rodent models of intrauterine adhesions. *Cytotherapy.* 2017;19(5):603-616.

Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal–fetal interface. *Science.* 2003;299,405–408.

Gil-Sanchis C, Cervelló I, Khurana S, Faus A, Verfaillie C, Simón C. Contribution of different bone marrow-derived cell types in endometrial regeneration using an irradiated murine model. *Fertil Steril.* 2015; 103(6):1596-605.e1.

Giray SG. İmplantasyonda adezyon moleküllerinin rolü. Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2001, Manisa (Danışman: Doç. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN).

Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp. Cell. Res.* 2005;306(2):330-335.

Goldenberg M, Sivan E, Sharabi Z, Mashiach S, Lipitz S, Seidman DS. Reproductive outcome following hysteroscopic management of intrauterine septum and adhesions, *Hum Reprod.* 1995; 10: 2663- 5.

Gövsa F. Sistematik Anatomi. Güven Kitapevi; İzmir, 2003.

Gürpınar T, Ekerbiçer N, Uysal N, Barut T, Tarakçı F, Tuğlu MI. The effects of the melatonin treatment on the oxidative stress and apoptosis in diabetic eye and brain. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:498489.

Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation. *Reprod Biomed Online*. 2007;15(6):728-39.

Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C. Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2004;29(3):237-242.

Haouzi D, Dechaud H, Assou S, Monzo C, de Vos J, Hamamah S. Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophoctoderm and endometrial cells during the implantation period. *Human Reproduction*. 2011;26(6):1440–1449.

Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem*. 1991; 266(34):22789-91.

Hey NA, Aplin JD. Sialyl-Lewis x and Sialyl-Lewis a are associated with MUC1 in human endometriyum. *Glycoconj J*. 1996;13, 769–779.

Hu J, Zeng B, Jiang X, Hu L, Meng Y, Zhu Y, Mao M. The expression of marker for endometrial stem cell and fibrosis was increased in intrauterine adhesious. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(2):1525-34.

Hu SL, Luo HS, Li JT, Xia YZ, Li L, Zhang LJ, Meng H, Cui GY, Chen Z, Wu N, Lin JK, Zhu G, Feng H. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury

after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Crit Care Med*, 2010, 38:2181-2189.

Hu J, Yuan R. Decreased expression of c-kit and telomerase in a rat model of chronic endometrial ischemia. *Med Sci Monit*. 2011;17(4):BR103-9.

Hwang SJ, Cho TH, Kim IS. In Vivo Gene Activity of Human Mesenchymal Stem Cells After Scaffold-Mediated Local Transplantation. *Tissue Eng Part A*. 2014;PubMed PMID: 24575828.

Jessmon P, Leach RE, Armant DR. Diverse Functions of HBEGF During Pregnancy, *Mol Reprod Dev*. 2009;76(12):1116-27.

Jiang W, Ma A, Wang T, Han K, Liu Y, Zhang Y, Dong A, Du Y, Huang X, Wang J, Lei X, Zheng X. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study. *Pflugers Arch*, 2006, 453:43-52.

Jing Z, Qiong Z, Yonggang W, Yanping L. Rat bone marrow mesenchymal stem cells improve regeneration of thin endometrium in rat. *Fertil Steril*. 2014; 101(2):587-94.

Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*. Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S. *Temel Histoloji*. Nobel Tıp Kitapevi. İstanbul; 2006, p:450-457.

Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T, Kaneko S, Akaike A, Honda Y, Minami M, Satoh M. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Research*. 1999;815:11-20.

Kaneko Y, Day ML, Murphy CR. Integrin beta3 in rat blastocysts and epithelial cells is essential for implantation in vitro: studies with Ishikawa cells and small interfering RNA transfection. *Human Reproduction*. 2011;26(7):1665–1674.

Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* 2009;132:533-46.

Karaoz E, Okcu A, Unal ZS, Subasi C, Saglam O, Duruksu G. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells efficiently differentiate into insulin-producing cells in pancreatic islet microenvironment both in vitro and in vivo. *Cytotherapy.* 2013;15(5):557-70. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.01.005.

