

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

**POSTNATAL FARE OVARYUMUNDA YENİ OOSİT VE
FOLİKÜL GELİŞİMİ**

Gözde YAZICIOĞLU

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı İçin Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2012

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

**POSTNATAL FARE OVARYUMUNDA YENİ OOSİT VE
FOLİKÜL GELİŞİMİ**

Gözde YAZICIOĞLU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN: Prof. Dr. Serdar FİLİZ

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu

(Proje No: 2010 / 30) tarafından desteklenmiştir.

KOCAELİ

2012

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

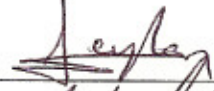
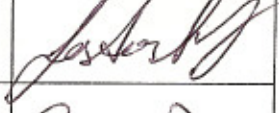

Tez adı: Postnatal fare ovaryumunda yeni oosit ve follikül gelişim

Tez yazarı: Gözde Yazıcıoğlu

Tez savunma tarihi: 20.02.2012

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serdar Filiz

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Başkan	Prof. Dr. Süreyya Ceylan	
Üye (Danışman)	Prof. Dr. Serdar Filiz	
Üye	Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu	
Üye		
Üye		

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../2012


Prof. Dr. Ümit Biçer
Enstitü Müdürü

ÖZET

Postnatal Fare Ovaryumunda Yeni Oosit ve Folikül Gelişimi

Bu çalışmada; son yıllardaki oldukça tartışmalı bir konu olan postnatal fare ovaryumunda yeni oosit ve folikül gelişimini immünohistokimya, Western Blot ve RT-PCR yöntemleri ile tespit etmeyi amaçladık.

Çalışmamızda, seksüel olarak matür, 25 adet en az 2 düzenli 5 günlük östrus siklusuna sahip dişi ve 5 adet erkek fare kullanıldı. İki adet dişi fare ve bir adet erkek fare bir arada olacak şekilde çiftleşmeleri için bir gece aynı kafeste bırakıldı. Ertesi sabah erkek fare, dişi farelerin yanından ayrıldı. Dişi farelerden smear alınarak lamlara yayma yapıldı ve metilen mavisi ile boyanarak lamda spermatozoa gözlenmeye çalışıldı. Spermatozoa gözlenmesi durumunda gözlenen gün hamileliğin 0. günü olarak kabul edildi. Yaklaşık 21 günlük hamileliğin ardından doğan dişi farelerden bir grup 10 gün sonunda, bir grup 1 ay sonunda diğer bir grupta 2 ay sonunda sakrifiye edildi. Ovaryumlarından bir tanesi immünohistokimyasal çalışmalar için diğeri ise Western blot ya da RT-PCR (Revers-Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniklerinden bir tanesini uygulamak amacı ile tüplere konulup sıvı azot içerisine aktarılarak saklandı.

Çalışmamızın sonucunda, oosit belirteci olarak kullandığımız Zp3 ve GDF9, primordiyal germ hücre belirteci olarak kullandığımız Stella ekspresyonunu bütün deney gruplarında immünohistokimyasal, Western blot ve RT-PCR yöntemleri ile tespit ettik. Mayoz hücre belirteci olarak kullandığımız SCP3 ekspresyonunu ise deney gruplarımızın hiçbirisinde immünohistokimyasal ve Western blot yöntemi ile tespit edemedik ancak RT-PCR yöntemi ile gösterdik.

Çıkan sonuçlar doğrultusunda; SCP3 proteinini, genini ve ekspresyonunu gösteremeyişimiz postnatal dönem fare ovaryumunda mayoz bölünmeye yeni başlayan bir hücrenin olmadığını göstermiştir.

Stella ekspresyonunun sadece oosit sitoplazması ile sınırlı olduğunu, aktif durumda olmadığını göstererek; ekspresyonunu saptadığımız hücrenin primordiyal germ hücresi olmadığını göstermiştir.

GDF9 ekspresyonunun bütün deney gruplarında gösterilmesi folikül gelişiminin sürekli olduğunu göstermiştir.

Ekspresyonuna prenatal dönemde başlanan Zp3 ekspresyonunu bütün deney gruplarında göstererek postnatal dönemlerde yoğun olarak sentezlendiğini belirttik. Sonuç olarak, postnatal dönem fare ovaryumda, kullandığımız tekniklerle primordiyal germ hücrelerinin ve yeni oosit gelişiminin izine rastlayamadık.

Anahtar Kelimeler: postnatal fare ovaryum, oosit, immünohistokimya, western blot, RT-PCR

ABSTARCT

New Oocyte and Follicle Development in Postnatal Mouse Ovarium

In this study, we aimed to detect new oocyte and follicle development in postnatal mouse ovarium, which is a highly controversial topic in recent years, by immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR methods.

In our study, 25 sexually-mature female having at least 2 regular 5-day oestrus cycles and 5 male mice were used. Two female and one male mice were left in a cage all night for breeding. On the following day, male mouse was taken away from females. Smear was taken from female mice and mounted on slides. Slides were died with methylene blue and scanned for spermatozoa. The day which spermatozoa was observed was accepted as the day 0 of pregnancy. Mice that were born after nearly a 21-day pregnancy period were divided into three groups. First group was sacrificed after 10 days, the second at the end of 1 month and the third one after 2 months.

Ovaries were placed into tubes and transferred into liquid nitrogen. One of them was stored for immunohistochemical studies and the other one was stored for Western blot or RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction).

At the end of our study, we detected expressions of oocyte markers Zp3 and GDF9, and primordial cell marker Stella in all experimental groups by immunohistochemical, Western blot and RT-PCR methods. We could not observe meiosis cell marker SCP3 expression in any of our study groups by immunohistochemical and Western blot methods; however, we could show by RT-PCR.

In line with the results; nonexistence of SCP3 protein, gene and expression shows that there is not any new cell which starts meiosis in postnatal term mouse ovary.

Stella expression is limited to only the oocyte cytoplasm and it is not active ; means that the cell which we determine the expression is not the primordial germ cells.

To show GDF9 expression in all the experimental groups shows that the development is continuous.

Zp3 expression begins in a period of prenatal. We indicated that it is being synthesised in a period of postnatal by showing Zp3 expression in the all experimental

groups As a result, in the postnatal term mouse ovarian, we could not determine any primordial germ cell and oocyte development by the techniques we used .

Key Words: postnatal mouse ovarium, oocyte, immunohistochemistry, western blot, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan; her konuda sonsuz destek veren değerli Danışman hocam;

Prof. Dr. Serdar Filiz'e

Ana bilim Dalımızda Yüksek Lisans Eğitimi aldığım sürece her türlü bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benimle paylaşan hocalarım;

Prof. Dr. Süreyya Ceylan'a, Prof. Dr. Hakkı Dalçık'a, Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz'a, Doç. Dr. Süheyla Gonca'ya, Yard. Doç. Dr. Yusufhan Yazır a

Anabilim Dalımızdaki çalışma arkadaşlarım;

Uzm. Bio. Özcan Budak'a, Araş. Gör. Elif Gelenli'ye ve Uzm. Bio. Sevilay Erimşaha'a

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli arkadaşlarım;

Bio. Cansu Semiz'e, Araş. Gör. Sema Kurnaz'a, Uzm. Bio. Ender Yalçınkaya'ya ve Uzm. Bio. Begüm Alyürük'e

Deneysel çalışmalarım sırasında emeği geçen;

Dr. Pelin Coştur'a

Moleküler çalışmalarım sırasında her türlü deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri;

Doç. Dr. Murat Kasap'a ve Yard. Doç. Gürler Akpınar'a

Moleküler yöntemlerin uygulandığı her basamakta bilgi ve tecrübeleri ile bana her türlü desteği sağlayan çok değerli çalışma arkadaşım;

Araş. Gör. Sinem Torol Özgül'e

Hayatım boyunca sonsuz sevgisi ve desteği ile her zaman yanımda olan canım

Anne ve Babam; Meliha & Özdemir Yazıcıoğlu'na

Canım ablalarım; ***Eser Yazıcı, Gaye Yazıcıoğlu ve Fisun Yazıcıoğlu'na***

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM ...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1.GİRİŞ.....	1
1.1.AMAÇ VE KAPSAM.....	2
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Dişi Üreme Sistemi.....	5
2.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi.....	5
2.1.2. Ovaryumun Anatomisi.....	7
2.1.2.1. Anatomik Bölümleri.....	7
2.1.2.1.a. Ovaryumun Arterleri.....	9
2.1.2.1.b. Ovaryumun Venleri.....	9
2.1.2.1.c. Ovaryumun Lenf Damarları.....	10
2.1.2.1.d. Ovaryumun Sinirleri.....	10
2.1.3. Ovaryumun Histolojisi.....	10
2.1.3.1. Folikül Gelişimi.....	11
2.1.3.1.a. Primordiyal Folikül.....	12
2.1.3.1.b. Primer Folikül.....	14
2.1.3.1.c. Sekonder Folikül.....	15
2.1.3.1.d. Olgun (Graaf) Folikül.....	16
2.1.3.2. Folikül atrezisi.....	18
2.1.3.3. Folikül Gelişmesinde Etkili Bazı Faktörler.....	19
2.1.3.4. Oogenezis.....	19
2.1.3.4.a. Doğum öncesi (Prenatal) Olgunlaşma.....	19
2.1.3.4.b. Doğum sonrası (Postnatal) Olgunlaşma.....	20
2.1.3.5. Ovulasyon.....	20
2.1.3.6. Korpus Luteum.....	21
2.1.3.7. Tuba Uterina (Ovidukt-Fallop Tüpleri).....	22
2.1.3.8. Uterus.....	22
2.1.3.9. Serviks Uteri.....	24
2.1.3.10. Vajina.....	24
2.1.4. Dış Genital Organlar.....	25
2.2. SCP 3 (Sinaptonemal Kompleks Protein 3).....	25
2.3. Stella.....	27
2.4. GDF 9 (Growth Differentiation Factor 9).....	28
2.5. Zp3 (Zona Pellusida Glikoproteini 3).....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Deney Hayvanları.....	32
3.2. Östrus Takibi.....	32
3.3. Deney Grupları.....	33
3.3.1. 1. Grup: 10 Günlük Grup.....	34
3.3.2. 2. Grup: 1Aylık Grup.....	34
3.3.3. 3. Grup: 2 Aylık Grup.....	34

3.4. Doku Takibi.....	35
3.5. İmmünohistokimya.....	35
3.6. Revers – Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	36
3.6.1. RNA İzolasyonu.....	36
3.6.2. cDNA Sentezi.....	37
3.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kuruluşu.....	37
3.6.4. Primerler ve İşlem.....	38
3.6.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	39
3.7. Western Blot.....	39
3.7.1. Protein İzolasyonu.....	39
3.7.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Protokolü.....	39
3.8. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	41
3.8.1. İmmünohistokimya, Östrus ve Doku Takibi İçin Kullanılan Kimyasallar.....	41
3.8.2. RT-PCR ve Western Blot İçin Kullanılan Kimyasallar.....	42
4. BULGULAR.....	44
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇ.....	75
7. KAYNAKLAR.....	77
8. ÖZGEÇMİŞ.....	85

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A. ovarica	:	Arteria ovarica
APS	:	Amonyum persülfat
BMP-15	:	Bone Morphogenetic Protein 15
BMT	:	Kemik İliği Transplantasyonu
bp	:	Baz çifti
cDNA	:	Complementary Deoksiribonükleik Asit
DAB	:	Diamino benzidin
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	:	Etidyum bromür
FSH	:	Folikül Uyarıcı Hormon
GDF 9	:	Growth Differentiation Factor 9
GFP	:	Green fluorescent protein
GKH	:	Germinal kök hücreler
IGF-BP	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
kDa	:	Kilodalton
Lig.	:	Ligamentum
OMI	:	Oosit Maturasyon İnhibitörü
PB	:	Phosphate Buffered
PBT	:	Periferal kan transfüzyonu
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCO	:	Polikistik Over

PCOS	:	Polikistik Over Sendromu
PGHs	:	Primordial Germ Hücreleri
RLT	:	Lökosit liziz
RPE	:	Yıkama tamponu
Rpm	:	Revolutions per minute
RT-PCR	:	Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RW1	:	Yıkama tamponu
SCP 3	:	Sinaptonemal Kompleks Protein 3
SCPs	:	Sinaptonemal Kompleks Proteinler
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
TA	:	Tunika albuginea
TAE	:	Tris Asetik Asit EDTA
TBST	:	Tris-Buffered Saline Tween 20
TGF- β	:	Transforming Growth Factor-Beta 1
TPER	:	Tissue Protein Extraction Reagent
V. ovarica	:	Vena ovarica
ZP 3	:	Zona Pellusida Glikoproteini 3

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 5-6 haftalık embriyoda primordiyal germ hücrelerinin göçü, farklılaşmış gonadlar, mezonefrik ve paramezonefrik kanallar izlenmektedir.....	6
Şekil 2.2. Ovaryumun anatomisi.....	9
Şekil 2.3. Ovaryum dokusunun hematoxilen-eozin ile boyanmış kesiti.....	11
Şekil 2.4. Ovaryumun şematik yapısı.....	12
Şekil 2.5. Primordiyal ve primer foliküller.....	13
Şekil 2.6. Gelişim halindeki foliküller.....	16
Şekil 2.7. Sekonder bir folikülde teka interna ve eksterna tabakaları.....	16
Şekil 2.8. Olgun bir folikül (Graaf folikülü).....	17
Şekil 2.9. Çeşitli gelişim aşamalarında ovarium folikülleri.....	18
Şekil 2.10. Zona pellusida glikoprotein yapısı.....	31
Şekil 3.1. Dikey jel elektroforez sistemleri.....	40
Şekil 4.1.a. 10 Günlük Grup SCP3 X 200.....	48
Şekil 4.1.b. 10 Günlük Grup SCP3 X 400.....	48
Şekil 4.2.a. 1 Aylık Grup SCP3 X 200.....	49
Şekil 4.2.b. 1 Aylık Grup SCP3 X 400.....	49
Şekil 4.3.a. 2 Aylık Grup SCP3 X 100.....	50
Şekil 4.3.b. 2 Aylık Grup SCP3 X 200.....	50
Şekil 4.3.c. 2 Aylık Grup SCP3 X 400.....	50
Şekil 4.4.a. 10 Günlük Grup Stella X 100.....	51

Şekil 4.4.b. 10 Günlük Grup Stella X 200.....	51
Şekil 4.4.c. 10 Günlük Grup Stella X 400.....	51
Şekil 4.5.a. 1 Aylık Grup Stella X 100.....	52
Şekil 4.5.b. 1 Aylık Grup Stella X 200.....	52
Şekil 4.5.c. 1 Aylık Grup Stella X 400.....	52
Şekil 4.6.a. 2 Aylık Grup Stella X 100.....	53
Şekil 4.6.b. 2 Aylık Grup Stella X 200.....	53
Şekil 4.6.c. 2 Aylık Grup Stella X 400.....	53
Şekil 4.7.a. 10 Günlük Grup GDF9 X 100.....	54
Şekil 4.7.b. 10 Günlük Grup GDF9 X 200.....	54
Şekil 4.7.c. 10 Günlük Grup GDF9 X400.....	54
Şekil 4.8.a. 1 Aylık Grup GDF9 X 100.....	55
Şekil 4.8.b. 1 Aylık Grup GDF9 X 200.....	55
Şekil 4.8.c. 1 Aylık Grup GDF9 X 400.....	55
Şekil 4.9.a. 2 Aylık Grup GDF9 X 100.....	56
Şekil 4.9.b. 2 Aylık Grup GDF9 X 200.....	56
Şekil 4.9.c. 2 Aylık Grup GDF9 X 400.....	56
Şekil 4.10.a. 10 Günlük Grup ZP3 X 100.....	57
Şekil 4.10.b. 10 Günlük Grup ZP3 X 200.....	57
Şekil 4.10.c. 10 Günlük Grup ZP3 X 400.....	57
Şekil 4.11.a. 1 Aylık Grup ZP3 X 100.....	58

Şekil 4.11.b. 1 Aylık Grup ZP3 X 200.....	58
Şekil 4.11.c. 1 Aylık Grup ZP3 X 400.....	58
Şekil 4.12.a. 2 Aylık Grup ZP3 X 100.....	59
Şekil 4.12.b. 2 Aylık Grup ZP3 X 400.....	59
Şekil 4.13.a. Kontrol 10 Günlük Grup Primersiz X 100.....	60
Şekil 4.13.b. Kontrol 10 Günlük Grup Primersiz X 200.....	60
Şekil 4.13.c. Kontrol 10 Günlük Grup Primersiz X 400.....	60
Şekil 4.14.a. Kontrol 1 Aylık Grup Primersiz X 100.....	61
Şekil 4.14.b. Kontrol 1 Aylık Grup Primersiz X 200.....	61
Şekil 4.14.c. Kontrol 1 Aylık Grup Primersiz X 400.....	61
Şekil 4.15.a. Kontrol 2 Aylık Grup Primersiz X 100.....	62
Şekil 4.15.b. Kontrol 2 Aylık Grup Primersiz X 200.....	62
Şekil 4.15.c. Kontrol 2 Aylık Grup Primersiz X 400.....	62
Şekil 4.16. 10 günlük grup RT-PCR sonuçları.....	63
Şekil 4.17. 1 aylık grup RT-PCR sonuçları.....	64
Şekil 4.18. 2 aylık grup RT-PCR sonuçları.....	65
Şekil 4.19. Western Blot yöntemi ile Zp3 ekspresyonu.....	66
Şekil 4.20. Western Blot yöntemi ile Stella ekspresyonu.....	66
Şekil 4.21. Western Blot yöntemi ile GDF9 ekspresyonu.....	66
Şekil 4.22. Western Blot yöntemi ile SCP3 ekspresyonu	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. cDNA reaksiyon tüpü içeriği.....	37
Çizelge 3.2. PCR reaksiyonu içeriği.....	38
Çizelge 4.1. İmmünohistokimyasal boyanma dereceleri.....	47

1.GİRİŞ

Üreme biyolojisi ile ilgili olarak pek çok bilim adamı tarafından kabul edilen genel görüş; memelilerde intrauterin gelişim boyunca oosit üretiminin tamamlandığı ve doğumdan sonraki dönemde menapoza kadar depo halinde korunan bu oositlerin tüketildiğidir (Zuckerman, 1951; Zuckerman and Baker, 1977). Yani; oosit üretimi sadece intrauterin dönemde gerçekleşir, postnatal dönemde primer oosit sayısında bir yükseliş gerçekleşmez. Ancak, Johnathan Tilly'nin çalışmalarını da içeren bir dizi araştırma bu görüşü değiştirdi (Johnson et al., 2004; Johnson et al., 2005; Lee, 2007). Bu görüş, ilk kez 1923 yılında farede (Allen, 1923) ve 1932 yılında insanda (Simkins, 1932) postnatal ovaryumda oogenezin devam ettiğinin ileri sürülmesi ile tartışma konusu oldu.

Üreme çağında postnatal oosit havuzunun yalnızca küçük bir bölümü hayatta kalarak ovulasyona uğrar, büyük bir kısmı ise atretik dejenerasyona uğrar (Tilly, 2001). Örneğin; insanda yaklaşık olarak 300.000 kadar oosit orijinal havuzda bulunur. Bu sayı ergenlik dönemi boyunca yaklaşık 50 yaşında menopaza girene kadar azalmaya devam eder (Richardson et al., 1987). Benzer şekildeki azalma postnatal dönemde farelerde de mevcuttur (Perez et al., 1999; Canning et al., 2003). Farelerde oosit havuzunun tamamen tükenmesi ölümlerinden hemen önce gibi uzun bir süredir (Gosden et al., 1983).

Son yıllarda yapılan çalışmalar postnatal oogenezis olamadığı şeklindeki görüşü değiştirmiştir. Farelerde oogenezis gösterilmiş ve bu oositlerin somatik hücrelerle çevrelendiği yani folikülogenezisin de gerçekleştiği, bütün bu olayların gençlik ve erişkinlik döneminde de devam ettiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar memeliler ile genişletilmiş, erişkin dişi memelilerde de benzer gelişimin olabileceği düşünülmüş (Johnson et al., 2004) ve yeni oositlerin gelişebilme yeteneğinin yavaş olduğu ileri sürülmüştür (Gosden, 2004). Dişi memelilerde germinal kök hücreler (GKH) ve öncüllerinin bulunduğunu açıkça gösteren bir kanıt yoktur ancak, bazı hücrelerin kemik iliği transplantasyonunun ardından oosit üretimini sürdürdüğü gösterilmiştir (Johnson et al., 2005).

Önceleri doğumda ovaryumdaki bütün oositlerin dışının üremesine katılabileme yeteneğinde olduğu görüşü düşünülüyordu. Ancak, bu görüş ergenlik döneminde şaşırtıcı bir şekilde dişi gonadlarda yenilenici bir aktivitenin olabileceğinin gözlenmesi ile değişti (Johnson et al., 2004). Daha sonra, kemik iliği ve periferel kan dolaşımının bu yenileyici kapasite için hücre deposu olabileceği düşünüldü. Bu düşünceler doğrulanırsa periferel kan

ya da kemik iliği transplantasyonu ile erken menopoza ya da kemoterapi ile indüklenen kısırlık için yeni bir tedavi geliştirilebilirdi (Johnson et al., 2005). Ancak, kemik iliğinden elde edilen ya da dolaşımdaki germ hücre öncüllerinin oosit havuzuna girebilme ve ovulasyonla atılabilme durumları oldukça tartışılmalıdır (Telfer et al., 2005).