Kayışlı ÜA, Asar M, Demir R. Ratlarda desidualizasyon süresince ekstrasellüler matriksin yeniden modellenmesinde laminin ve fibronektin ile reseptör altbirimleri integrin $\beta 4$ ve $\alpha 5$ 'in dağılımları ve muhtemel rolleri. *Turk J Biol* 2000; 24:379-395.

Ke Y, Xiang P, Zhang C, ve ark. Magnetic Resonance Evaluation of Transplanted Mesenchymal Stem Cells After Myocardial Infarction in Swine, *Can J Cardiol.* 2011; 27:818-25.

Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:181643. doi: 10.1155/2015/181643.

Kerr JFR, Wyllie Ah, Currie AE. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Be J Cancer.* 1972; 26: 239-257.

Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş.* Çeviren: Ramazan Demir. Palme Yayıncılık, Ankara; 2006, s.578-581.

Kimber SJ. Molecular Interactions at the Maternal-Embryonic Interface During the Early Phase of Implantation. *Semin Reprod Med.* 2000;18(3):237-253.

Kilic S, Yuksel B, Pinarli F, Albayrak A, Boztok B, Delibasi T. Effect of stem cell application on Asherman syndrome, an experimental rat model. *J Assist Reprod Genet.* 2014; 31(8): 975–982. doi: 10.1007/s10815-014-0268-2.

Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2002;33:110-118.

Krause DS, Scadden DT, Preffer FI. The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(1):7-20. doi:10.1002/cyto.b.21066.

Kodaman PH, Arici A. Intrauterine adhesions and fertility outcome. How to optimize success? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007;19:207-14.

Kodaman PH, Taylor HS. Hormonal regulation of implantation, *Obstet Gynecol Clin.* 2004;31(4):745-66.

Kollar K, Cook MM, Atkinson K, Brooke G. Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction. *Int J Cell Biol.* 2009:904682.

Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin Chim Acta.* 2006; 364: 61-66.

Kuramoto G, Takagi S, Ishitani K, Shimizu T, Okano T, Matsui H. Preventive effect of oral mucosal epithelial cell sheets on intrauterine adhesions. *Hum Reprod.* 2015;30:406–16.

Kömürcü M, Özkan H. Mezenkimal Kök Hücre Ve Ortopedide Kullanımı, *TOTBİD Dergisi.* 2006; 5, 130-9.

Lai TH, Shih Ie M, Vlahos N, Ho CL, Wallach E, Zhao Y. Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2005; 83 (Suppl 1), 1297–1302.

Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med*. 2011; 6: 481-92.

Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91, 8263-8267.

Lee KY, DeMayo FJ. Focus on Implantation Animal models of implantation. *Reproduction*. 2004;128 679–695.

Leppänen T, Korhonen R, Laavola M, Nieminen R, Tuominen RK, Moilanen E. Down-regulation of protein kinase C δ inhibits inducible nitric oxide synthase expression through IRF1. *PLoS One*. 2013;8(1):e52741.

Li X, Hu YD, Guo Y, Chen Y, Guo DX, Zhou HL, et al. Safety and efficacy of intracoronary human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell treatment for very old patients with coronary chronic total occlusion. *Curr Pharm Des* 2015;21:1426-32.

Lin X, Wei M, Li TC, Huang Q, Huang D, Zhou F, et al. A comparison of intrauterine balloon, intrauterine contraceptive device and hyaluronic acid gel in the prevention of adhesion reformation following hysteroscopic surgery for Asherman syndrome: a cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;S0301-2115(13): 00325–4.

Liu F, Zhu ZJ, Li P, He YL. Creation of a female rabbit model for intrauterine adhesions using mechanical and infectious injury. *J Surg Res*. 2013;183:296–303.

Liu J, Wang Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:294303. doi: 10.1155/2015/294303.

Llufriu S, Sepúlveda M, Blanco Y, Marín P, Moreno B, Berenguer J, et al. Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PLoS One* 2014;9:113936.