1.1. Amaç ve Kapsam

Primordiyal germ hücreleri (PGH), hem erkek hem de dişi memelilerde primitif cinsiyet hücrelerinin embriyonik öncülleridir. PGH, gelişimin erken basamaklarında ekstraembriyonik ektodermden gelen sinyallerin tetiklemesi ile ayrılırlar. Bu hücreler kendini çevreleyen hücrelerden benzersiz gen ekspresyonları ile kolayca ayırt edilebilirler. PGH, gonadların gelişmesi için gerekli son derece önemli hücrelerdir ve yokluklarında gonadlar gelişemez. PGH ovaryuma yerleştikten sonra, önce oogonyumlara sonrada oosite farklılaşıp I. mayoz bölünmeye girerler.

PGH'ni ayırt etmek için pek çok belirteç kullanılabilir. Kullanılan yaygın genlerden bir tanesi de Stella'dır (Aravind et al., 2000). Stella, 150 amino asitlik gen kodundan oluşan bir proteindir. Germ hattına ek olarak, pre-implantasyon aşamasındaki embriyoların hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde tespit edilmiştir (Saitou et al., 2002). Protein, çekirdek ve sitoplazma arasına transfer sağlayan bir nükleer taşıma sinyaline sahiptir (Aravind et al., 2000). Stella maternal bir faktör olarak geçer ve bu yüzden zigot ve oositlerde tespit edilir. Morula basamağının erken evresinde maternal olarak kalıtılan Stella ekspresyonu embriyonik ekspresyonun başlaması ile değişir ve bozulur (Payer et al., 2003). Stella ekspresyonu blastosist aşamasına kadar devam eder, sonrasında tekrar gözlenmez (Sato et al., 2002; Saitou et al., 2002). PGH'nin embriyonik 8,5 (E8,5) günde rektuma doğru göçünde, dişide E13,5 günde ve erkekte E15,5 günde germ hücre soyunda ekspresyonu aynen kalır. Ekspresyonu, yenidoğan ovaryumundaki immatur oositlerde matur oosit oluncaya dek devam eder ancak Stella ekspresyonu erişkin testislerde tespit edilememiştir (Sato et al., 2002).

Mayoz bölünmeye giren oositler bazı özel gen ürünlerini eksprese ederler. Mayotik profaz I; sinaptonemal komplekslerin oluşumu (SCs), çift zincir kırılması (DSB), homolog kromozomların rekombinasyonu ve DNA tamiri gibi birçok benzersiz özellik ihtiva eder. Bunların yanı sıra, SCs evrimsel olarak korunan mayoz özel yapılarındandır. Homolog kromozomların sinapsisinde, kiazmata dağılımında ve kromozom ayrılmalarında merkezi bir rol oynarlar. Birçok protein ve enzim, örneğin, SCP1-3 (de Vries et al., 2005; Yang et

al., 2006), SPO11 (Baudat et al., 2000; Romanienko and Camerini-Otero, 2000), DMC1 (Pittman et al., 1998; Yoshida et al., 1998) mayoz için çok önemlidirler ve bu mayotik genlerde ki bir bozulma farelerde infertiliteye ya da fertilitede azalmaya neden olur (Hunt and Hassold, 2002).

Dişi germ hücrelerinin gelişmesinin erken basamakları süresince ekspresyonu azalan DMC1 (Menke et al., 2003) ve SCP3 (Bullejos and Kopman, 2004) in vivo olarak mayoz girişte çok önemlidir. Germ hücrelerinin replikasyonu ile postnatal yaşamdaki follikül oluşumu için oositler üretilir ve mayozun başlaması bazı genlerin ekspresyonunu gerektirir. SCP3 ekspresyonu mayoz başlangıç belirteci olarak kullanılır çünkü daha önceki çalışmalar SCP3 ve DMC1'in germ hücrelerinde mayozun pakiten ya da zigoten basamakları ile ekspresyonunun kısıtlı olduğunu göstermiştir (Yuan et al., 2000; Cohen and Pollard, 2001). Dolayısıyla, postnatal memeli ovaryumunda olası neo-oogenezisin gösterilmesi için SCP3 mükemmel bir belirteçtir.

Bütün bunlarla birlikte, oositlerde GDF9 (growth differentiation factor 9) gibi oosite özgü proteinlerde eksprese edilir. Gerek farelerde gerekse insanlarda yapılan çalışmalarda GDF 9 ovaryen folikülogenez için ihtiyaç duyulan önemli faktörlerdendir (Dong et al., 1996; Pellicer et al., 2000). GDF9 yetmezliğinin olduğu durumlarda tek tabakalı primer foliküler aşamadan sonraki ileri foliküler gelişim aşamasında belirgin bir bloğun olduğu ve buna bağlı olarak infertiliteye neden olduğu saptanmıştır. Bu nedenle GDF9, in vivo somatik hücre fonksiyonları için ihtiyaç duyulan ilk oosit kaynaklı faktör olarak gösterilmektedir (Dong et al., 1996).

Bütün memeli oositlerinde zona pellusida denilen ince ekstraselüler bir örtü mevcuttur. Zona pellusida implantasyon öncesi gelişim, fertilizasyon ve oogenez süresince önemli bir rol oynar (Wassarman, 1988). Zona matriksi ilk olarak oosit ve etrafındaki granüloza hücreleri arasındaki boşlukta biçimsiz materyalin birikmesi şeklinde ortaya çıkar. Fare zona pellusidası ZP1, ZP2 ve ZP3 olmak üzere 3 glikoprotein içerir. Bu üç glikoprotein oogenez süresince koordineli olarak sentezlenir. Fare zona pellusida genlerinin ekspresyonu benzersiz olarak oogenez sırasında gerçekleşir ve hücre bölünmesi olmadan gelişimleri düzenlenir. Büyüyen oosit, ovule olan yumurta ve bölünen embriyonun çevresinde ekstraselüler matriks biçiminde bulunur (Yanagimachi, 1981).

Pubertede ovaryumlar yaklaşık 300.000 oosit içerir. Her menstrual siklusta genellikle tek bir oosit serbest bırakıldığı ve kadının doğurganlık çağı yaklaşık 30-40 yıl sürdüğü göz önüne alındığında yalnızca 450 kadar oosit atılmış olur. Diğer oositler ise

atrezi yolu ile ortadan kalkar. Atrezi kadının üreme çağı boyunca devam eder ve 40-45 yaşlarında geriye yaklaşık olarak 8000 oosit kalır (Junquera and Carnerio, 2009). Yıllardır doğru olarak kabul edilen bu bilgiler son yıllarda yapılan araştırmalar ile tartışılır hale gelmiştir.

Çalışmamızda, memelilerde intrauterin dönemde tamamlandığı düşünülen oogenezis ve erken folikül gelişiminin postnatal dönem fare ovaryumunda devam edip etmediğini; germ hücre belirteci olarak Stella, oosit belirteci olarak ZP3, GDF9 ve mayotik hücre belirteci olarak SCP3 ekspresyonlarını immünohistokimyasal, Western Blot ve RT-PCR yöntemleri ile belirlemeye çalıştık. Böylece, oldukça tartışmalı olan bu konunun anlaşılmasına katkıda bulunmayı, postnatal oogenezin gerçekleştiğini göstermemiz durumunda hangi dönemde daha etkin bir oogenezis gerçekleştiğini belirlemeyi ve postnatal dönemde yeni folikül gelişiminin gösterilmesi durumunda erken dönemde ovaryen yetmezliğe girmiş ya da azalmış over rezervi bulunan hastalara yönelik yeni araştırmaların yapılmasına katkıda bulunmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi; iç genital organlar olan iki ovaryum, iki tuba uterina (fallop tüpleri- ovidukt), bir uterus ve bir vajina ile dış genital organlardan oluşur. Bu sistem menarş ile menapoz arasında histofizyolojik döngüsel değişikliklere uğrar ve bu değişiklikler hormonal mekanizmaların kontrolü altındadır.

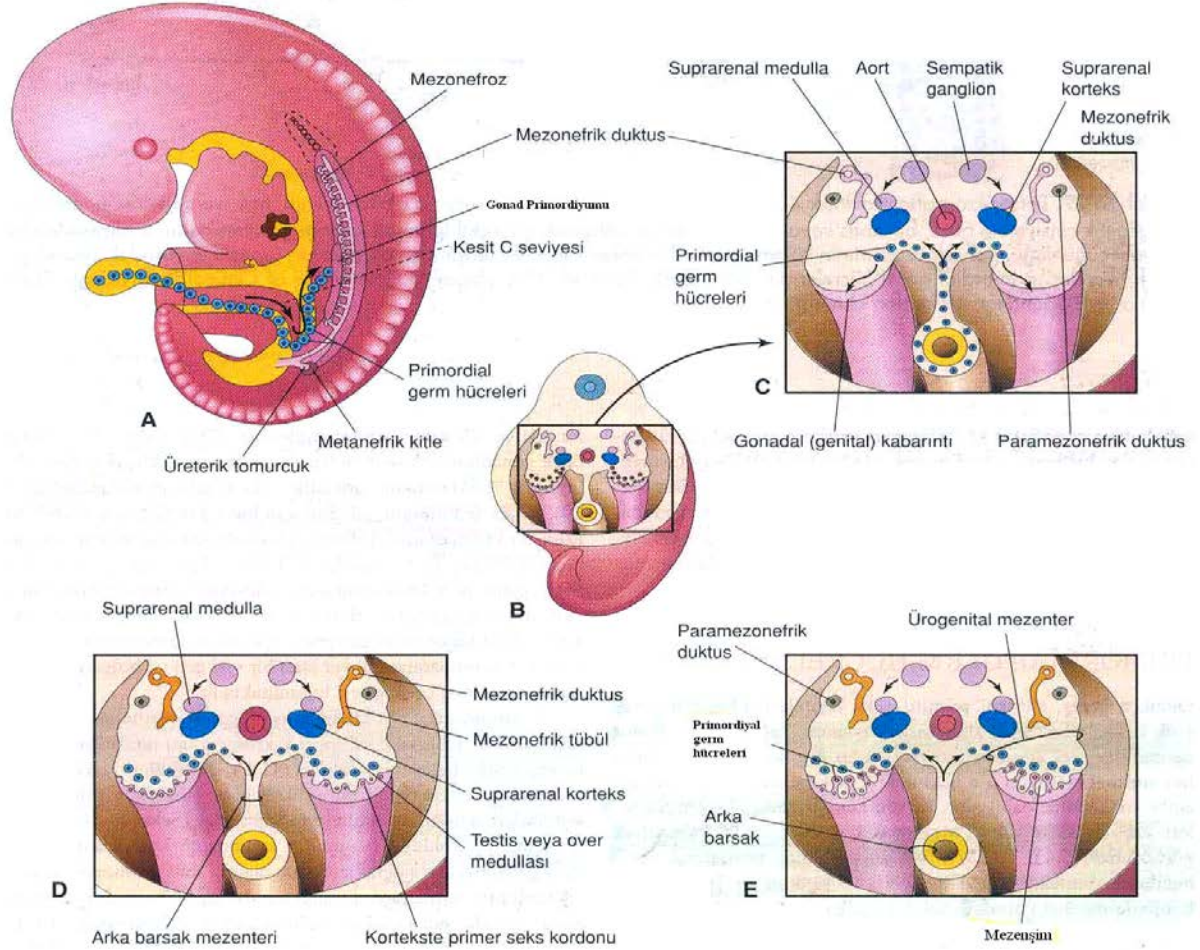
2.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak döllenme sırasında belirlenmiş olmasına karşın, gelişimin 7. haftasına değin gonadlar, erkek ya da dişi yapısal özelliklere sahip değillerdir. Gonadlar başlangıçta kölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş, bir çift uzunlamasına düzenlenmiş genital ya da gonadal kabartılar halinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına kadar genital kabartılar içinde germ hücreleri görülmez.

Primordiyal germ hücreleri, gelişimin 4. haftasında vitellus kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında görülmeye başlar. Sonbağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameoid hareketlerle ilerleyerek, 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşır ve 6. haftada da genital kabartıları işgal ederler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum ya da testise farklanmasında primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır. Primordiyal germ hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartıların epiteli çoğalır ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler. Burada, primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kolonlar oluşturulur. Erkek ve dişi embriyolarda primitif cinsiyet kordonları yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede, erkek ya da dişi gonadların birbirinden ayırt edilebilmesi olanaksızdır. Bu nedenle, bu evre farklanmamış dönem olarak adlandırılır. Bu gonada da farklanmamış gonad denir (Sadler, 2005).

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaştır. X kromozomları ovaryumun gelişimi için genler içerir; ovaryum oluşmasında otozomal bir genin rol oynadığı bilinmektedir. 10. haftaya değin, ovaryumlar histolojik olarak ayırt edilemezler. Primitif cinsiyet kordonları dişi embriyolarda erkekteki kadar belirgin değildir. Gonad taslağının medullasına kadar uzanırlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar.

Normalde rete ovarii ve primitif cinsiyet kordonları dejenere olarak ortadan kalkarlar ve yerlerini ovaryum medullasını oluşturan damarlı stromaya bırakırlar.



Şekil 2.1: 5-6 haftalık embriyoda primordiyal germ hücrelerinin göçü, farklanmamış gonadlar, mezonefrik ve paramezonefrik kanallar izlenmektedir (Moore and Persaud, 2009).

Erken fõtal dönemde kortikal kordonlar denilen ikinci cinsiyet kordonları, gelişmekte olan gonadın yüzey kõlom epitelinden başlayarak, alttaki mezenşime doğru gelişmeye başlar. Kortikal kordonlar kõlom epitelinin çoğalmasıyla kalınlaşırken, primordiyal germ hücreleri kordonların içine karışırlar. Yaklaşık 16. haftada bu kordonlar primordiyal folikül denilen ayrı hücre gruplarına bölünürler. Her grup ortada primordiyal germ hücrelerinden kõken alan bir oogonyum ve onun çevresinde, kortikal kordon epitelinden gelişen tek sıra yassı folikül hücrelerinden ovaryum folikülleri oluşur.

Ovaryum folikülleri biçimlenirken yüzey epiteliyle olan bağlantılarını yitirirler. Yüzey epiteli ile ovaryum korteksi arasında tunika albuginea denilen ince fibröz bir kapsül gelişir. Mezonefroz gerilerken, ovaryum ondan ayrılır ve mezovaryum denilen kendi mezoteliyle vücut duvarına asılır.

Fötal dönemde milyonlarca oogonyum aktif olarak mitozla çoğalır. Doğum öncesi, oogonyumların büyük bir kısmı dejenere olurken yaşayan oogonyumlar gelişerek primer oositlere dönüşürler. Primer oositlerin çoğu doğumdan önce dejenere olur. Doğumdan sonra oogonyum oluşmaz. Doğumdan sonra iki milyon kadar primer oosit kalır. Doğumdan sonra ovaryum yüzey epiteli düzleşir. Ovaryum hilusunda, periton mezoteli ile devam eder (Moore and Persaud, 2009)

2.1.2. Ovaryumun Anatomisi

Ovaryumlar, erkekteki testislerin karşılığı olan, iri badem büyüklüğünde, pelviste sağda ve solda kendilerine ait çukurcuklara (fossa ovarica) yerleşik iki organdır.

Embriyonel yaşamın başlangıcında ovaryumlar, intraabdominal yerleşimli iken, gelişimin ikinci ayından başlayarak aşağıya pelvis boşluğuna doğru inmeye (descensus ovarii) başlarlar. Bu süreç testisin inişine göre daha kısa sürede tamamlanır. Ovaryum bu inişle pelvis minorun duvarındaki fossa ovarica (Krause çukuru) denilen çukurlara yerleşirler (Gövsa, 2003). Fossa ovarica, A. İliaca externa ile A. iliaca interna arasında bulunur. Çukurun dibinde ve peritonun altından A.-V. obturatoria ile N. obturatorius geçer. İlk gebelikte ovaryumlar, uterus ile karın boşluğuna doğru çekilirler ve bir daha aynı yerlerine dönemezler. Çoklu doğumlarda ovaryumlar biraz daha aşağıda bulunur.

Tuba uterinanın arka ve alt kısmında bulunan ovaryumlar, lig. latum uteri içinde bulunurlar. Uzun eksenini hemen hemen vertikal yöndedir. Pembemsi-gri renkli olan ovaryumların yüzü ergenlik çağına değin peritonla örtülü olup düz ve parlaktır. Puberteden sonra periton özelliğini yitirir ve matlaşır. Ovulasyon ve doğurmaya koşut olarak da üzeri pürüklü bir görünüm alır (Arıncı ve Elhan, 2001).

2.1.2.1. Anatmik Bölümleri

Ovaryumun anatomik olarak facies lateralis ve medialis olarak üzere iki yüzü, marga liber ve margo mesoovaricus olarak iki kenarı ve extremitas tubaria ve extremitas uterina olarak iki ucu bulunur.

Facies medialis: Tuba uterina ile örtülüdür. Pelvis boşluğuna bakar. İnce bağırsak ve sigmoid kolonla komşuluktur. Mesosalpinx ile iç yüz arasında bursa ovarica denilen periton çıkması bulunur. Arka kısmı tuba uterinanın infundibulum parçasıyla komşuluktur.

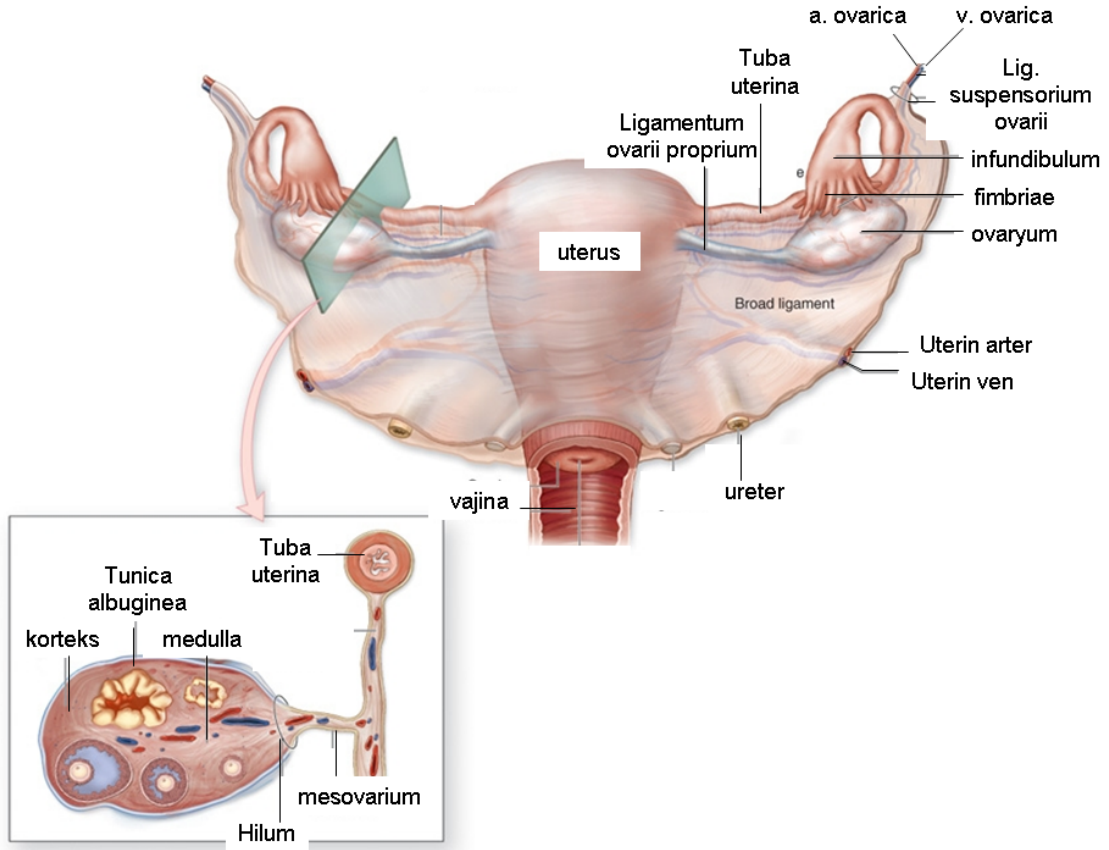
Facies lateralis: Pelvis duvarına bakan yüzdür. Bu yüz düze yakın içbükeylik gösterir. Facies lateralis, fossa ovarica denilen çukura, paryetal peritonla örtülü olarak yerleşmiştir.

Margo liber: Arka kenar ya da serbest olarak isimlendirilir. Bu kenar serbest ve hareketlidir. Ön kenardan daha içbükey ve kütündür. Margo liber, arteria iliaca interna, venae iliaca interna ve ureter ile komşuluk yapar.

Margo mesovaricus: Ön kenar olarak da bilinir. Bu kenara mesovarium denilen ve ovaryumu ligamentum latum uteri'ye bağlayan bir periton katlantısı tutunur. Bu tutunma çizgisine Farre-Waldeyer çizgisi denir. Mesovarium içinde yer alan damar ve sinirlerin, bu kenar üzerinde, organa girip çıktıkları yere hilum ovarii adı verilir.

Extremitas tubaria: Üst uçtan, tuba uterinanın infundibulum parçası ile komşudur. Ayrıca fimbriae tubae ve lig. suspensorium ovarii adı verilen, içinde ovaryuma ait ven, arter ve sinirlerin yer aldığı periton kıvrımı bulunur.

Extremitas uterina: Alt uçtur. Üst uçtan daha dardır. Ligamentum ovarii proprii denilen ve fibröz dokudan yapılmış olan bir bağ, ovaryumun alt ucundan uterusun dış köşesine tutunur. Bu ligament, ligamentum latum uterinin içinde kalır ve düz kas lifleri içerir.



Şekil 2.2: Ovaryumun anatomisi (Herbrandson, 2005).

2.1.2.1.a. Ovaryumun Arterleri: Aorta abdominalis'ten çıkan A. ovarica'lar 1. Lumbar vertebra hizasında aorta abdominalis'ten ayrılan A. ovarica, lig. ovarii suspensorium içerisinde ilerler ve mesovariuma gelir. Burada A. uterina'nın bir dalı olan ramus ovaricus ile anastomoz yapar. Hilum ovarii'den organa giren arter, medulla-korteks sınırında oluşturduğu pleksustan dağılan dallarıyla, foliküllerin çevresini saran zengin kapiller ağı oluşturur. Damarların çapı döngü evrelerine göre değişir. Damarlar foliküllerin gelişimi sırasında genişir. Ovulasyondan sonra ise daralır.

2.1.2.1.b. Ovaryumun Venleri: Arterleri izleyerek hilum ovarii'den çıkarlar. Venler ilk önce plexus ovaricus denen venöz bir ağ yaparlar. Buradan ayrılan venler birleşerek az bölümü plexus uterovaginalis'e, çoğu ise lig. ovarii suspensorium içerisindeki V. ovarica'ya açılırlar. V. ovarica, A. ovarica'larla birlikte uzanırlar. Sol taraftaki V. renalis'e, sağ taraftaki ise V. cava inferior'a açılır.

2.1.2.1.c. Ovaryumun Lenf Damarları: Kan damarlarıyla birlikte uzanırlar. Nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'lere açılırlar.

2.1.2.1.d. Ovaryumun Sinirleri: Plexus hypogastricus inferior (ya da plexus pelvicus) ve A. ovarica'nın çevresindeki plexusovaricus'dan gelir. Parasempatikleri 10. kafa çifti N. vagus'tan, sempatikleri ise N. splanchnicus minor ve bir kısım torakal medulla spinalis segmentlerinden gelir (Erkoçak, 1982).

2.1.3. Ovaryumun Histolojisi

Ovaryumlar, boyu yaklaşık 3cm, eni 1,5cm ve kalınlığı 1cm olan badem biçiminde yapılardır.

Ovaryumda üç katman gözlenir:

Epitel katı: Ovaryum yüzeyini örter. Bu kat tek sıra kübik epitelden yapılmıştır. Germinatif epitel olarak adlandırılır. Epitelin peritona bakan yüzünde mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyalar izlenir. Hücre sitoplazması mitokondriyonlar ve pinositoz veziküllerinden zengindir.

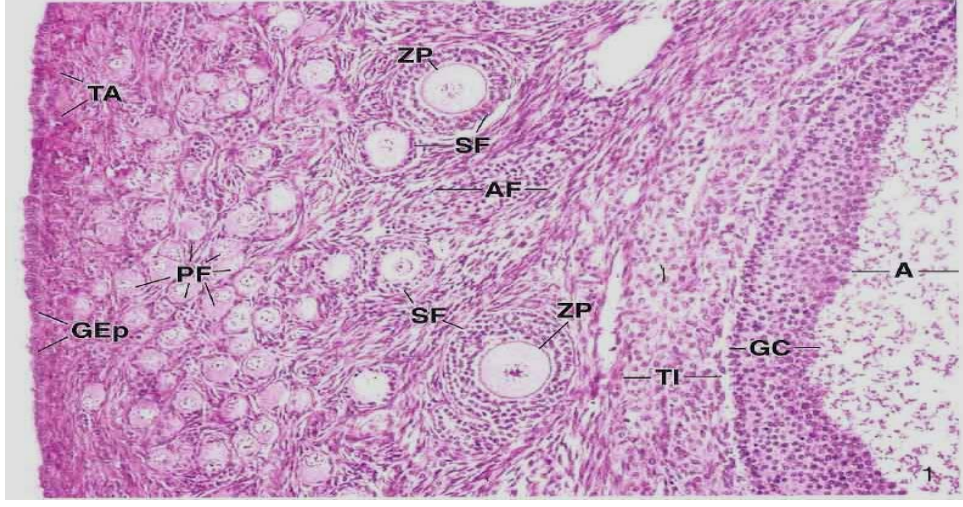
Tunika albuginea: Bağ dokusundan yapıli kattır. Yaş ilerledikçe kalınlaşır ve sertleşir. Az damarlı, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Kollajen lifler yüzeye paralel demetler oluştururlar.

Ovaryum stroması: Ovaryumun temel ve destek dokusudur. Ovaryumlar dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki bölgeden oluşur (Gövsa, 2003).

a.Korteks (cortex ovarii): Organın dış ve işlevsel bölümüdür. Çeşitli gelişim aşamalarındaki ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapılarını içerir. Korteks stromasında kollajen, elastik lifler ve lif ağları ile ince uzun mekik şeklinde stroma hücreleri bulunur. Stroma hücreleri fibroblastlardan ayrıcalı olarak hormon salgılayan teka interna hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir.

b. Medulla (medulla ovarii): Kan ve lenf damarları ile sınırlardan zengin, açık renkli iç bölgedir. Korteks ve medullayı yapısal olarak kesin sınırla ayırmak olası değildir. Medulla stroması kortekse benzer. Elastik liflerden zengin, düz kas hücreleri içeren fibroelastik gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Medullada ayrıca oksidasyon enzimlerini ve diğer enzimleri içeren hücreler bulunur; bunların sayıları yaşla artar, menopozda %80 oranında

bulunurlar. İntertisiyel hücreler poligonol şekilli, ortada yuvarlak çekirdeği ve belirgin çekirdekçikleri olan epitelooid hücrelerdir.



Şekil 2.3: Ovaryum dokusunun hematoksilen-eozin ile boyanmış kesiti. A: Antrum, GEp: Germinal Epitel, AT: Atretik Foliküller, TA: Tunika Albuginea, TI: Tunika İnterna, ZP: Zona Pellusida, PF: Primordiyal Foliküller, SF: Sekonder Foliküller, GC: Granüloza hücreleri (Ross, 2003).

Sitoplazmalarında küçük yağ damlacıkları bulunur. Luteinize hücelere benzedikleri için atreziye giden foliküllerin teka internalarından oluştukları düşünülmektedir. Bunlar ovaryum stromasında tek tek ya da gruplar halinde bulunurlar ve östrojen salgırlar. Bu hüceler, çok doğuran memelilerde fazladır ve intertisiyel bezler olarak adlandırılırlar; insanda menarşdan sonra azalır, erişkinde yok denecek kadar azdırlar. Hilus hüceleri, başka bir diğeri iri epitelooid hücre grubudur, küçük adacıklar şeklinde hilusta gözlenirler. Testisin Leydig hücelerine benzer ve sitoplazmalarında yağ damlacıkları, lipofuskin pigmenti, Reinke kristallerini içerir ve androjenleri salgırlar (Tekelioğlu M., 2002).

2. 1.3.1. Folikül Gelişimi

Ovaryum folikülleri bir ya da daha fazla folikül hücresi ya da granüloza hücresi katmanıyla çevrili bir oosit içerir (Junqueira and Carnerio, 2009). Ovaryumda histolojik olarak 3 ana tip folikül bulunur (Ross, 2003).

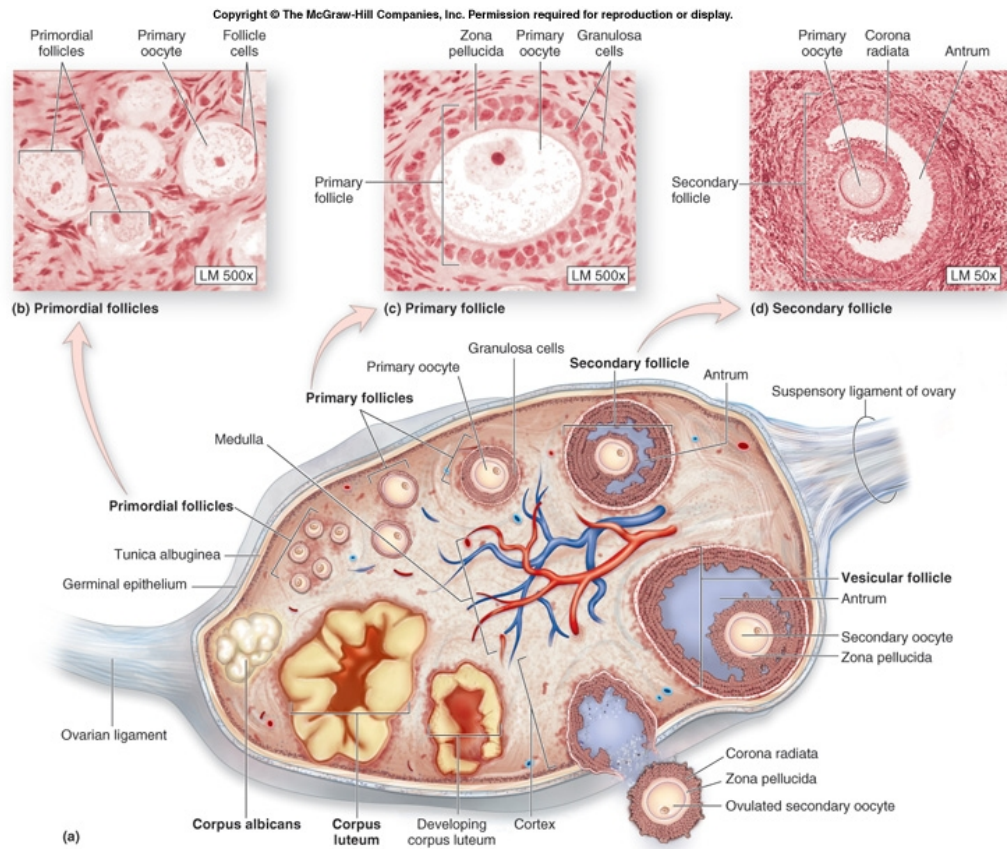
1- Primordiyal Folikül

2- Büyüyen Folikül

a- Primer Folikül

b- Sekonder (Antral) Folikül

3- Olgun (Graaf) Folikül



Şekil 2.4: Ovaryumun şematik yapısı (Herbrandson, 2005)

2.1.3.1.a. Primordiyal Folikül

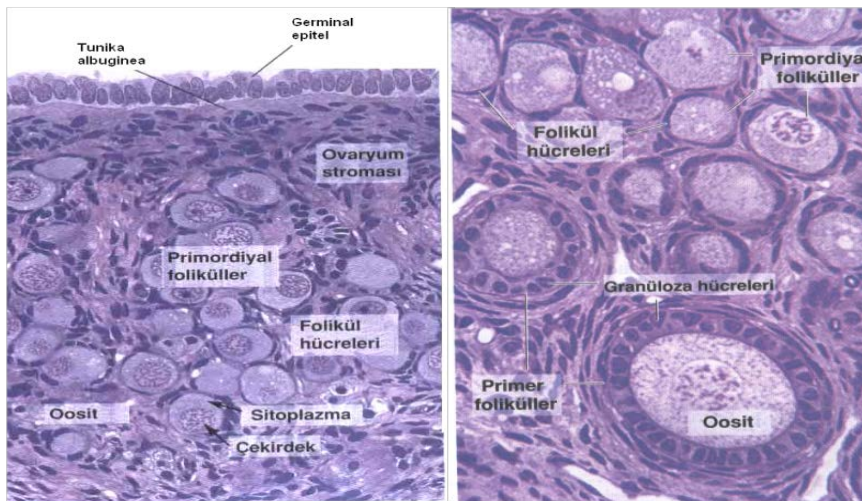
Primordiyal germ hücreleri 4. hafta başında yolk kesesi duvarında, allantoisin başlangıç kısmına yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanması sırasında yolk kesesinin dorsal parçası embriyo içine dahil olur ve primordiyal germ

hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler (Moore and Persaud, 2009). Primitif ovaryumdaki germ hücrelerinden oogonyumlar gelişirken, yüzey epiteli folikül hücrelerine farklılaşır (Nahirney and Ovale, 2009).

Gebeliğin 7. ayına ulaşıldığında, oogonyumların çoğu primer oositlere dönüşmüştür. Ancak, primer oositlerin çoğu atrezi olarak adlandırılan yıkımla yok olur. Sonuç olarak, pubertede ovaryumlar yaklaşık 300.000 oosit içerir. Her menstrüal siklusta genellikle tek bir oosit serbest bırakıldığı ve kadının doğurganlık çağı yaklaşık 30-40 yıl sürdüğü göz önüne alındığında yalnızca 450 kadar oosit atılmış olur. Diğer oositler ise atrezi yoluyla ortadan kalkar. Atrezi, kadının üreme çağı boyunca sürer ve 40-45 yaşlarında geriye yaklaşık 8000 oosit kalır (Junqueira and Carneiro, 2009).

Primordiyal foliküllerin büyümesi gonadotropin uyarımına bağlı değildir. Olgun ovaryumda primordiyal foliküller tunika albuginea'nın altındaki korteks stromasının içinde bulunur. Primordiyal folikülde oosit tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrilidir. Folikül hücrelerinin dış yüzeyi bazal lamina ile sınırlanmıştır. Bu aşamada oosit ve etrafını çevreleyen folikül hücreleri birbirlerine çok yakın konumda bulunur.

Folikül içindeki oosit yaklaşık 30 µm çapındadır, ökromatik kromatinli ve bir ya da daha fazla nükleolus içeren eksantrik konumlu bir nükleusa sahiptir. Oosit sitoplazması ooplazma olarak adlandırılır ve Balbiani cisimciği içerir. Balbiani cisimciği, Golgi membranları ve vezikülleri, endoplazmik retikulum (ER), birçok mitokondriyon ve lizozomların birikmesiyle oluşmuş bir yapıdır. Ayrıca, insan oositleri annülat lamel içerir ve birçok küçük vezikül, sferik mitokondriyonlar ile birlikte ooplazmaya dağılmıştır. Annülat lameller nükleer zarf benzeri bir membran yığından oluşur. Bu yığın her bir tabakası nükleer por yapısı içerir (Ross, 2003).



Şekil 2.5: Primordiyal ve primer foliküller (Junqueira and Carneiro, 2009)

2.1.3.1.b. Primer Folikül

Erişkin ovaryumunda folikül gelişimi, foliküllerin büyüme fazına girmek üzere folikül havuzunu terketmesi ile başlar. Bundan sonra, folikül hücrel proliferasyon ve farklılaşma yolunu içeren bir erken büyüme sürecine girer. Folikül büyümesi dişi üreme sürecinin herhangi bir evresinde hatta doğum sonrasında bile başlayabilir. Pubertede, ovaryan siklus ve gebelik boyunca sürerek doğurganlık döneminin ardından sona erer (Gougeon, 1996).

Primordiyal folikül büyüyen folikül evresine geldiğinde oosit, folikül hücreleri ve stromada değişiklikler meydana gelir. Başlangıçta oosit genişler ve etrafını saran folikül hücreleri çoğalır ve kübik hale gelirler. Folikül hücreleri kübik hale geldiğinde bu folikül primer folikül olarak adlandırılır (Ross, 2003). Tek katlı kübik folikül hücre katmanı içeren foliküller tek katmanlı (ünilaminer) primer folikül olarak adlandırılır. Folikül hücreleri çoğalmayı sürdürür ve çok katlı foliküler epiteli ya da granüloza tabakasını oluştururlar. Buradaki hücreler aralık bağlantıları (gap junction) aracılığıyla iletişim kurar ve bu durumdaki folikül çok katmanlı (multilaminer) primer folikül ya da preantral folikül olarak adlandırılır (Junqueira and Carnerio, 2009). Oosit büyüdükçe oosit ve folikül hücreleri arasında asidofilik, ışık kırıcı ve homojen bir tabaka olan zona pellusida belirir. Zona pellusida ışık mikroskopunda ilk olarak oositin etrafı kübik ya da silindirik folikül hücreleri ile çevrildiğinde ve oosit çapı 50-80 µm'ye ulaştığında görülür. Jel kıvamında ve glikozaminoglikan ve glikoprotein bakımından zengin bir yapıda olan zona pellusida büyümekte olan oosit ve etrafındaki folikül hücreleri tarafından sentezlenir (Larsen, 2001; Ross, 2003).

Granüloza hücreleri çoğalırken folikülün etrafındaki stroma hücreleri bazal laminanın hemen dışında teka adı verilen bir bağ dokusu hücre kılıfı oluşturur. Teka tabakası geliştikçe iki tabakaya farklılaşır. İç kısımda bulunan teka interna, kübik salgı hücrelerinden oluşur ve oldukça damarlanmış bir tabakadır. Tamamen farklılaşan teka interna hücreleri steroid üreten hücreler haline gelirler. LH reseptörü taşıyan bu hücreler, LH uyarımına yanıt olarak östrojen öncülü androjenleri salgırlar. Teka interna tabakası salgı hücrelerine ek olarak, fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük damarlardan oluşan zengin bir dolaşım ağı içermesiyle tipik bir endokrin organ görünümü sergiler. Teka eksterna ise dışta bulunan tabakadır ve düz kas hücreleri ile kollajen lif demetleri içerir. İki teka katmanı arasındaki sınır belirgin değildir. Buna karşılık, teka interna ve granüloza

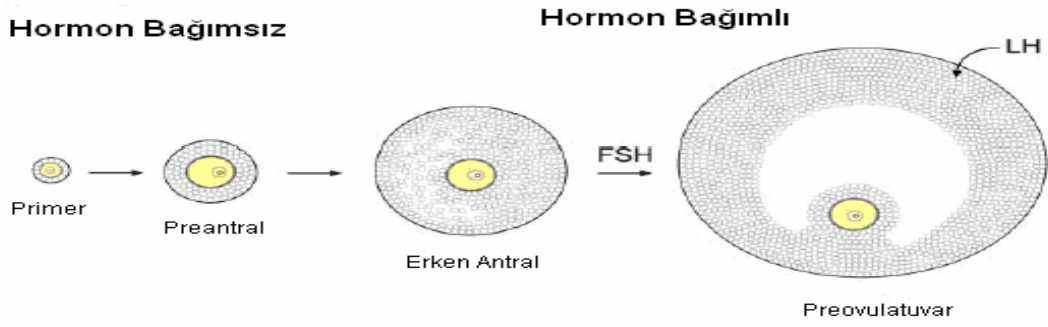
tabakası arasındaki sınır, hücrelerinin morfolojik olarak farklı olması ve iki tabaka arasında kalın bir bazal membran bulunması nedeniyle iyi seçilir (Kieszenbaum, 2006; Ross, 2003).

2.1.3.1.c. Sekonder Folikül

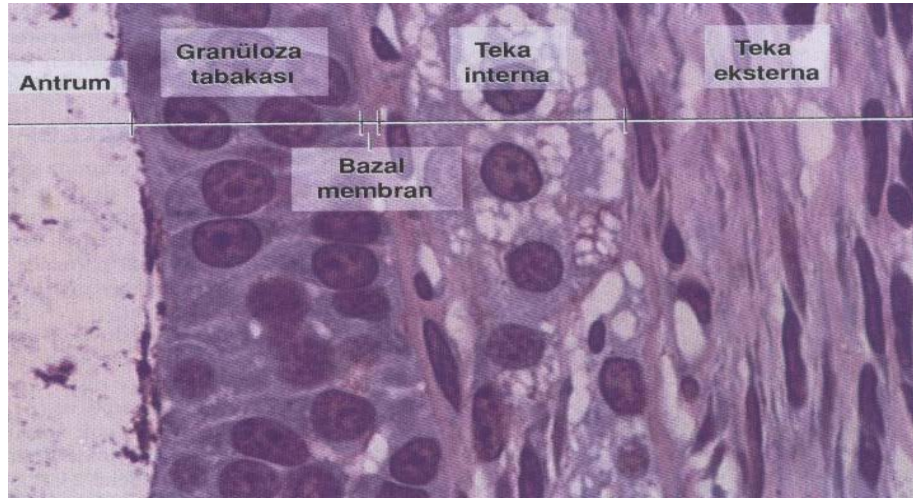
Foliküller esas olarak granüloza hücrelerinin boyut ve sayılarının artmasıyla büyürken kortikal bölgenin daha alt bölgelerine göç eder. Bu aşamada folikül hücreleri arasında sıvı (likör folikülü) toplanmaya başlar. Sıvıyı içeren küçük boşluklar birleşir ve daha büyük bir boşluk olan antrum oluşur. Bundan sonra, bu foliküller sekonder ya da antral folikül olarak adlandırılır. Folikül sıvısı plazma bileşenleri ve folikül hücreleri tarafından salgılanan ürünleri içerir. Folikül sıvısında glikozaminoglikan, steroid-bağlayıcı proteinler, hormonlar, büyüme faktörleri, antioksidanlarda dahil olmak üzere bazı proteinler ve yüksek konsantrasyonda steroidler bulunur (Junqueira and Carnerio, 2009). Eksantrik konumlu, yaklaşık 125 µm çapındaki oosit artık daha fazla büyümeyebilir. Büyümenin inhibisyonu, granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salınan, küçük, 1-2 kDa ağırlığındaki bir peptid olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından gerçekleştirilir. OMI yoğunluğu ile antral folikül büyüklüğü arasında doğrudan bir ilişki vardır.