Lowenstein CJ and Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 1992;70(5):705-7.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic Messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120(3):227-37.

Luk J, Allen RH, Schantz-Dunn J, Goldberg AB. Intrauterine adhesions as a risk factor for failed first-trimester pregnancy termination *Contraception*. 2007; 76: 331-3.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323-50.

Magos A. Hysteroscopic treatment of Asherman's syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2002;3:46-51.

March CM. Intrauterine adhesions. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 1995;22(3):491-505.

March CM. Management of Asherman's syndrome. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010; 23:63– 76.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002; 62: 609-614.

Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol.* 2003;122:877-91.

Mathiasen AB, Qayyum AA, Jørgensen E, Helqvist S, Fischer-Nielsen A, Kofoed KF, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *Eur Heart J* 2015;36:1744-53.

Matur İ, Solmaz S. Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. *Arşiv* 2011, s: 168-186.

Merviel P, Challier JC, Carbillon L, Foidart JM, Uzan S. The Role of Integrins in Human Embryo Implantation. *Fetal Diagn Ther.* 2001; 16: 364-371.

Meseguer M, Pellicer A, Simon C. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1089-1098.

Michie HR, Spriggs DR, Manouge KR. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery.* 1988;104:280.

Moat NE, Shore DF, Evans TW. Organ dysfunction and cardiopulmonary bypass: the role of complement and complement regulatory proteins. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993;7:563-73.

Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med.* 2007;10:459-66.

Moncada S and Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med.* 2002;329:11.

Motor S, Ozturk S, Ozcan O, et al. Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in patients with alopecia areata. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7: 1089-1093.336.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997;88:355-365.

Nagori CB, Panchal SY, Patel H. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci*. 2011;4:43-8.

Navarro A, Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:1244-1249.

Netter FH. Atlas of Human Anatomy, Çeviren; Meserret Cumhuriyeti İnsan Anatomisi Atlası. 5. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul; 2012.

Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2010; 31(13):3572-9.

Oikawa, T. Cancer Stem Cells and Their Cellular Origins in Primary Liver and Biliary Tract Cancers. *Hepatology*. 2016;doi: 10.1002/hep.28485.

O'Neill C. The role of paf in embryo physiology. *Hum. Reprod*. 2005; 11(3): 215-228.

Orhue AA, Aziken ME, Igbefoh JO. A comparison of two adjunctive treatments for intrauterine adhesions following lysis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003;82:49-56.

Öğüt S ve Atay E. Yaşlılık ve oksidatif stres. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg*. 2012: 19(2)/68-74.

Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. Toraks Dergisi. 2001;2(1):91-95.

Özbek E, Cengiz N, Yanar S. An İmmunosuppressive Protein Supporting Embryonic İmplantation and Having An İmportant Role in Cell Proliferation: The Early Pregnancy Factor. Sakaryamj. 2013;3(3):157-164.

Özcan T. Diyabetin İmplantasyon Penceresi Dönemindeki Sıçan Endometriyumunda $\alpha\beta3$ İntegrin Ekspresyonuna ve İnce Yapıya Etkisi. Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010, Mersin (Danışman: Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ).

Özdal-Kurt F, Tuğlu I, Vatansever HS, Tong S, Şen BH, Deliloğlu-Gürhan SI. The effect of different implant biomaterials on the behavior of canine bone marrow stromal cells during their differentiation into osteoblasts. Biotech Histochem. 2016;91(6):412-22. doi: 10.1080/10520295.2016.1183819.

Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler. Türk Toraks Dergisi. 2003;4(1):88-94.

Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri Journal of Clinical and Experimental Investigations. 2015; 6 (3): 331-336doi: 10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545.

Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002;9(2): 143-148.

Özvaran MK. Malign mezotelyomada gen tedavisi. Toraks Dergisi. 2004;5 (2):110-115.

Paccola CC, Resende CG, Stumpp T, Miraglia SM, Cipriano I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim Reprod.* 2013; 10: 677-683.

Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK. Molecular signalling in uterine receptivity for implantation. *Semin Cell Dev Biol.* 2000; 11: 67-76.

Park JH, Kim DY, Sung IY, Choi GH, Jeon MH, Kim KK, et al. Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery.* 2012;70:1238-47.

Paszkwicz-Gadek A, Porowska H, Sredzińska K., Expression of MUC-1 mucin in full-term pregnancy human placenta. *Adv Med Sci.* 2008;53(1):54-8.

Patapoutian A, Wold BJ, Wagner RA. Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science.* 1995;270:1818-21.

Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, Gotkine M, Levy YS, Kassis I, et al. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA Neurol* 2016;73:337-44.

Poncelet C, Leblanc M, Walker-Combrouze F, Soriano D, Feldmann G, Madelenat P, Scoazec JY, Daraï E. Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002; 81, 195-203.

Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2015;7(5):839-51. doi:10.4252/wjsc.v7.i5.839.

Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, ve ark. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 2004;114, 744–754.

Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the Mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92, 855-859.

Rişvanli A, Aydın M, Kaygusuzoğlu E, Timurkan H. Ratlarda tiroidektominin seksüel siklus ve gebe kalma oranları üzerine etkisi. *Turk J Vet Anim Sci.* 2003; 27: 873-877.

Robinson JK, Colimon LM, Isaacson KB. Postoperative adhesiolysis therapy for intrauterine adhesions (Asherman’s syndrome). *Fertil Steril.* 2008;90(2):409–14.

Roman H, Sentilhes L, Cingotti M, Verspyck E, Marpeau L. Uterine devascularization and subsequent major intrauterine synechiae and ovarian failure. *Fertil Steril.* 2005;83:755–7.

Rosario GX, Modi DN, Sachdeva G, Manjramkar DD, Puri CP. Morphological events in the primate endometrium in the presence of a preimplantation embryo, detected by the serum preimplantation factor bioassay, *Hum Reprod.* 2005;20(1):61-71.

Ross HM, Kaye IG. *Histology, A Text and Atlas.* 4 th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 2003, p:641-645.

Ross MH, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas.* Çeviren: Barış BAYKAL. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas.* 6. Basım, Palme Yayıncılık Ltd. Şti. Ankara; 2014, s:830-870.

Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis.* 2001;6:103-116.

Sadler TW. Langsman Medical Embriyoloji. Çeviren: Can Başaklar. Langman Medikal Embriyoloji. 11. Basım, Palme Yayıncılık Ltd. Şti. Ankara; 2011, s:246-262.

Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. Scientific World Journal. 2014;2014:201514.

Salzani A, Yela DA, Gabiatti JR, Bedone AJ, Monteiro IM. Prevalence of uterine synechia after abortion evacuation curettage Sao Paulo Med J. 2007;125:261-4.

Sancak B, Cumhuriyet M. Fonksiyonel Anatomi, Baş Boyun ve İç Organlar. 1. Baskı. ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş., Ankara; 1999, s:333-338.

Sanford T, De M, Wood G. Expression of colony stimulating factors and inflammatory cytokines in the uterus of CD1 mice during days 1 to days 3 of pregnancy. J Reprod Fertil. 1992;94:213–220.

Sarani SA, Ghaffari-Novin M, Warren MA, Dockery P, Cooke ID. Morphological evidence for the 'implantation window' in human luminal endometrium. Hum Reprod J. 1999;14(12):3101-3106.

Schenker JG, Margalioth EJ. Intrauterine adhesions: an updated appraisal. Fertil Steril 1982;37:593–610.

Scully T. Diabetes in numbers. Nature 2012;485:2-3.

Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG, Prockop DJ. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma. J. Bone Miner. Res. 2004;19(2):256-264.

Sharma A, Kumar P. Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *J Hum Reprod Sci.* 2012;5(1):2-6. doi: 10.4103/0974-1208.97777.

Shiau CS, Hsieh CC, Chiang CH, Hsieh TT, Chang MY. Intrapartum spontaneous uterine rupture following uncomplicated resectoscopic treatment of Asherman's syndrome. *Chang Gung Med J.* 2005;28:123–7.