Sekonder folikülün boyutu arttıkça granüloza hücre tabakası ile çevrili olan antrumun da genişliği artar. Granüloza hücre tabakası oositi çevreleyen bölge hariç her bölümde aynı kalınlıktadır. Oosit çevresinde ise granüloza hücrelerinin oluşturduğu kümeye kümülüs ooforus adı verilir. Kümülüs ooforusun oositi çevreleyen ve ona en yakın konumdan olan granüloza hücrelerine korona radyata adı verilir. Bu hücreler ovülasyonda oositle birlikte atılır. Korona radyata ile oosit aralık bağlantıları aracılığı ile temas halinde bulunur ve birlikte kümülüs oosit kompleksi olarak adlandırılırlar.

Belli bir çapa ulaşıp içinde antrum oluşan foliküller bu aşamadan sonra hormonlara bağımlı hale gelir ve gelişimlerine devam edebilmek için gonadotropinlere gereksinim duyarlar. İnsanda yeterli miktarda hormonla karşılaşan foliküller arasından seçilen bir folikül baskın hale gelerek gelişimini son aşamaya kadar sürdürür (Ross, 2003).



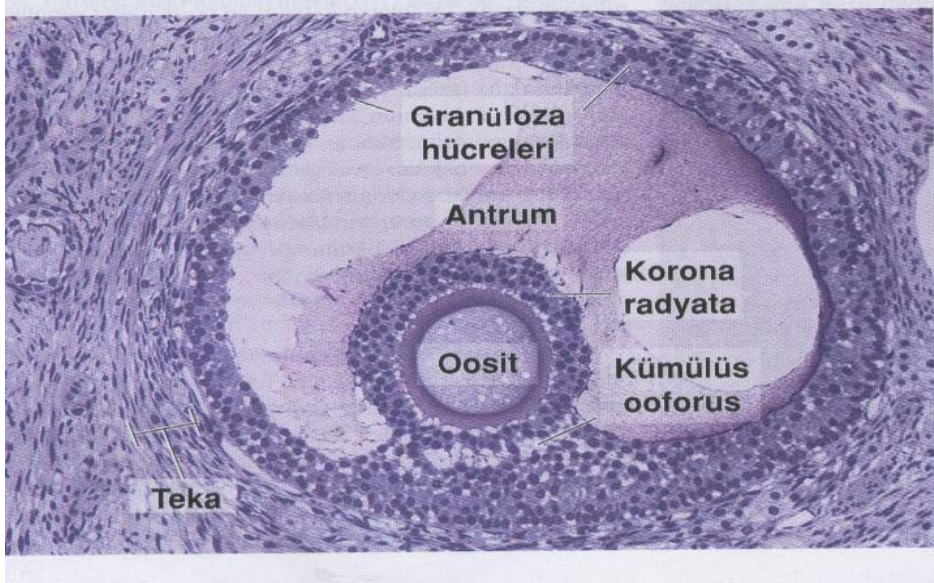
Şekil 2.6: Gelişim halindeki foliküller. Primer ve preantral foliküllerdeki oositler izole edildiklerinde mayoz bölünmeye devam edemezken erken antral dönemden itibaren mayozu devam etme yeteneği kazanırlar. Erken antral döneme kadar oositler hormon bağımsız olarak gelişirlerken bu dönemden sonra ileri gelişim için FSH'a ihtiyaç duymaktadırlar (Demeestere I et al, 2005; Mehlmann LM et al, 2005).



Şekil 2.7: Sekonder bir folikülde teka interna ve eksterna tabakaları (Junqueira and Corneiro, 2009).

2.1.3.1.d. Olgun (Graaf) Folikül

Graaf folikülü olarak da bilinen olgun foliküller 10 mm veya daha fazla çaptadır. Bu büyüklüklerinden dolayı ovaryumun yüzeyinde çıkıntı yaptıkları gözlenebilir. Antrum genişledikçe granüloza hücre tabakası incelir. Granüloza hücrelerinin arasındaki boşluk arttıkça ovülasyona hazırlık olarak kümülüs oosit kompleksi ile folikülün geriye kalan kısmı arasındaki bağlantı zayıflar.



Şekil 2.8: Olgun bir folikül (Graaf folikülü) (Junqueira and Carneiro, 2009)

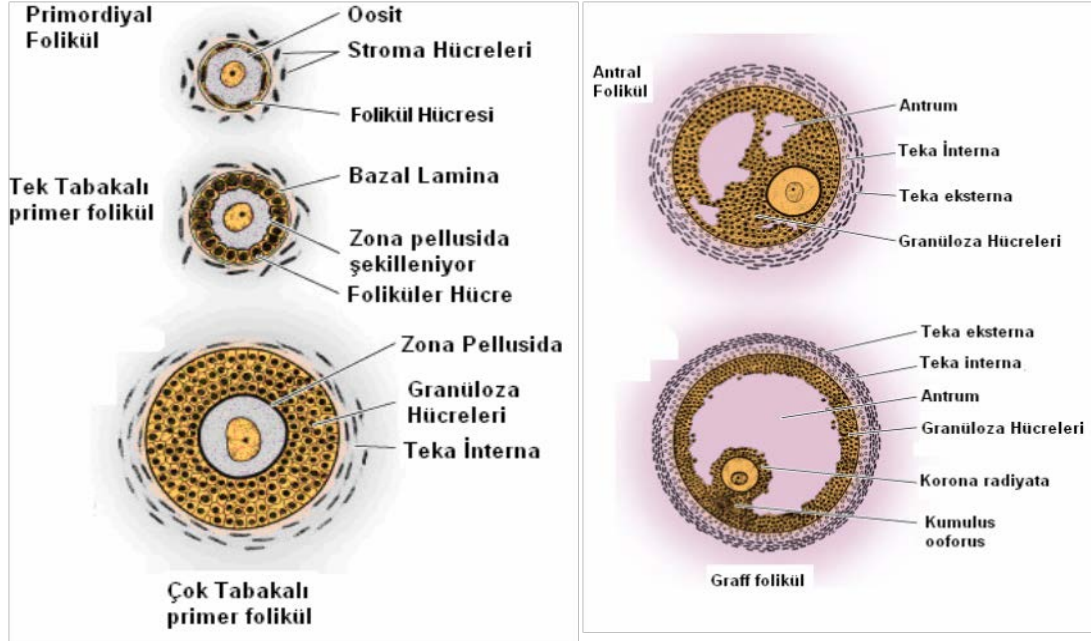
Granüloza tabakasının kalınlığı azaldıkça boşluk da genişler. Kümülüs ooforus kompleksinin folikülün geri kalan kısmıyla bağlantısı gevşer ve ovulasyona hazırlanır.

Teka tabakası daha göze çarpar hale gelir. Teka interna hücrelerinin içinde lipid damlacıkları birikerek bu hücrelere tipik steroid sentezleyen hücre görünümü kazandırır. İnsanlarda LH, teka interna hücrelerinde androjen üretimini tetikler. Östrojen öncülleri olarak görev alan androjenler buradan granüloza hücrelerinin düz endoplazmik retikulumlarına (ER) göç ederler ve FSH'ın etkisiyle östrojenlere dönüştürülürler. Artan östrojen seviyeleri granülozaların çoğalmasını ve dolayısıyla da folikülün genişlemesini artırır (Ross, 2003).

Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce adenohipofizden LH salınımı tetiklenir. Kandaki LH hormonu seviyesinde meydana gelen aşırı yükselme (pik) sonucu granüloza hücrelerindeki LH reseptörleri hassasiyetlerini kaybeder ve LH'a yanıt olarak daha fazla östrojen üretemezler. Oositin ilk mayotik bölünmesi bu dalga ile tetiklenerek durakladığı yerden devam etmeye başlar. LH yükselmesinden 12-24 saat kadar sonra gerçekleşen bu olay, oositin mayoz I'ı tamamlayarak ilk kutup cisimciğini oluşturması (maturasyonu-olgunlaşması), sekonder oositin oluşması ve ovulasyonun meydana gelmesi ile sonuçlanır.

Normalde her menstural döngüde bir ovaryumdaki bir folikül gelişimini tamamlar ve içindeki sekonder oositi atar. Her döngüde overler arasında dönüşümlü gerçekleştirilen bu olay zaman zaman, kendiliğinden veya *clomiphene sitrat* içeren ilaçlar gibi dış faktörler

nedeniyle her iki ovaryumda da aynı anda meydana gelebilir. Bu durumda eğer döllenme gerçekleşirse çoklu gebelikler ortaya çıkabilir (Ross, 2003).



Şekil 2.9: Çeşitli gelişim aşamalarında ovaryum folikülleri (Junqueira and Corneiro,2009)

2.1.3.2. Folikül atrezisi

Değişik gelişme aşamalarında % 98 folikül ovaryumda dejenere olur. Primordiyal ve primer foliküllerde atrezi oositin dejenerasyonu ile başlar. Daha sonra folikül hücreleri dejenere olur ve iz bırakmadan ovaryum stroması içinde kaybolur. Daha büyük foliküllerde önce granüloza hücreleri apoptozise gider, oosit uzun süre yaşar sonra zona pellusidası bozulur ve oosit dejenere olur. İlk folikül boşluğunu çevreleyen sonra bazal laminaya komşu olan granüloza hücreleri dejenere olur. Korona radyatasını kaybeden oosit folikül sıvısı içinde serbestçe yüzer. Kan damarları ve bağ dokusu bazal laminayı delerek granüloza hücreleri arasına girer. Fibrositler, makrofajlar ve kan hücreleriyle dolan folikül boşluğu büzülür, duvarları kıvrıntılı hale gelir. Bazal lamina parlak, dalgalı bir görünüm alır (camsı membran). Gerileyen korpus luteumdan camsı membran ve zona pellusidanın varlığıyla ayrılır. Teka interna hücrelerine benzerler ve bağ dokusuyla çevrilmiş gruplar yaparlar (intersitisyel hücreler). Her ay ileri gelişmeye giden birçok folikülden ancak biri ovulasyona uğrar, diğerleri dejenere olana değin östrojen sentezine katkıda bulunur. Atretik folikülün yerinde fibröz skar dokusu gelişir ve zamanla kaybolur (Tekelioğlu, 2002).

2.1.3.3. Folikül Gelişmesinde Etkili Bazı Faktörler

Doğal menstrüyal döngüsü olan kadınların folikül sıvısında beş tip insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGF-BP) bulunmuştur. Bunlar, granüloza hücreleri tarafından sentezlenir. IGF-BP 1, folikül gelişimi sırasında sabit kalır. IGF-BP 2,4 ve 5 atreziye giden foliküllerde, IGF-BP 3 ise dominant foliküllerde yüksek bulunmuştur. IGF-BP' lerin folikül seçimi ve atrezisinin düzenlenmesinde gonadotropin düzeylerini etkileyerek rol oynadığı düşünülmektedir (Tekelioğlu, 2002).

Folikül gelişimi, ovulasyon ve luteal fonksiyonlar gonadotropinlerle kontrol edilir. Fakat son yıllarda, lokal faktörlerinde folikül gelişmesinin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Tekelioğlu, 2002). Gonadotropinlerin endokrin etkilerine ek olarak granüloza hücrelerinden salınan inhibin, aktivin, folikülostatin de folikül olgunlaşmasında parakrin olarak etkilidir. Aktivin, FSH reseptörlerini artırır; folikülostatin ise aktivinin olduğu ortamda FSH reseptörlerinin sayısını azaltabilir. Endojen inhibin düzeyindeki artışlar FSH'ı baskılar. Menstrüyal döngünün luteal fazında LH inhibin sentezini artırır.

Oositlerden elde edilen ilk büyüme faktörü, GDF9' dur. Eksikliğinde primer foliküllerin oluşabildiği ancak bu aşamadan sonra folikül gelişiminin durakladığı ve bunun kısırlığa yol açtığı farelerde gösterilmiştir.

Bunlardan başka memelilerde folikül gelişimini başlatan faktörelere; Wilms tümörü supressor geni (WT1), retinoblastoma proteini (pRb), epidermal büyüme faktörü (EGF), vazoaaktif intestinal peptid (VIP), kit ligand (KL)' lar da eklenebilir (Tekelioğlu, 2002).

2.1.3.4. Oogenezis

2.1.3.4a. Doğum öncesi (prenatal) Olgunlaşma

Primordiyal germ hücreleri, genetik olarak dişi olan gonadlara ulaşır ulaşmaz oogonyumlara farklırlar. Ardarda geçirdikleri mitoz bölünmelerle çoğalan oogonyumlar 3. ayın sonunda kümeler halinde dizilerek yassı epitel hücreleriyle çevrelenirler. Bir küme içinde yer alan oogonyumların tümü olasılıkla tek bir primitif üreme hücresinden gelişir (Sadler, 2005).

Oogonyumların çoğunluğu mitozla bölünmeyi sürdürürken, bir kısmı bölünmesini I. mayoz bölünmenin profaz aşamasından durdurarak primer oositlere farklırlar. Bundan sonraki birkaç ay içinde oogonyumların sayısı hızla artar ve gelişimin 5. ayında ovaryum

içindeki üreme hücrelerinin sayısı en üst düzeye, yaklaşık 7 milyona ulaşır. Bu sırada hücre ölümü başlar ve çok sayıda oogonyum ve primer oosit atretik hale gelir. 7. ayda yüzeye yakın yerleşmiş olanlar dışında oogonyumların çoğu dejenere olur. Yaşayan primer oositlerin tümü, birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler ve her biri ayrı ayrı tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşmuş bir katmanla çevrelenir. Primer oosit, çevresindeki yassı epitel hücreleriyle birlikte primordial folikül olarak isimlendirilir. Primordiyal folikül belirgin bir bazal lamina ile çevre dokudan ayrılmıştır (Moore and Persaud; 2009).

2.1.3.4b. Doğum sonrası (Postnatal) Olgunlaşma

Doğuma yakın evrede primer oositlerin tümü birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten döneminde ve dinlenme halinde kalırlar. Primer oositlerin bu durumu puberteye kadar sürer. Bu süreçte, oositin olgunlaşması folikül hücrelerince salgılanan oosit olgunlaşmasını baskılayan madde (OMI) tarafından baskılanır. Doğumda ovaryumlardaki primer oositlerin sayısı yaklaşık 700.000 ile 2 milyon arasında değişir.

Puberteye kadar primer oositlerin büyük çoğunluğu atretik hale gelir. Puberte başlangıcında bu sayı 300-400.000'e düşer. Bir kadının üreme sürecinde bunların 450-500 kadarı ovulasyonla atılır. Diğerleri atretik hale geçer. Oositlerin bir bölümü olgunlaşmadan 40 yıldan daha uzun bir süre birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde bekler.

Puberteye ulaşıldığında ovaryumlar artık primordiyal foliküllerden beslenen bir folikül havuzuna sahip olmuştur (Gartner and Hiatt, 2007).

2.1.3.5. Ovulasyon

Menstrüal döngünün 14. gününde granüloza ve teka hücrelerinden salınan östrojen nedeniyle kandaki östrojen düzeyi artar. Bu nedenle hipofiz bezi ön lobundan FSH salınımı baskılanırken, LH salınımı artar. Kan LH düzeylerindeki artıştan sonra birkaç dakika içinde ovaryumun kan akımında bir artış görülür ve kapiller ve postkapiller venüllerden plazma proteinleri sızarak ödeme yol açar. Yerel olarak, prostaglandinler, histamin, vazopressin ve kolajenaz salınır. Granüloza hücreleri daha fazla hiyaluronik asit üretir ve gevşek bir hal alırlar. Folikül duvarının küçük bir kısmı, tunika albugineadaki kollajen yıkımı, iskemi ve bazı hücrelerin ölmesi nedeniyle zayıflar. Foliküler sıvı basıncındaki artış ve büyük olasılıkla düz kas hücrelerinin kasılmasıyla birlikte bu zayıflama, folikül dış duvarının yırtılması ve ovulasyona yol açar. Ovulasyonun yakın olduğunun bir göstergesi,

folikül yüzeyinde stigmanın görülmesidir; bu kan akımının durması sonucu folikül duvarının renginde ve saydamlığında oluşan yerel değişikliktir (Gartner and Hiatt, 2007; Junquera and Carneiro, 2009).

I. mayoz bölünme ovulasyondan hemen önce tamamlanır. Kromozomlar yavru hücreler arasında eşit olarak bölünür, ancak sekonder oositlerden biri sitoplamanın hemen hemen tümünü alırken diğeri birinci kutup cismi haline gelir. Birinci kutup cismi, çekirdek ile çok az miktarda sitoplazma içeren çok küçük bir hücredir. Birinci kutup cisminin atılmasından hemen sonra, oositin çekirdeği ikinci mayoz bölünmeye başlar; bu bölünme metafaz evresinde durur (Junquera and Carneiro, 2009).

Folikül duvarının yırtılmasıyla, oosit ve birinci kutup cismi, zona pellusida, korona radiyata ve bir miktar folikül sıvısıyla birlikte ovaryumu terk eder ve ovaryumun dışında gezinir. Tuba uterinanın ucundaki fimbriyaların hareketi ile oosit tuba uterinanın içine alınır (Gartner and Hiatt, 2007; Junquera and Carneiro, 2009).

2.1.3.6. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra yırtılan tersiyer folikülün duvarında kalan granüloza ve teka interna hücreleri yaşamlarını çevrelerindeki damarlar yoluyla sürdürürler. Graaf folikülünde ovulasyon sonrasında bir iç basınç düşmesi gerçekleşir (Gürgen, 2009). Folikül sıvısının boşalması ile folikül duvarı kıvrımlı bir hal alır. Folikül boşluğuna bir miktar kanama olur, bu kan burada pıhtılaşır. Bu yapıya korpus hemorajikum denir. Granüloza ve teka interna hücreleri yapısal değişikliklere uğrarlar. LH hormonunun etkisiyle hücrelerin sitoplazmalarında sarımsı bir pigment birikmeye başlar. Bu hücreler büyüyerek granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücrelerine dönüşürler. Granüloza lutein hücreleri yaklaşık 30 µm çapındadır ve steroid salgılayan hücrelerin yapısal özelliklerini gösterirler. Teka lutein hücreleri 15 µm çapında, daha koyu boyanan hücrelerdir. Bu hücrelerin oluşturduğu geçici endokrin bez yapısına “korpus luteum” (sarı cisim) denir. Bu yapı ovaryumun korteks kısmında bulunur, progesteron ve östrojen hormonu salgılar. Bu hormonların katkısıyla, uterus mukozasının embriyonun implante olabilmesine uygun duruma geldiği sekretuar ya da progestasyonel evreye girmesi sağlanır (Junquera and Carneiro, 2009; Gürgen, 2009).

2.1.3.7. Tuba Uterina (Ovidukt - Fallop tüpleri)

Tuba uterina fertilizasyonun olduğu ve zigotun ilk yarıklanmaya başladığı, yaklaşık 12 cm uzunluğunda ve çok hareketli kaslardan oluşan bir kanaldır. Infundibulum olarak adlandırılan ucu ovaryum yakınında periton boşluğuna açılır ve fimbriya adı verilen çok sayıda parmaklı uzantılardan oluşan bir saçaklanma gösterir; intramural bölümü ise uterus duvarını geçer ve uterusun iç boşluğuna açılır.

Tuba uterininin duvarı 3 katmandan oluşur: 1) lamina propria ile desteklenen mukoza, 2) kas tabakası, 3) seroza tabakası.

Mukoza, en çok ampullada olmak üzere uzunlamasına kıvrımlar içerir. İntramural bölümde katlanmalar azalarak lümeneye doğru uzanan küçük çıkıntılara dönüşür ve iç yüzeyi neredeyse pürüzsüz bir hale gelir. Mukoza tek katlı silindirik epitelden ve gevşek bağ dokusundan oluşan bir lamina propriadan oluşur. Epitel iki tip hücre içerir. Bunlardan birinde titretiler tüyler bulunurken, diğeri salgı yapıcı özellik gösterir. Titretiler tüyler uterusu doğru hareket ederek tuba uterininin yüzeyini örten ince kıvamlı sıvı tabakasının hareketini sağlar.

Ovulasyon anında tuba uterina aktif olarak hareket eder. Çok sayıda fimbriyadan oluşan saçaklı uç ovaryum yüzeyine doğru yaklaşır. Bu ovaryumdan serbest bırakılan oositin tubaya taşınmasını kolaylaştırır. Oosit, kasların kasılması ve silyalı hücrelerin hareketi ile desteklenerek tuba uterininin infundibulumuna girer. Tuba epitelinin salgısı oosit için besleyici ve koruyucu işleve sahiptir. Döllenenmediği takdirde, oosit yaklaşık 24 saat canlı kalır.

Dölllenme genellikle ampullada gerçekleşir ve döllenmeyle birlikte diploid kromozom sayısına ulaşılır. Bu aşamadan itibaren zigot adını alan döllenmiş oositte hücre bölünmesi başlar. Zigot yaklaşık 5 gün süren bir yolculuk ile uterusu taşınır. Tuba uterininin mukozasını kaplayan ince sıvı tabakasının kasılmaları, oositin ya da zigotun uterusu doğru taşınmasına yardım eder (Ross, 2003;Kierszenbaum, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.1.3.8. Uterus

Uterus armut şeklinde bir organ olup, bir gövde (korpus), aşağıda uterus boşluğunun daraldığı iç ağız (internal os) ile iç ağızdan aşağıya doğru uzanan silindirik bir yapı olan serviksten oluşur. Uterus gövdesinin kubbe biçimli kısmına fundus ismi verilir.

Korpus duvarı 3 tabakalıdır: 1) endometriyum, 2) miyometriyum, 3) adventisya ya da seroza.