Shi X, Zhang Y, Zheng J, Pan J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxidants and Redox Signaling.* 2012;16(11):1215–1228. doi: 10.1089/ars.2012.4529.

Shuya LL, Menkhorst EM, Yap J, Li P, Lane N, Dimitriadis E. Leukemia Inhibitory Factor Enhances Endometrial Stromal Cell Decidualization in Humans and Mice. *PLoS One.* 2011;6(9):e25288.

Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JLC, Zanette DL, Santos ARD, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2003; 21; 661-669.

Singh N, Mohanty S, Seth T, Shankar M, Bhaskaran S, Dharmendra S. Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: A novel cell based therapy. *J Hum Reprod Sci.* 2014;7(2):93-8.

Snell S. *Clinic Anatomy.* Çeviren: Mehmet Yıldırım. Klinik Anatomi. 5. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd, Şti., İstanbul; 1998: s. 323-326.

Song T, Zhao X, Sun H, Li X, Lin N, Ding L, et al. Regeneration of uterine horns in rats using collagen scaffolds loaded with human embryonic stem cell-derived endometrium-like cells. *Tissue Eng Part A.* 2015;21:353–61.

Sözen EO. Menstrüel Döngüde Sıçan Uterus Epitelinde Sıkı ve Oluklu Bağlantı Proteinlerinin Dağılımlarının İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi. *Gazi*

Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2008, Ankara (Danışman: Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN).

Staley K, Blaschke A J, Chun J. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death and Differentiation*. 1997;4:66-75.

Susan JK. Molecular Interactions at the Maternal- Embryonic Interface During the Early Phase of Implantation. *Sem Reproductive Med*. 2000; 18 (3): 237- 253.

Staun-Ram E and Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005, 3:56 doi:10.1186/1477-7827-3-56.

Star RA. Nitric oxide. *Am J Med Sci*. 1993;306(5):348-58.

Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *MolBiosyst*. 2008;4, 835–850.

Sternberg SS. (Ed.). *Histology for pathologists*. Raven Press, New York: 1997, p:977.

Sugiura H, Ichinose M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide*. 2011;25(2):138-44. doi: 10.1016/j.niox.2011.03.079.

Suman P, Malhotra SS, Gupta SK. LIF-STAT signaling and trophoblast biology. *JAKSTAT*. 2013; 1;2(4):e25155. doi: 10.4161/jkst.25155.

Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *THOD*. 2005;15(1):48-56.

Tabibzadeh S. Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod.* 1992; 7: 876-882.

Tae SK, Lee SH, Park JS, Im GI. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *J. Biomed. Mater.* 2006;1:63-71.

Tamada H, Sakamoto M, Sakaguchi H, Inaba T, Sawada T. Evidence for the involvement of transforming growth factor-alpha in implantation in the rat., *Life Sci.* 1997;60(17):1515-22.

Tam WH, Lau WC, Cheung LP, Yuen PM, Chung TK. Intrauterine adhesions after conservative and surgical management of spontaneous abortion. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2002;9:182-5.

Tan J, Li P, Wang Q, Li Y, Li X, Zhao D, et al. Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome. *Hum Reprod.* 2016;31:2723-9.

Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA.* 2004;292(1):81-5.

Tekelioğlu, M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayıncılık Antıp A. Ş., Ankara; 2002.

Tejero J and Stuehr D. Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthase. *IUBMB Life.* 2013;65(4):358-65.

Terekeci MH, Şahan B, Top C. Cell adhesion molecules. *Nobel Med* 2008; 4(1):4-10.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282:1145-1147.

Thomson AJM, Abbott JA, Kingston A, Lenart M, Vancaillie TG, Fluoroscopically guided synechiolysis for patients with Asherman's syndrome: menstrual and fertility outcomes *Fertil Steril*. 2007;87:405–10.

Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T. Klin. J. Med. Sci*. 2003;23:499-508.

Tourgeman D, Gentzchein E, Stanczyk FZ, Paulson RJ. Serum and tissue hormone levels of vaginally and orally administered estradiol. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180:1480–3.

Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev*. 2006;27:208-19.

Tsapanos VS, StathopoulouLP, Papathanassopoulou VS, Tzingounis VA. The role of Seprafilm bioresorbable membrane in the prevention and therapy of endometrial synechia. *J Biomed Mater Res*. 2002;63: 10–4.

Tsuchiya B, Sato Y, Kameya T, Okayasu I, Mukai K. Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. *Arch Histol Cytol*. 2006; 69, 135-145.

Tuglu Mİ, Özdal-Kurt F, Koca H, Saraç A, Barut T, Kazanç A. The contribution of differentiated bone marrow stromal stem cell-loaded biomaterial to treatment in critical size defect model in rats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2010; 16 (5): 783-792, doi:10.9775/kvfd.2010.1582.

Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol. Biotechnol*. 2003;23(1):37-49.

Ucelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol.* 2011; 10: 649-56.

Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35(2). pii: e00191. doi:10.1042/BSR20150025.

Unur E, Ülger H, Ekinci N. *Anatomi. K1v1lc1m Kitabevi. Kayseri; 2009.*

Ventolini G, Zhang M, Gruber J. Hysteroscopy in the evaluation of patients with recurrent pregnancy loss: a cohort study in a primary care population. *Surg Endosc.* 2004;18:1782-4.

Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Enzymology.* 1999;17:329-338.

Wang B, Sheng JZ, He RH, Qian YL, Jin F, Huang HF. High expression of L-selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being. *Am J Reprod Immunol.* 2008;60, 127-134.

Wang N, Li Q, Zhang L, Lin H, Hu J, Li D, Shi S, Cui S, Zhou J, Ji J, Wan J, Cai G, Xiangmei Chen X. Mesenchymal stem cells attenuate peritoneal injury through secretion of TSG-6. *PLoS One.* 2012;7:e43768.

Wang L, Yang M, Jin M, Wu Y, Zheng T, Gu S, Hua X. Transplant of insulin-like growth factor-1 expressing bone marrow stem cells improves functional regeneration of injured rat uterus by NF- κ B pathway. *J Cell Mol Med.* 2018;22(5):2815-2825.

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100:157-168.

Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Velde CJH, Cornelisse CJ, Dierendonck JHV. A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1993;41(1):7-12.

Williams AR, Trachtenberg B, Velazquez DL, McNiece I, Altman P, Rouy D, et al. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling. *Circ Res* 2011;108:792-6.

Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med*. 2001;22:149-64.

Wu J, Li J, Zhang N, Zhang C. Stem cell-based therapies in ischemic heart diseases: a focus on aspects of microcirculation and inflammation. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(3):317–24.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12:1161-1208.

Vianello F, Dazzi F. Mesenchymal stem cells for graftversus host disease: a double edged sword? *Leukemia*, 2008;22:463-5.

Xiao L, Song Y, Huang W, Yang S, Fu J, Feng X, Zhou M. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017;15:14 DOI 10.1186/s12958-017-0234-9.

Yan LJ. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol*. 2014;9:165-169.

Yan LJ, Sohal RS. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:896-901.

Yasmin H, Adeghe JH. Severe early-onset intrauterine growth restriction (IUGR) in a woman with Asherman's syndrome. *J Obstet Gynaecol*. 2004;24:312–4.

Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011;111:5944- 5972.

Yu D, Wong YM, Cheong Y, Xia E, Li TC. Asherman syndrome-one century later. *Fertil Steril* 2008;89:759-79.

Yuksel B, Kılıc S, Boztok B, Albayrak A. 2014. ‘‘An Experimental Asherman Syndrome, Rat Model’’ .*Turkiye Klinikleri J Gynecol Obst.* 2014;24(4):195-7.

Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem.* 2008; 283(15):9499-503. doi: 10.1074/jbc.R700043200.

Zhang J, Xu M. Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. *Trends in Cell Biology.* 2002;12(2):84- 89.

Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Uterine infusion with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrium thickness in a rat model of thin endometrium. *Reprod Sci.* 2015;22(2):181-8.