Endometriyum; Epitel ile basit tübüler bezler içeren lamina propriadan oluşur. Bezler miyometriyuma yakın alt bölümlerinde bazen dallanmalar gösterir. Epiteli tek katlı silyalı ve salgılayıcı silindirik epiteldir. Uterus bezlerinin epiteli yüzey epiteline benzese de, bezlerde silyalı hücreler çok az ya da yoktur. Endometriyum işlevsel olarak iki tabakadan oluşur; 1) menstruasyon sırasında dökülen yüzeysel fonksiyonel tabaka ve 2) menstruasyon sırasında dökülmeyen ve menstruasyondan sonra yenilenecek olan fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturan bazal tabaka. Fonksiyonel tabakanın mikroskopik özellikleri, menstrual siklusun evrelerine göre deĐiŐiklik gösterir. Menstrual siklus yaklaşık olarak 28 gün sürer. Menstrual siklus birbirini izleyen üç evreden oluşur; ilki siklusun baŐlangıcı olan menstrual evre yaklaşık 4-5 gün sürerken sonraki evre olan proliferasyon evresi yaklaşık 9 gün sürer. Bu evre sırasında ovaryumda olgunlaŐan folik lleride üretilen östrojenin uyarıcı etkisiyle endometriyumun kalınlığı artar. Hem epitelde hem de lamina propriadaki hücrelerde mitoz görülür.   nc  olarak; ovulasyonun olduğu 14. güden sonra endometriyum yaklaşık 13 gün sürecek olan sekresyon ya da progestasyonel evreye girer. Bu evrede endometriyal bezler salgılama yapmaya başlar. Tübüler bezlerin dış sınırları d zensizleŐmeye ve kıvrılmaya, döŐeyici epitelde glikojen birikmeye başlar. Bez lümenini glikojen ve glikoproteinden zengin bir salgı doldurur. Sekresyon evresi korpus luteumda üretilen progesteron ve östrojen hormonları tarafından kontrol edilir.

Menstrual siklusun sonunda korpus luteumun gerilemesine bağlı olarak kandaki steroid hormonların azalması iskemik evreyi baŐlatır ve yaklaşık 1 gün sürer. Gebelik olmuŐsa, endometriyum lamina propriyasındaki stromal hücreler büyür ve artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipid ve glikojen depolar. Bu endometriyal değişikliklere desidual reaksiyon denir. Çünkü; endometriyumun fonksiyonel tabakası doğum sırasında desidua olarak dökülür.

Miyometriyum; Bağ dokusu ile ayrılmıŐ düz kas demetlerinden oluşan uterusun en kalın tabakasıdır. Düz kas demetlerini sınırları iyi belirlenemeyen dört tabaka oluşturur. Gebelik sırasında miyometriyum hem hiperplazi (düz kas hücrelerinin sayısında artış) hem de hipertrofi (hücrelerin boyutlarının artması) sonucu çok büyür. Gebelik sırasında uterusun kollajen içeriği önemli ölçüde artar. Gebelik sonrasında bazı düz kas hücrelerinde bozulmalar görülür, bazılarının boyutları azalır ve kollajenaz enzimi etkisiyle yıkılır.

Böylece uterusun boyutları gebelik öncesindeki yakını ölçülere iner (Ross, 2003; Kierszenbaum, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.1.3.9. Serviks Uteri

Serviks, uterusun altındaki silindirik kısımdır ve histolojik olarak uterusun geri kalan kısmından farklıdır. Yüzeyde mukus salgısı yapan tek katlı silindirik epitel bulunur. Serviks az sayıda düz kas lifi içerir ve esas olarak sıkı bağ dokusundan (%85) oluşur. Vajina lümenine doğru çıkıntı yapan serviksin dış kısmı ise çok katlı yassı epitel ile örtülüdür.

Serviks mukozası oldukça dallanmış, müköz servikal bezler içerir. Bu mukoza menstruasyon sırasında dökülmez. Serviksteeki salgılar oositin döllenmesinde önemli bir rol oynar. Ovulasyon sırasında müköz salgılar sulanır ve spermin uterusa girmesine olanak sağlar. Luteal fazda ya da gebelikte, progesteron düzeyleri müköz salgıları değiştirerek daha visköz bir hal almasına neden olur ve mikroorganizmaların geçişi engellenir. Doğumdan önce servikte görülen genişleme ise kolajenin yoğun olarak parçalanmasına ve bunun yol açtığı yumuşamaya bağlıdır (Ross, 2003;Kierszenbaum, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.1.3.10. Vajina

Vajina, duvar bezlerinden yoksundur ve üç tabakadan oluşur; mukoza, müsküler tabaka ve adventisya. Vajinanın lümeninde bulunan mukus, uterus boynundaki bezlerden gelir.

Erişkin bir kadında vajina mukozasının epiteli çok katlı yassı epiteldir. Hücreleri az miktarda keratohyalin içerebilir. Bununla birlikte tipik keratinleşmiş epitellerde olduğu gibi, hücrelerin keratin plaklarına dönüşmesi ile izlenen aşırı keratinizasyon burada görülmez. Östrojen uyarısıyla, vajina epiteli büyük ölçüde glikojen sentezleyip biriktirir. Vajinal hücrelerin dökülmesiyle bu glikojen vajina lümeninde depolanır. Vajinadaki bakteriler glikojeni dönüştürerek vajinanın genelde düşük olan pH'sından sorumlu laktik asidi oluşturur. Vajinadaki asidik ortam bazı patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu bir etki sağlar.

Vajina mukozasının lamina propriyası elastik liflerden çok zengin olan gevşek bağ dokusundan oluşur. Vajina mukozasında duyuşal sinir sonlanmaları neredeyse hiç

bulunmaz, bulunan birkaç çıplak sinir sonlanması ise muhtemelen ağrı duyusunu algılayan sinir liflerine aittir.

Vajinanın kas tabakası esas olarak longitudinal seyreden düz kas lifi demetlerinden oluşmaktadır. Özellikle en iç kısımda sirküler düz kas lifi demetleri de bulunur.

Müsküler tabakanın dış kısmında bulunan kalın elastik liflerden zengin sıkı bağ dokusu örtüsü olan adventisya, vajinayı çevre dokularla birleştirir. Vajinanın oldukça elastik olması vajina duvarındaki bağ dokusu içinde elastik liflerin bol miktarda bulunmasına bağlıdır. Bu bağ dokusunda yaygın bir venöz plexus, sinir demetleri ve sinir hücresi grupları vardır (Ross, 2003;Kierszenbaum, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.1.4. Dış Genital Organlar

Labia major; Vulva, vaginal açıklığın her iki yanında da yağ ve bağ dokudan oluşan iki geniş deri kıvrımıdır. Yağ ve ter bezleri içeren labia majörün dış kısmında kıllar vardır, iç kısmında yoktur. Bu kıvrımlar önde simfisis pubis üzerinde birleşerek, erişkinde üzeri kıllarla kaplı olan mons pubisi oluşturur.

Labia minor; Yağ dokusu ve kıl folikülü bulunmayan; ancak çok sayıda kan damarı, elastik lifler ve doğrudan melanin pigmenti içeren epidermise açılan yağ bezleri içerir. Labia major ve labia minorda pigmentasyon puberte ile birlikte başlar.

Himen; İç ve dış genital organların sınırını oluşturur. Vajinanın alt bölümünde bulunan ince bir fibröz membrandır. Dış yüzeyi keratinize çok katlı yassı epitel, iç yüzeyi ise glikojen içeren nonkeratinize çok katlı yassı epitel ile döşelidir.

Mons pupisin altında yerleşik klitoris, erkeklerdeki penisin eşdeğeri. Klitoris, körelmiş durumdaki glans klitoridis içinde sonlanan iki erektil cisimcik ile bir prepişyumdan oluşur ve çok katlı yassı epitel ile örtülüdür (Ross, 2003;Kierszenbaum, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.2. SCP 3 (Sinaptonemal Kompleks Protein 3)

Sinaptonemal kompleksler (SCs), mayotik profaz süresince homolog kromozomlar arasında şekil alan yapılardır. Bu yapıların kromozom eşleşmesi ve rekombinasyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir. SCs, enine filamentlerle (TFs) bağlanmış lateral elementler (LEs) gibi, her homolog boyunca bir tane bulunan, iki proteine benzer eksenden oluşurlar. (Heyting, 1996). Kemirgenlerde, lateral elementin (LEs) iki bileşeni ayırt edilmiştir; SCP2 (synaptonemal complex protein 2) ve SCP3 (Dobson et al., 1994; Lammers et al., 1994).

Merkezin ise iki bileşeni vardır; SCP1 (Meuwissen et al., 1992; Dobson et al., 1994) ve isimlendirilmemiş 48 kDa luk bir protein (Smith and Benavente 1992).

Mayotik profazın başlarında (leptoten) lateral element, kromozom boyunca oluşur ve büyük olasılıkla zigoten süresince kardeş kromatitler arasında enine filamentler bunlara bağlanır ve merkez bunların arasında oluşur. Pakiten aşamasında, SCs üçlü yapıları tarafından bütün uzunlukları boyunca homolog kromozomlarla bağlanırlar (sinaps). Daha sonra, diploten aşamasında SCs ler ayrılarak parçalara bölünürler ve homologlar arasında kiazma ortaya çıkar. SCs'in ayırt edilen bütün bu bileşenleri, mayotik profazdaki hücrelerin çekirdeğinde, örneğin; fare ve insan (Heyting, 1988; Offenberç, 1991; Smith and Benavente ,1992; Liu et al., 1996; Pousette, 1997) ve sıçan oositlerinde (Dietrich et al., 1992) belirli bir şekilde oluşur.

Gonadlardan testis ve ovaryum farklılaşmasına paralel zamanlarda 13,5 gün civarlarında fare embriyolarında germ hücrelerinden oosit ve prospermatogonya meydana gelir. Bu zamana kadar, primordiyal germ hücrelerinin davranışı ve görünüşleri oosit ve prospermatogonya öncüsü gibidir, dişi ya da erkeğe ait olup olmadıkları ayırt edilemez. Dişi germ hücreleri, yaklaşık 13,5 günde mayozun profaz safhasına girerler, primer oosit olarak isimlendirilirler; bunlar leptotene geçerler ardından pakiten, zigoten ve doğum civarında diploten basamağında kalırlar.

Anti-SCP3 antikorları ile antijenler, yaklaşık 13,5 günde hem erkek hem de dişi germ hücrelerinde floresan boyama ile gösterilmiştir. Sıçanların leptoten basamağındaki oositlerinde, SCP3 immünpozitif materyallerin benzer şekilde bir araya gelerek boyandığı gösterilmiştir (Dietrich et al., 1992), aynısı fare ve insan spermatositlerinde de gösterilmiştir (Schertan et al., 1996).

Sinaptonemal kompleksin lateral elementlerinin bileşenleri olan bu proteinler, mayotik profazın erken basamaklarında eksprese edilirler. Sonuçta, proliferasyon periyodunun sonundaki her iki cinsiyetteki mayoza girmeye hazırlanan primordiyal germ hücreleri, dişi ve erkeğin her ikisinde de SCP3 proteinini eksprese ederler.

Mayotik profaz I; sinaptonemal komplekslerin oluşumu (SCs), çift zincir kırılması (DSB), homologların rekombinasyonu ve DNA tamiri gibi birçok benzersiz özellik ihtiva eder. Bunların yanısıra, SCs evrimsel olarak korunan mayoz özel yapılarındandır. Homolog kromozomların sinapsisinde, kiazmata dağılımında ve kromozom ayrılmalarında merkezi bir rol oynarlar.

Birçok protein ve enzim, örneğin SCP1-3 (de Vries et al., 2005; Yang et al., 2006), SPO11 (Baudat et al., 2000; Romanienko and Camerini-Otero, 2000), DMC1 (Pittman et al., 1998; Yoshida et al., 1998) mayoz için çok önemlidirler ve bu mayotik genlerde ki bir bozulma farelerde infertiliteye ya da fertilitede azalmaya neden olur (Hunt and Hassold, 2002).

Dişi germ hücrelerinin gelişmesinin erken basamakları süresince ekspresyonu azalan DMC1 (Menke et al., 2003) ve SCP3 (Bullejos and Kopman, 2004) in vivo olarak mayoza girişte çok önemlidir. Germ hücrelerinin replikasyonu ile post natal yaşamdaki follikül oluşumu için oositler üretilir ve mayozun başlaması bazı genlerin ekspresyonunu gerektirir. SCP3 ekspresyonu mayoz başlangıç belirteci olarak sık sık kullanılır çünkü daha önceki çalışmalar SCP3 ve DMC1' in germ hücrelerinde mayozun pakiten ya da zigoten basamakları ile ekspresyonunun kısıtlı olduğunu göstermiştir (Yuan et al., 2000; Cohen and Pollard, 2001). Bütün bu basamaklar, oositte ilk mayotik duraksamanın gözlemlendiği geç diplotenden öncedir, mayoz özel proteininin sinaptonemal kompleksin axial lateral elementlerinin oluşumuna ihtiyacı vardır (Yuan et al., 2000). *Vasa* homolog ve bu mayotik genler postnatal memeli ovaryumunda neo-oogenesis için mükemmel belirteçlerdir.

2.3. STELLA

Memelilerin gelişiminde, primordiyal germ hücreleri (PGH), üreme hücrelerinin başlangıç popülasyonunu temsil ederler. PGH' ler gelişimin erken basamaklarında ekstra-embriyonik ektodermden gelen sinyallerin tetiklemesi ile ayrılırlar. Bu hücreler, kendilerini çevreleyen hücrelerden benzersiz gen ekspresyonları ile ayırt edilirler. Bunları tanımlamak için kullanılan yaygın genlerden bir tanesi de Stella'dır. Bu genler göç ve farklılaşmayı düzenler ve bu hücrelerin pluripotensiyi sürdürüp korumasını sağlarlar.

Stella, 150 amino asitlik gen kodundan oluşan bir proteindir. Germ hattına ek olarak, pre-implantasyon aşamasındaki embriyoların hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde tespit edilmiştir (Saitou et al., 2002). Protein, çekirdek ve sitoplazma arasında transfer sağlayan bir nükleer taşıma sinyaline sahiptir. N- terminali, SAP (SAF-A / B benzer etki alanı (domain), Acinus ve PIA) motifi, DNA-bağlayıcı etkisi kromozomal organizasyon içinde yer alan modüler domain içerir (Aravind et al., 2000). C- terminali, Stellanın RNA metabolizmasında rol aldığı düşünülen motif benzeri splicing faktörünü içerir. Buna ek olarak, Stella proteini, hem son derece basittir hem de RNA ve DNA'ya bağlanmayı sağlar (Aravind et al., 2000).

Bütün bunların ışığında Stella proteinin RNA sürecindeki kromozomal organizasyonda yer aldığı ve benzer diğer SAP-domaini (etki alanı) içeren proteinlerde olduğu gibi RNA sürecindeki kromatin bağlanması tarafından kromozomal organizasyonda rol aldığına inanılıyor (Nayler et al.,1998; Aravind et al., 2000; Saitou et al., 2002). Stellanın sitoplazmada herhangi bir fonksiyonu olmadığı düşünülüyor fakat burada depolanması inaktif kalmasını sağlıyor (Saitou et al., 2002).

Stella maternal bir faktör olarak geçer ve bu yüzden zigot ve oositlerde tespit edilir. Morula basamağının erken evresinde maternal olarak kalıtılan Stella ekspresyonu embriyonik ekspresyonun başlaması ile değişir ve bozulur (Payer et al., 2003). Stella ekspresyonu blastosist aşamasına kadar devam eder. sonrasında tekrar gözlenmez (Sato et al., 2002; Saitou et al., 2002). PGH'nin embriyonik 8,5 (E8,5) günde rektuma doğru göçünde, dişide E13,5 günde ve erkekte E15,5 günde germ hücre soyunda ekspresyonu aynen kalır (Sato et al., 2002). Ekspresyonu yenidoğan ovaryumundaki immatur oositlerde matur oosit oluncaya dek devam eder ancak Stella ekspresyonu erişkin testislerde tespit edilemez.

Stella, gelişimin erken dönemlerinde germ hücre için özel bir belirteç gibi görünmesine rağmen PGH' nin ortaya çıkması durumuna doğrudan dahil değildir (Payer et al., 2003; Bortvin et al., 2004).

2.4. GDF 9 (Growth Differentiation Factor 9)

Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan büyüme faktörlerinden biride GDF 9' dur. GDF 9, TGF- β (transforming growth factor superfamily) üyesidir. Birçok TGF- β üyesi, ovaryumdaki folliküler gelişimi ekstraselüler sinyal yolları ile düzenlerler. GDF 9 ve onun homoloğu Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15 ya da GDF-9B) TGF- β ailesinin iki üyesidir ve oosit tarafından salgılanıp, primordiyal follikülleri güçlendirip (Martins et al., 2008; Peng et al., 2010), granüloza hücrelerinin proliferasyonu sağlarlar (Gilchrist et al., 2006), farklılaşmada ve steroidlerin sentezinde rol oynarlar (Su et al. 2008; Orisaka et al., 2009). Bazı çalışmalar, GDF 9 ve BMP-15'in her ikisinde komşu granüloza hücreleri aracılığıyla folikül gelişimini düzenlediklerini göstermiştir (Gilchrist et al., 2006; Edwards et al., 2008).

Gerek farelerde gerekse insanlarda yapılan çalışmalarda, GDF 9, ovaryen folikülogenez için ihtiyaç duyulan önemli faktörlerdendir (Dong et al., 1996; . Pellicer et al., 2000). Yapılan bazı çalışmaların sonuçlarına göre, GDF 9 yetmezliğinin olduğu

durumlarda tek tabakalı primer foliküller aşamadan sonraki ileri foliküler gelişim aşamasında belirgin bir bloğun olduğu ve buna bağlı olarak infertiliteye neden olduğu saptanmıştır. Bu nedenle; GDF 9 *in vivo* somatik hücre fonksiyonları için ihtiyaç duyulan ilk oosit kaynaklı faktör olarak gösterilmektedir (Dong et al., 1996). Primordial foliküllerden matür folikülünün gelişimi hipofizer gonodotropinler ve overyen faktörlerle kontrol edilmektedir. Ovaryen başarısızlıktan dolayı olan infertiliteye, ovaryen fonksiyon kusurları veya gonodotropin salınımındaki fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Günümüzde insan ya da genetik olarak manipüle edilmiş hayvanlar kullanılarak ovaryen başarısızlıktan ya da yetmezliğin sebepleri araştırılmış ve bu durumdan, gonadlarda salgılanan ovaryen fonksiyon için esansiyel olan ve aralarında GDF 9'un da olduğu spesifik genlere ait defektler sorumlu tutulmuştur (Pellicer et al., 2000; Elvin et al., 1998; Luoh et al., 1997).

Zinn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ilginç olarak, ovaryen bozuklukların görüldüğü Turner Sendromlu hastaların oositlerinde GDF-9B/BMP-15 transkriptlerin eksprese olduğu ve bunların Turner Sendrom fenotipinde ovaryen bozukluklara yol açabileceği gösterilmiştir (Zinn et al., 1998).

Polikistik over sendromu (PCOS) ya da polikistik over (PCO) gibi bazı ovaryum hastalıklarında oositlerde GDF 9 azalmıştır (Teixeira Filho et al., 2002).

GDF 9 uygulanmış immatür sıçanlarda primer ve küçük preantral foliküllerin daha fazla olduğu fakat primordiyal foliküllerin azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın, GDF 9'un primordiyal folikülleri matürasyon için aktive etmesi sonucu geliştiği düşünülmüştür. GDF 9, folikül gelişiminin diğer basamaklarını etkilemez. Bunun tersine, FSH preantral folikül sayılarını artırırken primer ve primordiyal foliküllerin sayısını etkilemez. Bu da, FSH'nin temel etkisinin daha olgun foliküller üzerine olduğunu düşündürür. Bunun sonucu olarak, folikül gelişiminin erken evrede oosit kaynaklı uyarıların, sonraki evrede ise gonadotropinlerin baskın olduğu iki farklı aşamada gerçekleştiği düşünülür (Kumar et al., 1997; Yan et al., 2001).

2.5. Zona Pellusida Glikoproteini 3 (ZP3)

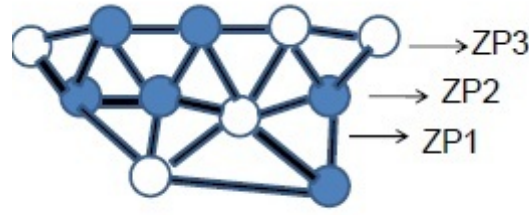
Tüm memelilerin yumurtaları zona pellusida denilen ince ekstrasellüler bir örtüyle sarılmıştır. Zp; implantasyon öncesi gelişim, fertilizasyon ve oogenez süresince önemli bir rol oynar. Memeli oositlerini, döllenmiş oositi ve gelişimin erken blastosist evresine kadarki embrioyu zona pellusida sarar (Wassarman, 1988). Fare zona pellusidası yalnızca

gelişen oositlerden sentezlenen 3 farklı fibriler glikoprotein içerir ve bu uzun fibriller bir araya gelerek bir matriks oluşturur (Jefrey et al., 1980).

Zp; döllenmiş oosite spermin bağlanmasını düzenler ve akrozom reaksiyonunu indükler. Zona pellusida döllenmiş yumurtaya başka bir spermin bağlanmasını da önler (Wassarman, 2005; Bogner et al., 2004). Zona pellusida, implantasyon öncesi gelişim süresince etkindir ve implantasyon öncesi embriyonun bütünlüğünü sağlar (Rankin et al., 2000).