Zou J, Yuan C, Wu C, Cao C, Yang H. The effects of platelet-rich plasma on the osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res.* 2014;PubMed PMID: 24874552.

10. EKLER

EK-1



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
23.03.2018	11	26

Karar 13- Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı 121303003 numaralı doktora programı öğrencisi Şamil ÖZTÜRK'ün 26.01.2016 tarih ve 3 nolu Yönetim Kurulunda görüşülen tez konusunun etik kurul onayı alınması kaydı ile "Tekrarlanan Kök Hücre Uygulamasının Deneysel Asherman Modeli Üzerine Etkisi İle İmplantasyon ve Gebelikte Görülen Sonuçları" olarak belirlenmiş olup, Anabilim Dalı Başkanlığı'nın yazısı gereği içeriğinde değişiklik olmadığı için geçmiş dönem tez izleme komitesi raporlarının kabulüne **OY BİRLİĞİ** karar verildi.

e-imzalıdır Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ Enstitü Müdürü	
e-imzalıdır Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Müdür Yardımcısı	e-imzalıdır Prof. Dr. Necip KUTLU Üye
e-imzalıdır Prof. Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ Üye	e-imzalıdır Doç. Dr. Murat TAŞ Üye
Aynur PALAMUTÇUOĞLU Enstitü Sekreteri Raportör	




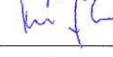
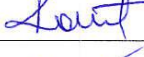

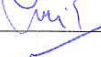
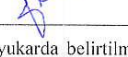

Aslı Gibidir
23/11/2018

Aynur PALAMUTÇUOĞLU
Enstitü Sekreteri



EK- 2

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	13 / 02 / 2018 / 77.637.435 -			
ARAŞTIRMANIN ADI	Tekrarlanan kök hücre uygulamasının deneysel asherman modeli üzerine etkisi ile implantasyon ve gebelikte görülen sonuçları			
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU - MCBÜ Histoloji- Embriyoloji AD			
ARAŞTIRMA EKİBİ	Doktora Öğr. Şamil Öztürk,- Uz. Dr.İşıl Aydemir,- Uz. Bio. Mahmud Özkut,- Biokm. Dila Hatun Sal,- Arş. Gör. Suna Karadeniz Saygılı,- Arş. Gör. Dr. Pınar Sönmez,- Bio. Fulya Gülbağca			
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/>	Yüksek Lisans/Doktora <input checked="" type="checkbox"/>	Akademik <input type="checkbox"/>	Eğitim <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	05 / 02 / 2018 / Tarih ve 6668 sayılı; araştırma adının değiştirilmesi ve protokol revizyonu konulu dilekçe			
KARAR BİLGİLERİ	Dilekçe incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			
Ünvanı /Adı /Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM MD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Saime ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.				
 Prof. Dr. Emin KURT Başkan				

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tez Adı: Tekrarlanan Kök Hücre Uygulamasının Deneysel Asherman Modeli Üzerine Etkisi İle İmplantasyon ve Gebelikte Görülen Sonuçları

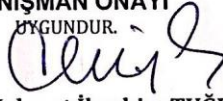
Tezime ilişkin 19/10/2018 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 18'dir.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
22/11/2018

Adı Soyadı :Şamil ÖZTÜRK
Öğrenci No :121303003
Anabilim Dalı :Histoloji Emriyoloji
Programı :Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.



Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orjinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süre gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünün sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Şamil	Soyadı	ÖZTÜRK
Doğum Yeri	Özbekistan	Doğum Tarihi	16.11.1986
Uyruğu	T.C	Tel	05383850186
Email	samiilozturk16@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Histoloji- Embriyoloji AD	2018
Yüksek Lisans	Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Histoloji- Embriyoloji AD	2012
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Nuri Erbak Lisesi	2005

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Öğretim Görevlisi	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2012-devam ediyor

Yabancı Diller	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	Orta	İyi
Rusça	İyi	Zayıf	Orta
Özbekçe	Çok iyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Notu		
YDS	ÜDS	KPDS
	65	60