Zona matriksi ilk olarak oosit ve etrafındaki granüloza hücreleri arasındaki boşlukta biçimsiz materyalin birikmesi şeklinde ortaya çıkar. Hemen ardından bu materyal uzun filamentler şeklinde birleşerek yüksek derecede geçirgen bir form haline gelir ve tamamen büyümüş fare oositinde kalınlığı 7µm'ye kadar yükselir (Philips and Shalgi, 1980). Zona pellusida esnektir, antikor, enzim ve küçük virüslere geçirgendir. Birbirine bağlı uzun fibrillerden oluşmuştur, indirgenmiş ajanlar, sıcaklık, asit veya bazlar tarafından çözünebilir. Zona pellusida glikoproteinlerinin non-kovalent etkileşimiyle fibriller bir arada tutulurlar (Dunbar et al., 1994; Gren, 1997).

Fare zona pellusidası ZP1, ZP2 ve ZP3 olmak üzere 3 glikoprotein içerir. İnsan zona pellusidası ise ZP1, ZP2, ZP3 ve ZP4 olarak adlandırılan 4 glikoproteinden oluşur. Fare ve insan zona pellusida glikoproteinlerinin polipeptidleri, farklı kromozomlar üzerinde bulunan tek-kopya genleri tarafından kodlanır. ZP2 ve ZP3 glikoproteinlerinin benzerliği farklı tür memelilerde iyi korunurken (~%65–98) ZP1 glikoproteinleri daha az korunur (~%40) (Wassarman et al., 2004; Epifano et al., 1995). Bu üç glikoprotein oogenezis süresince koordineli olarak sentezlenirler. Fare zona pellusida genlerinin ekspresyonu benzersiz olarak oogenezis sırasında gerçekleşir ve hücre bölünmesi olmadan gelişimleri düzenlenir. Büyüyen oosit, ovule olan yumurta ve bölünen embriyonun çevresindeki ekstraselüler matriks biçiminde salgılanırlar (Yanagimachi, 1981). Zona pellusidanın bilinen biyolojik fonksiyonu özel proteinlerine göre yorumlanır. Zona pellusidanın en büyük bileşeni zona kitlesinin %25 ini oluşturan Zp2' dir. Fertilizasyonun ardından Zp2 kimyasal olarak değişime uğrar ve fertilizasyondan sonraki polispermiyi engellemek için önemli rol oynar. Zona kitlesinin %25 ini oluşturan Zp3; sperm reseptör aktivitesi gösterir ve sperm yumurta etkileşiminde aracılık yapar (Florman et al., 1985). En az miktarda (%10) bulunan Zp1 proteini; Zp2 ve Zp3 ile çapraz bağ kurarlar (Greve et al., 1985). Aynı zamanda Zp1; büyüyen embriyonun 6. günde uterus duvarına implante olmadan önce yumurta kanalından geçerken korunması için gerekli dengeyi sağlar.



Şekil 2.10: Zona pellusida glikoprotein yapısı (home.anadolu.edu.tr/~hzeztino/Mol. Gel. Bio.2.pdf)

Zona pellusida kalınlığı çevrelediği oositin çapıyla doğru orantılıdır. İnsan ve fare zona pellusida glikoproteinleri tam gelişen ve gelişmeye devam eden oositler tarafından eş zamanlı olarak sentezlenir. Fare oosit gelişimi süresince protein sentezi yaklaşık 40 kat artar ve zona pellusida glikoprotein sentezi bu proteinlerin toplamının yaklaşık %5'i kadarını oluşturur (Litscher et al., 1999).

Zona pellusida glikoproteinleri fertilizasyon sürecine birkaç adımda katılır. Farelerin akrozom reaksiyonunda ZP3, sperm ekzositozunu indükleyici olarak ve sperm için reseptör olarak görev yapar (Lin et al., 2007; Salzman et al., 1983). Farelerdeki bulgulara göre, ZP3'e akrozomu sağlam olan sperm bağlanır ve akrozom reaksiyonu tamamlanır. Daha sonra sperm ZP2'ye bağlanır, zona pellusida delinir ve oosit plazma membranı erir. Sperm ve oositin füzyonu zona pellusida glikoproteinlerinin değişmesine neden olur ve serbest yüzen sperm zona pellusidaya bağlanamaz ve sperm zona pellusidayı eritemez (Rankin et al., 1999; Gook et al., 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Kocaeli Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (23.11.2010 ve 10/2-2010 sayı).

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda, daha önce çiftleşmemiş ve hiçbir deneye alınmamış, 18-26g ağırlığında 8-12 haftalık Balb/C ırk fareler kullanıldı. En az iki düzenli 5 günlük östrus siklusu geçiren toplam 25 adet dişi fare ve 5 adet erkek fare kullanıldı. Araştırmada kullanılacak dişi farelerden her gün vajinal smear alınarak östrus siklus takibi aşağıdaki gibi yapıldı.

3.2. Östrüs Takibi

Farelerde östrus siklusu postnatal 28-42. günlerde vajinal açıklığın gözlenmesiyle, vajinal smear yöntemi kullanılarak takip edilebilir. Yaklaşık 4-5 gün sürer.

Fare ve sıçanlarda, insanlardakine benzer olarak, östrus siklusu çeşitli hormonlar ile kontrol edilir. Östrus siklusu; proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) olmak üzere başlıca 4 fazdan oluşur. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürer. Yaklaşık iki gün süren diöstrus fazı boyunca smearda farklı hücreler gözleendiğinden, diöstrus 1 (D1) ve diöstrus 2 (D2) olmak üzere iki alt faza ayrılır. Siklusun düzenliliği, aydınlık-karanlık siklusunun kontrolü altındadır.

Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarının döngüsel değişimleri vajinal epitelin histolojik görünümünde belirgin değişiklikler meydana getirir. Prolaktin, LH ve FSH proöstrus fazının akşam saatlerinde yükselmeye başlar. Östradiol seviyesi metöstrusta artmaya başlar, proöstrus fazında pik yapar ve östrus fazında tekrar bazal seviyeye ulaşır. Progesteron sekresyonu metöstrus ve diöstrus fazları süresince yüksektir, diöstrusun ardından azalır. Progesteron değeri ikinci pik seviyesine proöstrus fazının sonunda ulaşır. Bu hormonal etki ile proöstrus ve östrus fazında ovaryumda folikül gelişimi, östrus fazının ortalarında ovulasyon, metöstrus fazında korpus luteum oluşumu gerçekleşir. Diöstrus fazı ise dinlenme fazıdır.

İlk defa 1917'de Stockard ve Papanicolou tarafından, *guinea pig*'lerde başlayan östrus siklusu çalışmalarından bugüne kadar, farklı memeli türlerinde östrus aşamalarını

belirlemek için kabul edilen yöntem 'vajinal smear'dır. Bu yöntem, vajinal duvardan sürüntü alınması ya da vajinal yıkama sonucu elde edilen preparatlar üzerinde, her bir faz ile ilintili hücre tiplerinin (epitelyal hücre, kornifiye hücre, lökositler) histolojik olarak tanınması esasına dayanır. Bu yöntem canlı hayatta iken, tekrarlayan sıkluslara ait gözlemler için güvenilir bir kayıt sağlar. Ayrıca, hayvanlarda ovulasyon zamanı, kızgınlık dönemi (davranışsal östrus) ve gebeliğin tespiti için de kullanılan pratik bir yöntemdir.

Proöstrusta, epitel üç tabakadan oluşur. Dış tabaka, az ya da çok mukus içeren, piknotik nükleuslu hücrelerden oluşur. Bunun altında yer alan stratum granülozum, östrus fazının başlamasıyla birlikte stratum korneuma dönüşür. Üçüncü tabaka stratum germinativum'dur. Yaklaşık yedi hücre tabakası kalınlığındadır. Proöstrus süresince ve erken östrusta dış tabaka lümeneye dökülür ve karakteristik nükleuslu hücre smearı verir. İleri proöstrus ve devamında östrus hücreleri kornifiye tabakadan ayrılırlar.

Metöstrusun başlaması tüm tabakanın dökülmesi ile karakterizedir. Vajinal smearde de kornifiye hücre miktarı artar.

Diöstrus-1'de nükleuslu hücre miktarı artar. Bu, dökülme işleminin sonlandığını gösterir. Stratum germinativumun birkaç süperfasyal tabakasında ise şiddetli lokosit infiltrasyonu olur ve smearde de oldukça fazla lökosit görülür. Süperfasyal tabakanın dizilimi sonucunda diöstrustaki vajina epiteli sadece bir hücre tabakası içerir.

Diöstrus-2'de stratum germinativumda aktif büyüme başlar ve proöstrus ile birlikte stratum granülozum yüzeyin altında pek çok hücre tabakası içerir ve böylece siklus tamamlanır.

Çalışmamızda; vajinal smear örneği almak için vajina etrafı alkollü pamuk ile temizlendi ve alkolsüz pamuklu çubuk ile vajinal smear alındıktan sonra lam üzerine yayma yapıp preparatlar metilen mavisi ile boyandıktan sonra incelendi. Farelerde vajinal smearde gelişim dönemine göre uygun olan dişi fareler erkek fareler ile çiftleştirilmek üzere kafeslere yerleştirildi.

3.3. Deney Grupları

Çalışmamızda seksüel olarak matür 8-12 haftalık 25 adet dişi fare ve 5 adet erkek fare kullanılarak düzenli östrus siklusuna sahip olan dişi farelerin, erkek fareler ile çiftleşmesi sağlandı. Elde edilen yavru farelerden dişi olanlar 3 ayrı çalışma grubu için ayrıldı.

3.3.1. 1.Grup: 10 Günlük Grup (n= 9)

Seksüel olarak matür, en az 2 düzenli 5 günlük östrus siklusuna sahip 8 haftalık iki adet dişi fare ile 12 haftalık bir adet erkek fare çiftleşmeleri için bir gece aynı kafeste bırakıldı. Ertesi sabah erkek fare, dişi farelerin yanından ayrıldı. Dişi farelerden smear alınarak lamlara yayma yapıldı ve metilen mavisi ile boyanarak lamda spermatozoa gözlenmeye çalışıldı. Spermatozoa gözlenmesi durumunda gözlenen gün hamileliğin 0. günü olarak kabul edildi. Yaklaşık 21 günlük hamileliğin ardından doğan dişi fareler 10 günlük olana kadar büyütüldü. Büyüyen dişi fareler 10 gün sonunda sakrifiye edilerek ovaryumlardan bir tanesi immünohistokimyasal çalışmalar için diğeri ise Western blot ya da RT-PCR (Revers-Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniklerinden bir tanesini uygulamak amacı ile tüplere konulup sıvı azot içerisine aktarılarak saklandı.

3.3.2. 2.grup: 1 aylık grup (n= 8)

Seksüel olarak matür, en az 2 düzenli 5 günlük östrus siklusuna sahip 8 haftalık iki adet dişi fare ile 12 haftalık bir adet erkek fare çiftleşmeleri için bir gece aynı kafeste bırakıldı. Ertesi sabah erkek fare, dişi farelerin yanından ayrıldı. Dişi farelerden smear alınarak lamlara yayma yapıldı ve metilen mavisi ile boyanarak lamda spermatozoa gözlenmeye çalışıldı. Spermatozoa gözlenmesi durumunda gözlenen gün hamileliğin 0. günü olarak kabul edildi. Yaklaşık 21 günlük hamileliğin ardından doğan dişi fareler 1 aylık olana kadar büyütüldü. Büyüyen dişi fareler 1 ay sonunda sakrifiye edilerek ovaryumlarından bir tanesi immünohistokimyasal çalışmalar için diğeri ise Western blot ya da RT-PCR tekniklerinden bir tanesini uygulamak amacı ile tüplere konulup sıvı azot içerisine aktarılarak saklandı.

3.3.3. 3.grup: 2 aylık grup (n= 8)

Seksüel olarak matür, en az 2 düzenli 5 günlük östrus siklusuna sahip 8 haftalık iki adet dişi fare ile 12 haftalık bir adet erkek fare çiftleşmeleri için bir gece aynı kafeste bırakıldı. Ertesi sabah erkek fare, dişi farelerin yanından ayrıldı. Dişi farelerden smear alınarak lamlara yayma yapıldı ve metilen mavisi ile boyanarak lamda spermatozoa gözlenmeye çalışıldı. Spermatozoa gözlenmesi durumunda gözlenen gün hamileliğin 0. günü olarak kabul edildi. Yaklaşık 21 günlük hamileliğin ardından doğan dişi fareler 2 aylık olana kadar büyütüldü. Büyüyen dişi fareler 2 ay sonunda sakrifiye edilerek ovaryumlarından bir tanesi immünohistokimyasal çalışmalar için diğeri ise Western blot ya

da RT-PCR tekniklerinden bir tanesini uygulamak amacı ile tüplere konulup sıvı azot içerisine aktarılarak saklandı.

3.4. Doku Takibi

- Fiksasyon (12-24 saat)
- Akarsuda yıkama (4-12 saat)
- %70 Etil Alkol (1 gece bekletme)
- %80 Etil Alkol (2 saat)
- %90 Etil Alkol (2 saat)
- %100 Etil Alkol (2 saat)
- Ksilol çalkalama (1-2 dakika)
- Ksilol (1/2 saat)
- Ksilol (1/2 saat)
- Ksilol+Parafin (60-65 °C etüvde 1 /2 saat)
- Parafin (1 gece bekletme)
- Parafin gömme

3.5. İmmünohistokimya

- Her bir doku bloğundan mikrotom ile alınan 5µm'lik seri kesitlerin ksilolde 2x10 dakika deparafinizasyonu sağlandı.
- Rehidrasyon amaçlı %100, %90, %80 ve %70 lik alkollerde 10'ar dakika bekletildi.
- Absolu methanol içindeki %3 lük H₂O₂ içerisinde 10 dakika bekletildi.
- Preparatlar akan soğuk suda 10 dakika yıkandı ve PBS (phosphate buffered saline) içerisinde 10 dakika bekletildi.
- Daha sonra preparatlara pappenle (İnvitrogen) havuz oluşturuldu ve üzerlerine preblocking buffer eklenerek 30 dakika bekletildi.
- Kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırılan preblocking bufferın ardından blocking buffer (İnvitrogen; Histostain *Plus* Ref/ Cat No: 85-9043, Reagent-A- non immun buffer) eklenerek 15 dakika bekletildi.
- Miktarı üretici tavsiyesine göre belirlenen %1 BSA'lı (Bovine Serum Albumine) buffer one ile dilue edilmiş birinci antikordan Stella (M-150) (sc-67249), ZP3 (C-20) (sc-23717), GDF9 (C-20) (sc-7407) ve SCP3 (K-13) (sc-33875) eklenerek oda

sıcaklığında, nemli ortamda 12-24 saat kadar inkübe edildi. Antikorların hepsi Santa Cruz, USA firmasından temin edildi.

- Süre sonunda PBS ile 2x10 dakika bekletildi.
- Sonrasında üreticinin tavsiyesine uygun olarak PBS ile dilue edilen ikinci antikorlardan donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020) veya goat- anti rabbit IgG-HRP (sc-2004) eklenerek 30 dakika bekletildi.
- Ardından PBS ile 2x10 dakika ve
- Reagent C (Streptavidin- Peroksidaz), (İnvitrogen Histostain *Plus* Ref/ Cat No: 85-9043) ile 15 dakika muamele edildi.
- Tekrar PBS de 3x5 dakika bekletildi.
- Ardından DAB solüsyonu (Zymed[®] DAB PLUS Substrate Kit, Ref/ Cat No: 00-2020) 3-5 dakika kadar uygulandı.
- Sonrasında distile suda 2x5 dakika kadar yıkandı
- %70, %80, %90 ve %100' lük alkollerde 5'er dakika bekletildi.
- Ksilolde 2x5 dakika kadar beklemesi sağlanarak entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

3.6. Revers – Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

3.6.1. RNA İzolasyonu

Dokudan RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) kiti kullanılarak üreticinin tavsiyesine uygun olarak yapıldı. Örneklerin bulunduğu tüplere 600 µl RLT (Lökosit liziz) tamponu eklenerek Glas-Col marka homojenizatörde parçalanması sağlandı. Karışım 3 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. RNeasy spin kolonun üzerine 600 µl örnek ve 600 µl %70 etanol eklenerek 10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilip süpernatant atıldı. Kolona bağlanan örnekler DNaseI ile muamele edildi. Daha sonra karışımın üzerine 350 µl RW1(yıkama) tamponu eklendi ve 10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Üzerine 80 µl DNase I eklenerek 15 dakika oda ısısında bekletildi Süpernatant atılarak karışım 500 µl RPE (yıkama) tamponu ile 1 kere 10000 rpm'de 30 saniye, 2. kere 500 µl RPE eklenerek 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. RNeasy kolonu, süpernatanın kolona temas etmemesi sağlanarak tüpten dikkatlice ayrıldı ve kolon 1 dakika da yüksek hızda çevrildikten sonra temiz toplama tüpüne alındı ve RNA 30 µl RNase içermeyen su ile kolondan indirildi.

3.6.2. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'dan cDNA sentezi ticari olarak satılan RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, EU) kiti kullanılarak yapıldı. Reaksiyon tüpü buz üzerinde tutularak aşağıdaki reaksiyon kuruldu.

Çizelge 3.1: cDNA reaksiyon tüpü içeriği

dH ₂ O	5µl
5X Reaction Buffer	4 µl
dNTP Karışımı 10 mM	2 µl
Random Hexamer Primer 100 µM (0.2 µg/µl)	1 µl
Oligo (dT) ₁₈ Primer 100 µM (0.5 µg/µl)	1 µl
RNA	5µl

Kurulan reaksiyon 90°C'de 1 dakika bekletildi ve buz üzerine alındı. İçerisine;

RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µl)	1 µl
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1 µl

eklenerek reaksiyon tüpü 42°C'de 3 saat bekletildi.

3.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kuruluşu

cDNA sentezi sonrası tasarlanan primerler kullanılarak hedeflenen gen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonu için TC-3000 Personal Thermal Cycler (Techne, ABD) cihazı kullanıldı.

Tasarlanan primerler üreticinin 100 uM değer tarifine göre steril su eklenerek sulandırıldı. Reverse ve forward primerlerin her birinden 10 µl alarak 90 µl distile suyun bulunduğu tüplere eklenerek primerler dilue edildi.

Her bir PCR reaksiyonu için;

Çizelge 3.2: PCR reaksiyonu içeriği

Long Tag DNA polimeraz reaksiyon tamponu	2.5 µl
dNTP karışımı 10 mM	1.5 µl
MgCl ₂	1.5 µl
Sentezlenen cDNA	2.0 µl
dH ₂ O	16.25 µl
Forward primer	0.5 µl
Reverse primer	0.5 µl
Long Tag DNA polimeraz	0.25 µl

karışımı kullanıldı.

3.6.4. Primerler ve İşlem

GDF 9	Reverse Primer	: GGCAGAGTTGTTTCAGAGTGTATAGCAAG
GDF 9	Forward Primer	: TGGAGCCAGTGAAAATGTGGAGTC
ZP 3	Reverse Prime	: TCGTCATCTGCACCCTGCTGC
ZP 3	Forward Primer	: CAGTGGGGTCCTCATCACCTGTG
SCP 3	Reverse Primer	: CAAACTCTTTATGAACTGCTCGTGTATCTG
SCP 3	Forward Primer	: GAGCCGCTGAGCAAACATCTAAAG
STELLA	Reverse Primer	: TGGCTCACTGTCCCGTTCAAACCTC
STELLA	Forward Primer	: GACCCAATGAAGGACCCTGAAACCTC

PCR, 35 amplifikasyon döngüsü olacak şekilde ayarlandı.

94 °C' de 5 dakika	}	35 döngü
30 saniye 94 °C' de denatürasyon		
30 saniye 57 °C' de yapışma		
45 saniye 72 °C' de uzama		
72 °C' de 5 dakika		

Oluşan PCR ürünü agaroz jelde görüntülendi.

3.6.5. Agaroz Jel Elektroforezi

40 ml TAE (Tris Asetik Asit EDTA) içerisine 0,4 g toz agaroz eklenip mikrodalga fırın içerisinde partikül kalmayana değin kaynatıldı. Partikül kalmadığından emin olunduktan sonra oda sıcaklığında bir süre soğumaya bırakıldı. Ardından zerine 2,5 µl EtBr (Etidyum Bromür) eklendi karışım tanka döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Polimerleşme sağlandıktan sonra tanktaki jelin üzerine bir miktar TAE tamponundan eklendi.

Bir petri kabına örnek sayısı kadar boya damlacığı damlatıldı her bir damlacığın üzerine 5µl kadar örnekten ilave edilerek karışması sağlandı. Eşit miktarda hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendi. Sistem kapatıldı ve rnekler 120V'da 40 dakika yürütüldü. GeneLine Image SCI Image Analysis System cihazı ile görüntülendi. Oluşan DNA bantları moleküler ağırlık belirtecinin bantları ile karışlaştırılarak değerlendirildi.

3.7. Western Blot

3.7.1. Protein İzolasyonu

Doku rneklerinin bulunduğu tüpler işlem sırasında buz üzerinde tutuldu. Örnekler buldukları tüpten çıkartılarak falkon tüplere aktarıldı ve soğuk PBS ile hafifçe çalkalandı. Falkon tüpten penset yardımıyla çıkartılan doku örnekleri cam tüp içerisine alındı ve içerisinde kalan fazla PBS mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Daha sonra cam tüpte bulunan doku örneklerinin büyüklüğüne uygun olarak üstlerine 250µl TPER (Tissue Protein Extraction Reagent), 2,5µl proteaz inhibitörü, 2,5µl EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) eklendi.

Homojenizatrn probu %70 etil alkol ile iyice temizlendi. Örneklerin, içerisinde buz parçalarının olduğu bir beherin içinde tutulması sağlandı. Homojenizatrn probu beher içerisindeki doku örneklerinin bulunduğu cam tüpe yerleştirildi ve homojenizatörün forward, reverse basamakları 3'er kez kullanılarak dokunun parçalanması sağlandı. Cam tüp içerisindeki örnek yeni bir tüpe aktarıldı ve 20000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında st yüzeyde oluşan yağ tabakası mikropipet yardımı ile uzaklaştırılarak dokudan protein elde edilmesi işlemi gerçekleştirildi.

3.7.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Protokolü

Ayrırma Jeli (% 12)

Ayrırma jeli (% 12) hazırlamak için aşağıdaki karışım hazırlandı;

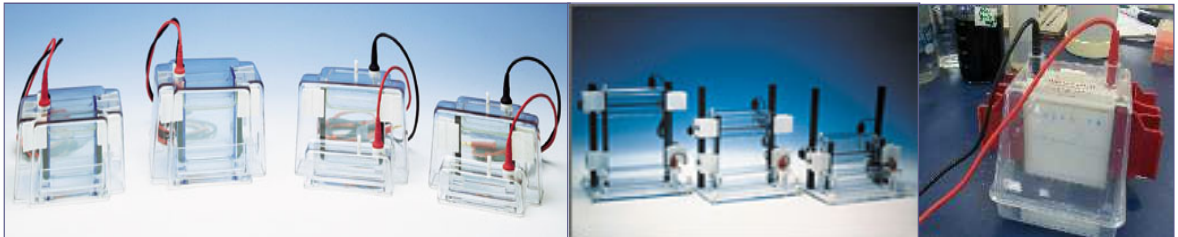
Saf su	:1,75 ml
1.5 M Tris.Cl pH 8.8	:1,25 ml
% 30 Akrlamid/bisakrlamid	:2 ml
% 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat)	:50 µl
% 10 APS (Amonyum persülfat)	:25 µl
TEMED	:2,5 µl

Yükleme Jeli (% 4)

Yükleme jeli (% 4) hazırlamak için aşağıdaki karışım hazırlandı;

Saf su	:1,50 ml
0.5 M Tris.Cl pH 6.8	:625 µl
% 30 Akrlamid/bisakrlamid	:325 µl
% 10 SDS	:25 µl
% 10 APS	:12,5 µl
TEMED	:2,5 µl

İki ucu açık dikdörtgen cam plakalar arasına önce ayırma jeli üstten 5 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Üst yüzeyine 2 mm yüksekliğe kadar izopropanol pipet ile eklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol saf su ile uzaklaştırıldı. Kurutma kâğıdı ile cam plakalar arası temizlendi ve ayırma jeli eklenerek yükleme tarağı yerleştirildi. Polimerize olan jel tanka yerleştirildi. Yüklenecek istenen protein çözeltilerinin hacimlerine göre x6 yükleme tamponu x1 olacak şekilde eklendi. Protein çözeltileri 95°C’de 3 dakika kaynatılarak buz üzerine alındı ve kısa bir santrifüjden sonra mikropipet yardımıyla her bir deney grubu için eşit miktarlarda yükleme gözlerine yüklenerek 180V’da 45 dakika yürütüldü.



Şekil 3.1: Dikey jel elektroforez sistemleri (www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/

1269611236.ppt)

Protein örnekleri SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra jel nitroselüloz membrana transfer edilerek hedef protein için analiz edildi. Western Blot için yarı kuru transferi sağlayan Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. SDS-PAGE jeli cam plakalar arasından transfer tamponunun içine alınarak 10 dakika bekletildi. Süre sonunda sırasıyla 3 whatman kağıdı, 7cm'lik jel, membran ve tekrar 3 whatman kağıdı şeklinde sıralandıktan sonra sabit 15V elektrik akımıyla 20 dakikada negatif yüklü proteinlerin katottan (-) anoda (+) geçişi sağlandı.

Transfer sonunda membran üzerindeki proteinler Ponceau S ile geri dönüşümlü olarak boyanarak transfer verimi ve eşit miktarda örnek yüklemesi yapıldığı kontrol edildi. Saf su ile Ponceau S boyası uzaklaştırıldıktan sonra membran %5 bloklama tamponu ile oda ısısında 1 saat çalkalanarak bloklandı. Süre sonunda membran 3 kere TBST (Tris-Buffered Saline Tween 20) solüsyonu ile sırasıyla 15- 5-5 dakika çalkalanarak yıkandı. Membran üreticinin tavsiye ettiği oranda TBST içinde dilüe edilen birinci antikorlardan; Stella (M-150) (sc-67249), ZP3(C-20) (sc-23717), GDF9(C-20) (sc-7407) ve SCP3(K-13) (sc-33875) ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda membran 3 kere TBST solüsyonu ile sırasıyla 15- 5-5 dakika çalkalanarak yıkandı. İkinci antikorlardan; donkey-anti goat IgG-HRP:sc-2020 ve goat-anti rabbit IgG-HRP:sc-2004 belli oranda TBST içinde dilüe edilerek eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Tekrar üç kere TBST solüsyonu ile yıkandı ve görüntüleme yapmak için hazırlandı.

Görüntülemede ticari olarak satılmakta olan ECL Western Blotting detection reagents kiti kullanılarak yapıldı. Kemilüminesans sinyal üretimini sağlayan reaksiyon ile membran üzerindeki proteinler belirlendi. Bunun için eşit miktarda alınan Immun-Star HRP Peroxide tamponu ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer (Bio-Rad,ABD) karıştırılarak membran üzerine yayıldı. 1 dakikalık bir bekleme sonrasında fazla sıvı bir peçete ile emildi ve membran plastik strech film ile sarılarak Hypercassette (Amersham,Biosciences) içerisine yerleştirildi. Karanlık odada membran üzerine oluşan ışığı algılayabilecek bir X-ray filmi yerleştirildi ve sinyalin film üzerine yansımaları için bir süre bekletildi. Daha sonra oluşan sinyal, film 3 dakika developer çözeltisinde, 30 saniye saf suda ve 1 dakika fikser çözeltisinde yıkandıktan sonra hedef protein film üzerinde görünür hale geldi.

3.8. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

3.8.1. İmmünohistokimya, Östrus ve Doku Takibi İçin Kullanılan Kimyasallar

- PB (Phosphate Buffered): 1 lt saf suya; 7,66 g dibazik (Na_2HPO_4), 2,4 g monobazik (NaH_2PO_4) eklenerek çözüldü.
- PBS (Phosphate Buffered Saline): 1 lt saf suya; 7,66 g dibazik (Na_2HPO_4), 2,4 g monobazik (NaH_2PO_4), 9 g NaCl eklenerek çözüldü ve $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.
- BSA %1 (Bovine Serum Albumine): 5ml PBS içerisine 0.15 g BSA eklenerek hazırlandı.
- PFA %4 (Paraformaldehit) : 1 lt PB içerisine; 40 g paraformaldehit eklendi, ocakta rengi berraklaşınca kadar karıştırıldı. Soğutulup, süzülüp, $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.
- Metilen Mavisi : 0,3 g metilen mavisi, 300 ml %96 etil alkol, 100 ml saf suda çözüldü.
- Hidrojen Peroksit (H_2O_2): 300 ml metanol içerisine 18 ml H_2O_2 eklenerek hazırlandı.
- DAB (Diamino Benzidin): 1ml distile su içerisine 1 damla reagent 1 eklenerek karıştırıldı hemen sonrasında 1'er dalma reagent 2 ve reagent 3 eklenip karıştırılarak hazırlandı.

3.8.2. RT-PCR ve Western Blot İçin Kullanılan Kimyasallar

- TBST pH 7.6 hazırlamak için; Tris 2,42g, NaCl 8g, 1ml Tween 20; 900 ml saf suda çözüldü pH'ı 7.6 ya ayarlandıktan sonra 1000 ml ye tamamlandı.
- Transfer Tamponu hazırlamak için; Tris 0,58g, Glisin 0,29g, SDS 0,025g (375ul %10SDS'den) tartılarak 100 ml saf suda çözüldü.
- Ponceau S boyama solüsyonu (%0.1 (w/v) ponceau S): 0,1g Ponceau S ve 0,5ml Aserik asit 100 ml saf suda çözüldü.
- Bloklama Tamponu (%5 Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad, ABD): 5 g bloklama tozu 10 ml TBST içinde çözüldü ve filtre kağıdından geçirilerek kullanıldı.
- Developer solüsyonu; Kodak RP X- Omat marka solüsyon kullanıldı. 140 ml distile suya; 50 ml solüsyon A, 2µl solüsyon B ve 2 µl solüsyon C eklenerek karıştırıldı, filtre kağıdından geçirilerek kullanıldı.
- Fikser solüsyonu; Kodak RP X- Omat LO marka solüsyon kullanıldı. 140 ml distile suya; 50 ml solüsyon A ve 10 ml solüsyon C eklenerek karıştırıldı.

- Akrilamid – Bisakrilamid (% 30) hazırlamak için; 29,2g akrilamid, 0,8g bisakrilamid tartılıp 100 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4°C’de saklandı.
- Amonyum persülfat (APS) (% 10) hazırlamak için; 1g APS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C’de saklandı.
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (%10) hazırlamak için; 1g SDS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
- Ticari olarak satılan N,N,N', N'-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) kullanıldı (Sigma, USA).

4. BULGULAR

4.1 İmmünohistokimyasal Bulgular

4.1.1. 10 Günlük Grup Bulguları

Folikül gruplarındaki hiç bir hücrede SCP3 ekspresyonu saptanmadı.

Primer folikül ve sekonder folikül evresindeki oositlerin sitoplazmasında çok yoğun (++++) Stella ekspresyonu gözlemlendi.

Primer ve sekonder folikül evresindeki oositlerin sitoplazmasında çok yoğun (++++) sitoplazmik GDF 9 ekspresyonu saptandı. Primordiyal folikül evresindeki oositlerde de GDF 9 ekspresyonu gözlemlendi. Foliküllerin hiçbirisinde hücrelerin nükleusunda ekspresyon saptanmadı. Folikül hücrelerinde ve korpus luteumda ekspresyon saptanmadı.

Primer ve sekonder folikül evresindeki oositlerin sitoplazmasında ve zona pellusida tabakasında yoğun olarak (+++) Zp3 ekspresyonu gözlemlendi.

4.1.2. 1 Aylık Grup Bulguları

Folikül gruplarındaki hiç bir hücrede SCP3 ekspresyonu saptanmadı.

Primer ve sekonder folikül evresindeki oositlerin sitoplazmasında ılımlı (++) sitoplazmik Stella ekspresyonu gözlemlendi.

Primer ve sekonder folikül evresindeki oositlerin sitoplazmasında yoğun (+++) GDF 9 ekspresyonu gözlemlendi. Primordiyal folikül evresindeki oositlerde GDF 9 ekspresyonu gözlemlenmedi. Folikül hücrelerinde ve korpus luteumda ekspresyon saptanmadı.

Primer ve sekonder folikül evresindeki oositlerin sitoplazmasında ve zona pellusida tabakasında ılımlı (++) Zp3 ekspresyonu gözlemlendi.

4.1.3. 2 Aylık Grup Bulguları

Folikül gruplarındaki hiç bir hücrede SCP3 ekspresyonu saptanmadı.

Stella ekspresyonu hem primer hem sekonder hem de graaf foliküllerin birçoğunda ılımlı (++) sitoplazmik boyanmalarla gözlemlendi. Bu folikül gruplarının bazılarında ise hiç ekspresyon saptanmadı.

Primer ve sekonder evresindeki oositlerde yer yer ılımlı (++) yer yer yoğun (+++) GDF 9 ekspresyonu gözlemlendi. Foliküllerin hiçbirisinde hücrelerin nükleusunda ekspresyon

saptanmadı. Primordiyal folikül evresindeki oositlerde GDF 9 ekspresyonu gözlenmedi. Folikül hücrelerinde ve korpus luteumda ekspresyon saptanmadı.

Primer ve sekonder folikül evresindeki oositlerin sitoplazmasında ve zona pellusida tabakasında ılımlı (++) Zp3 ekspresyonu gözlemlendi.

4.1.4. Kontrol Kesit Bulguları

10 günlük, 1 aylık ve 2 aylık çalışma gruplarında ki hiçbir folikülde ekspresyon gözlenmedi.

4.2. RT-PCR Bulguları

4.2.1. 10 Günlük Grup Bulguları

SCP3, Stella, GDF 9 ve Zp3 ekspresyonları tespit edildi. SCP3 ve Stella ekspresyonlarının seviyesi GDF 9 ve Zp3'ün ekspresyonlarının seviyesine oranla daha yüksek oranda gözlemlendi.

4.2.2. 1 Aylık Grup Bulguları

SCP3, Stella, GDF 9 ve Zp3 ekspresyonları tespit edildi.

4.2.3. 2 Aylık Grup Bulguları

SCP3, Stella, GDF 9 ve Zp3 ekspresyonları tespit edildi. SCP3 ve Stella ekspresyonlarının seviyesi GDF 9 ve Zp3'ün ekspresyonlarının seviyesine oranla daha yüksek oranda gözlemlendi.

4.3. Western Blot Bulguları

4.3.1. 10 Günlük Grup Bulguları

SCP3 ekspresyonu saptanmadı. Stella ekspresyonu yüksek oranda saptandı. GDF 9 ve Zp3 ekspresyonu düşük oranda gözlemlendi.

4.3.2. 1 Aylık Grup Bulguları

SCP3 ekspresyonu saptanmadı. Stella ekspresyonu düşük seviyede saptandı. GDF9 ekspresyonu yüksek oranda gözlemlendi. Zp3 ekspresyonu; 10 günlük gruptaki ekspresyon seviyesinden fazla, 2 aylık gruptaki ekspresyon seviyesinden az bir oranda tespit edildi.

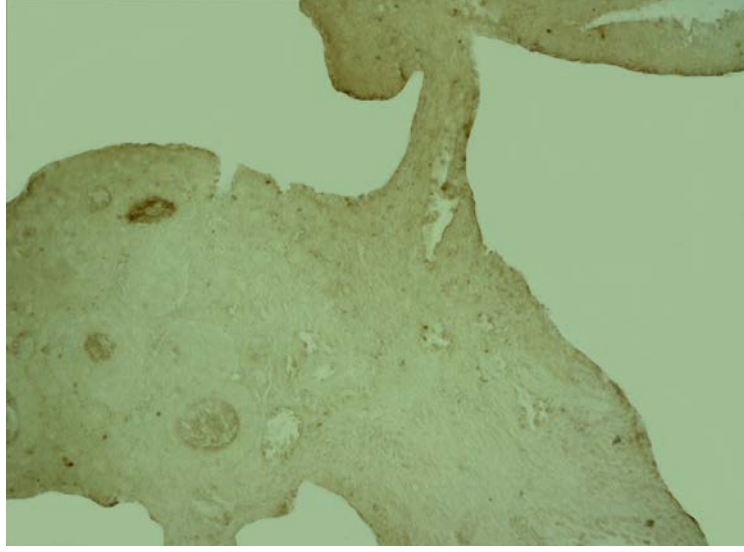
4.3.2. 2 Aylık Grup Bulguları

SCP3 ekspresyonu saptanmadı. Stella ekspresyonu oldukça yüksek oranda saptandı. GDF 9 ekspresyonu; 10 günlük gruptaki ekspresyon seviyesinden fazla, 2 aylık gruptaki ekspresyon seviyesinden düşük bir oranda saptandı. Zp3 ekspresyonu yüksek oranda saptandı.

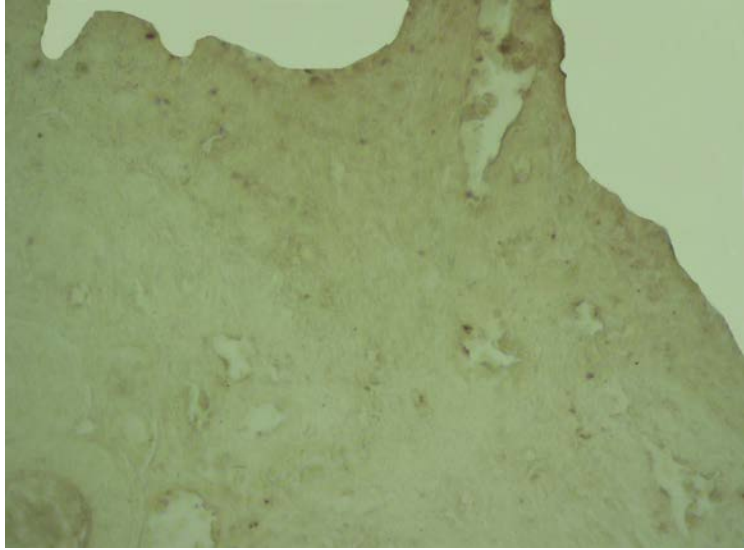
Çizelge 4.1: immünohistokimyasal Boyanma Dereceleri

		Sitoplazma	Nükleus	Folikül hücreleri	Korpus Luteum	Zona Pellusida
GDF 9	Kontrol	-	-	-	-	-
	10 Gün. Grup	++++	-	-	-	-
	1 Aylık Grup	+++	-	-	-	-
	2 Aylık Grup	++ / +++	-	-	-	-
STELLA	Kontrol	-	-	-	-	-
	10 Gün. Grup	++++	-	-	-	-
	1 Aylık Grup	++	-	-	-	-
	2 Aylık Grup	++	-	-	-	-
SCP3	Kontrol	-	-	-	-	-
	10 Gün. Grup	-	-	-	-	-
	1 Aylık Grup	-	-	-	-	-
	2 Aylık Grup	-	-	-	-	-
ZP3	Kontrol	-	-	-	-	-
	10 Gün. Grup	+++	-	-	-	+++
	1 Aylık Grup	++	-	-	-	++
	2 Aylık Grup	++	-	-	-	++

PF: Primer Folikül
PrF:Primordiyal Folikül
N: Nükleus



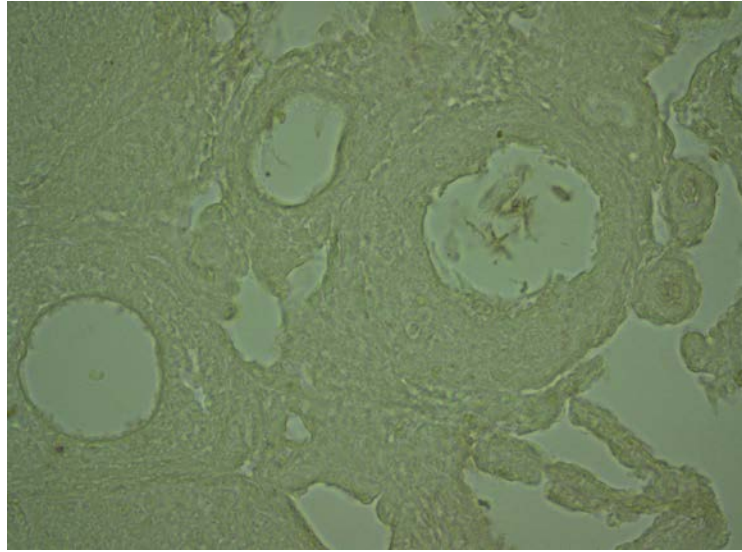
Şekil 4.1.a: 10 Günlük Grup, SCP3, X 200



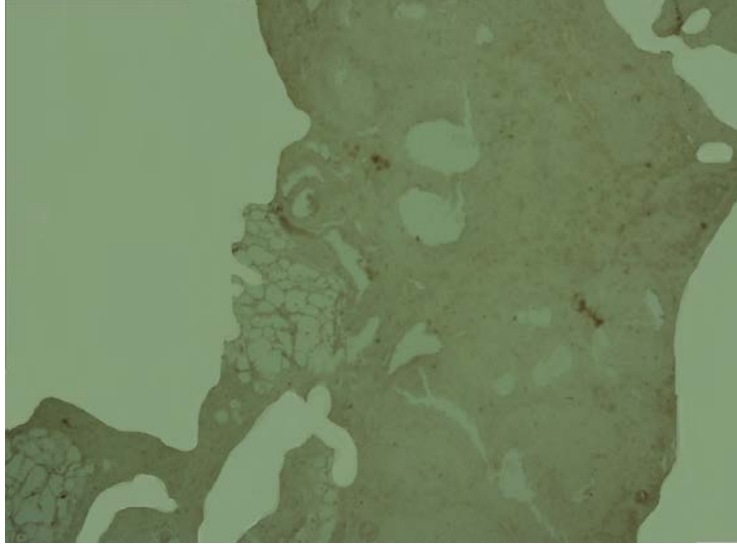
Şekil 4.1.b: 10 Günlük Grup, SCP3, X 400



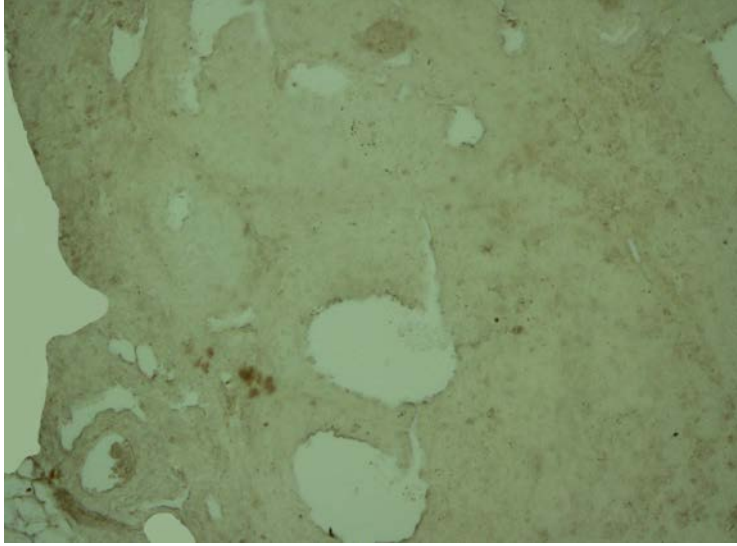
Şekil 4.2.a: 1 Aylık Grup, SCP3, X 200



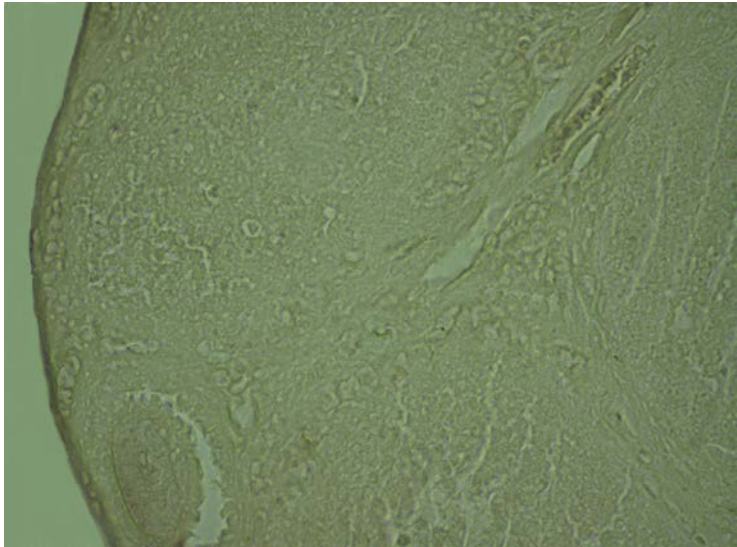
Şekil 4.2.b: 1 Aylık Grup, SCP3, X 400



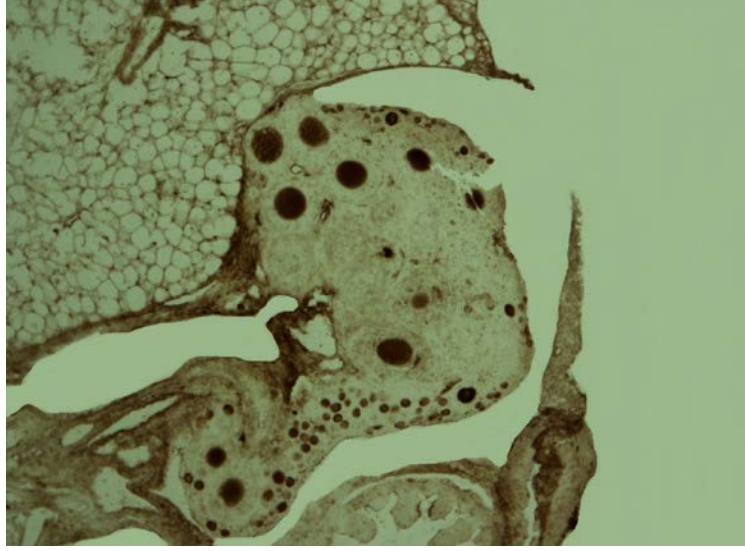
Şekil 4.3.a: 2 Aylık Grup, SCP3, X 100



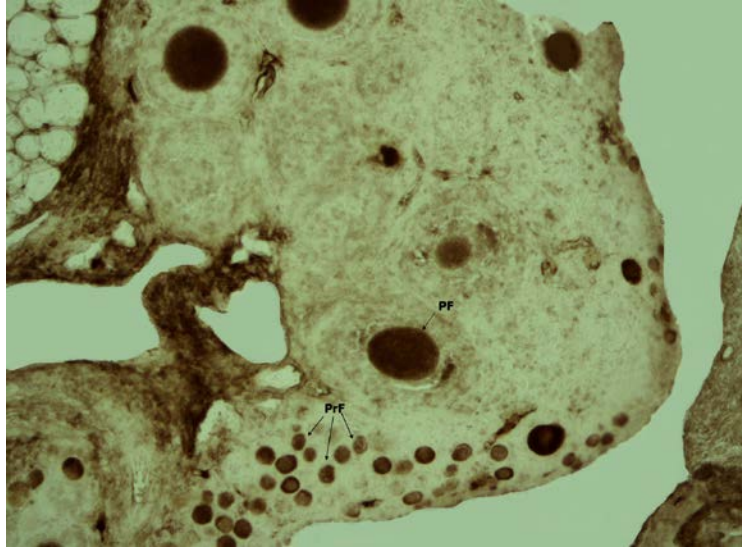
Şekil 4.3.b: 2 Aylık Grup, SCP3, X 200



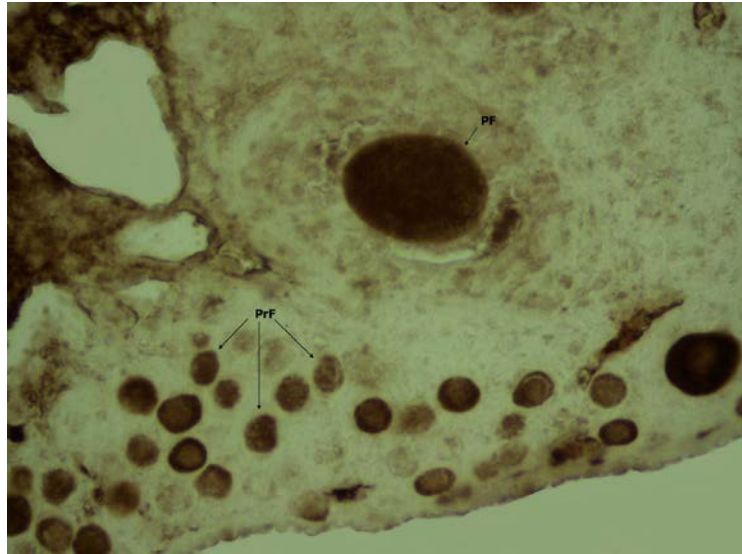
Şekil 4.3.c: 2 Aylık Grup, SCP3, X 400



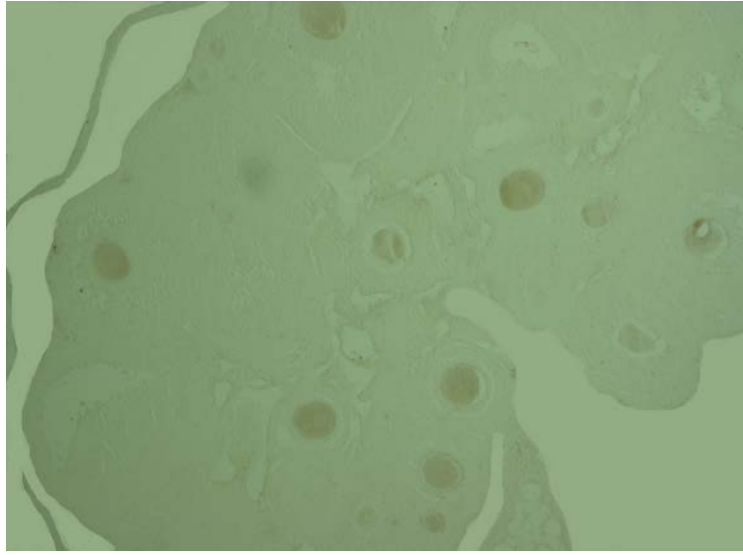
Şekil 4.4.a: 10 Günlük Grup, Stella, X 100



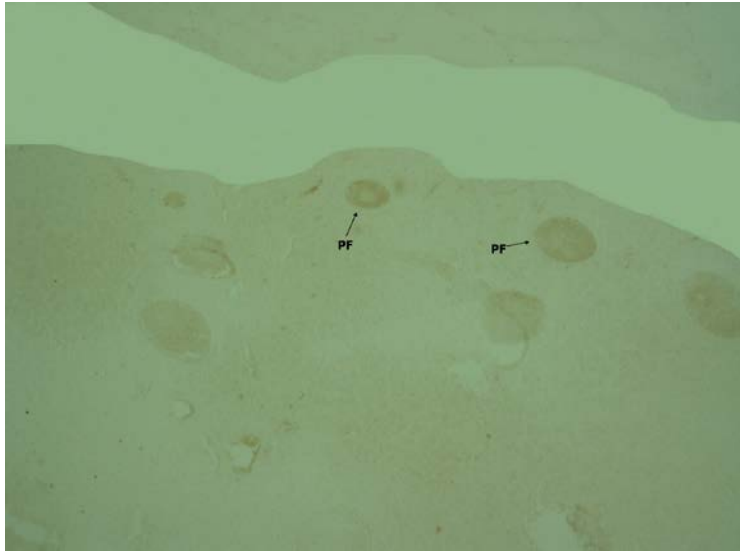
Şekil 4.4.b: 10 Günlük Grup, Stella, X 200



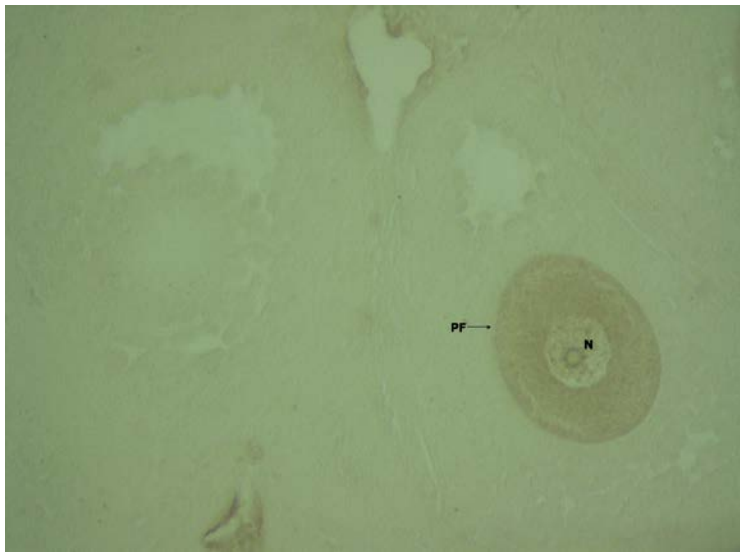
Şekil 4.4.c: 10 Günlük Grup, Stella, X 400



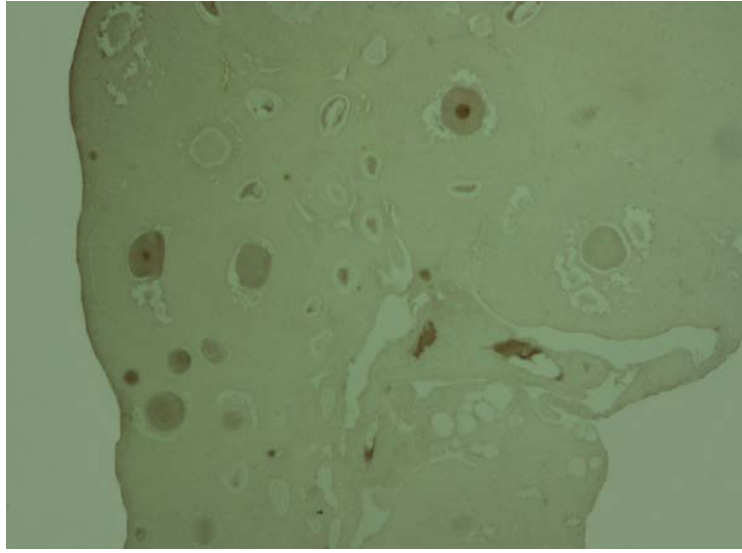
Şekil 4.5.a: 1 Aylık Grup, Stella, X 100



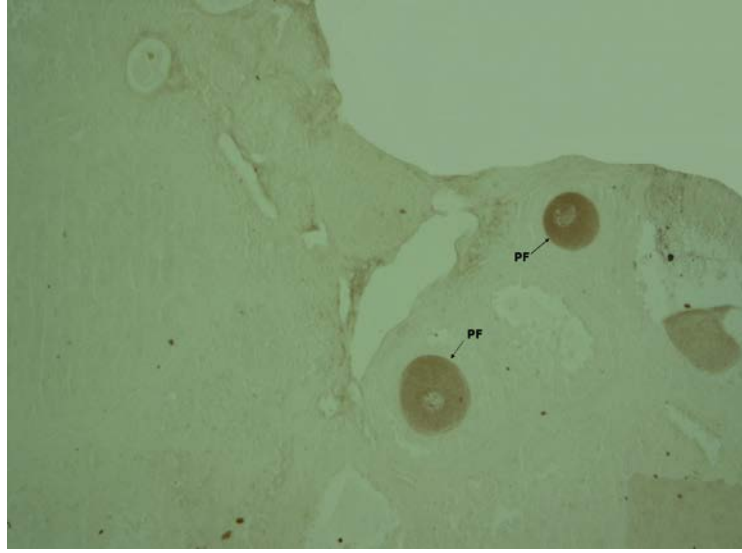
Şekil 4.5.b: 1 Aylık Grup, Stella, X 200



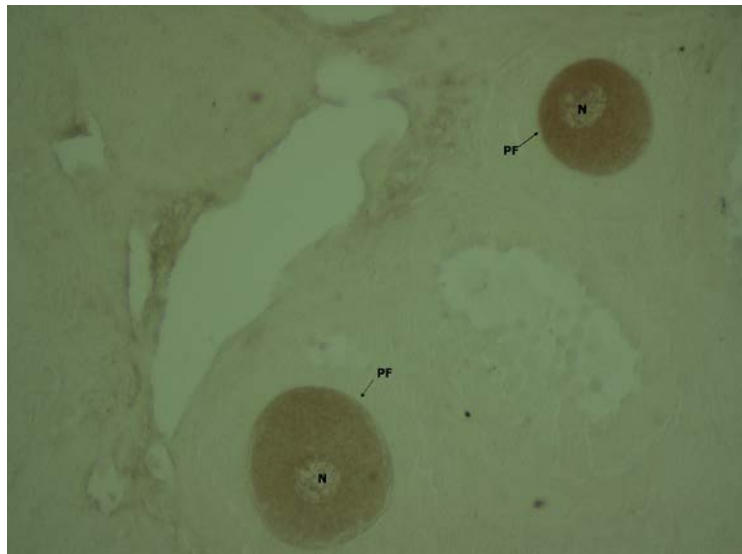
Şekil 4.5.c: 1 Aylık Grup, Stella, X 400



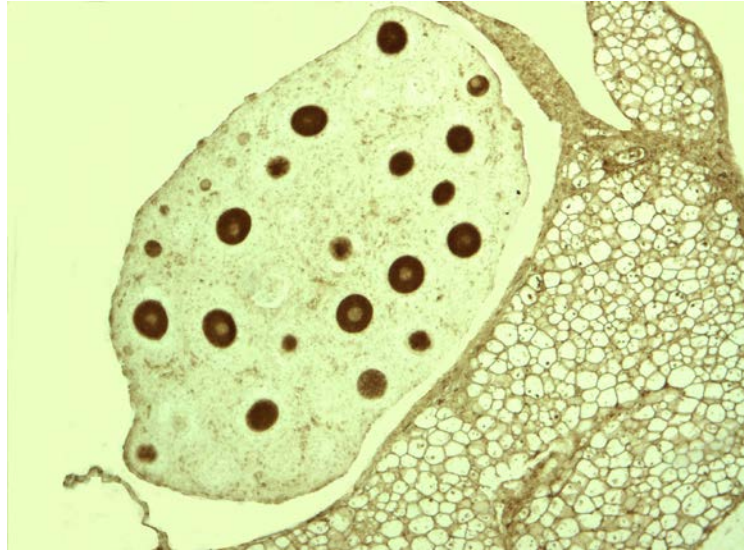
Şekil 4.6.a: 2 Aylık Grup, Stella, X 100



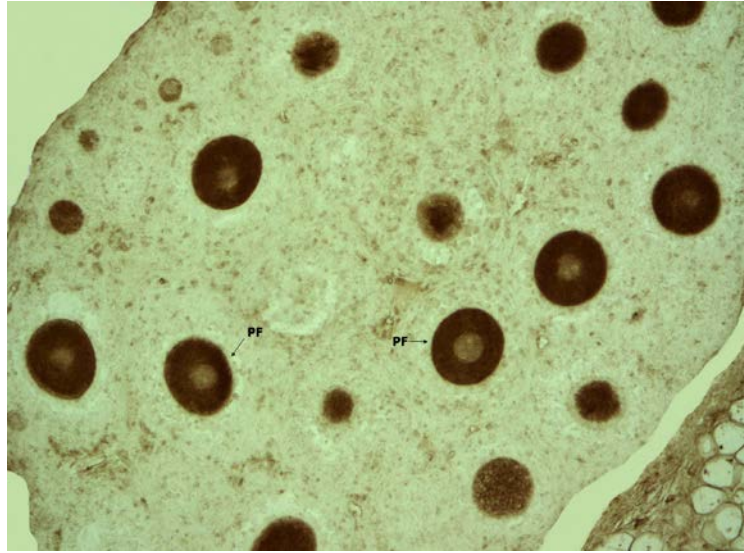
Şekil 4.6.b: 2 Aylık Grup, Stella, X 200



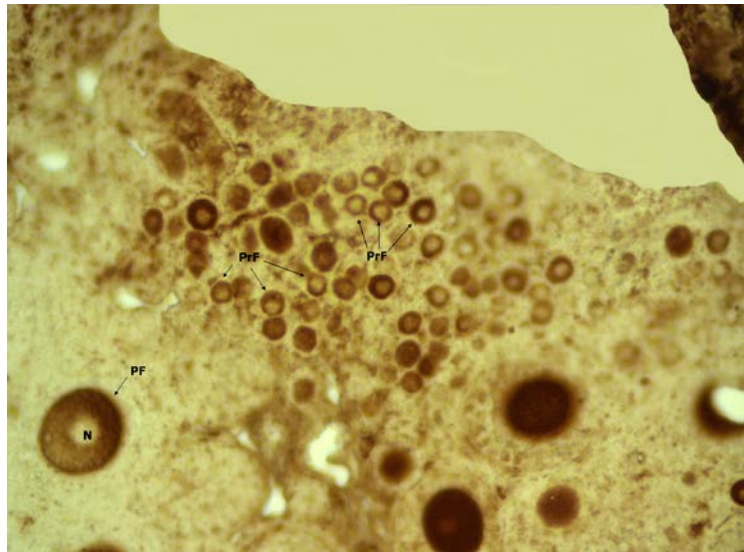
Şekil 4.6.c: 2 Aylık Grup, Stella, X 400



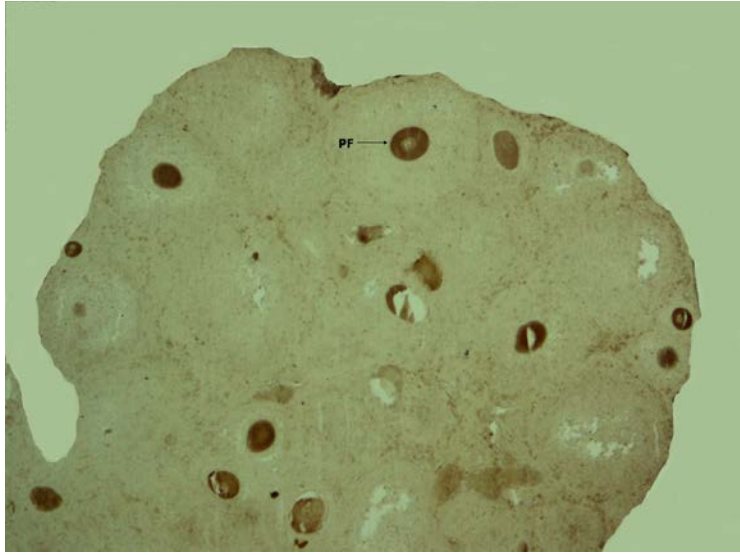
Şekil 4.7.a: 10 Günlük Grup, GDF 9, X 100



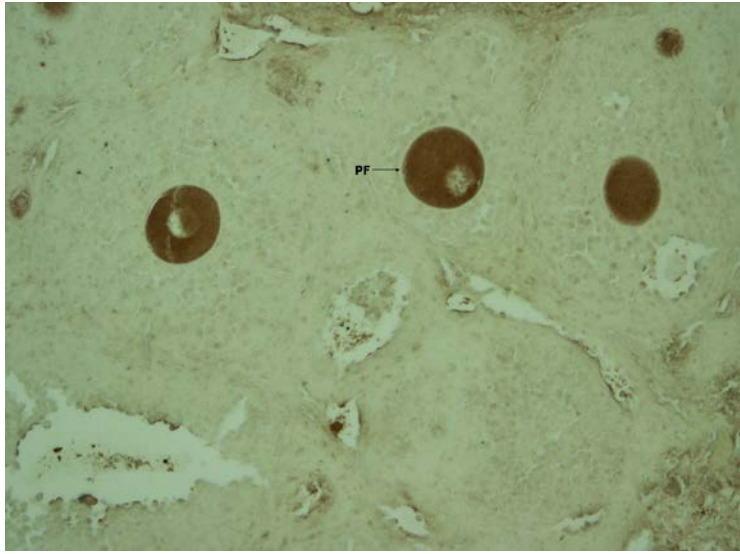
Şekil 4.7.b: 10 Günlük Grup, GDF 9, X 200



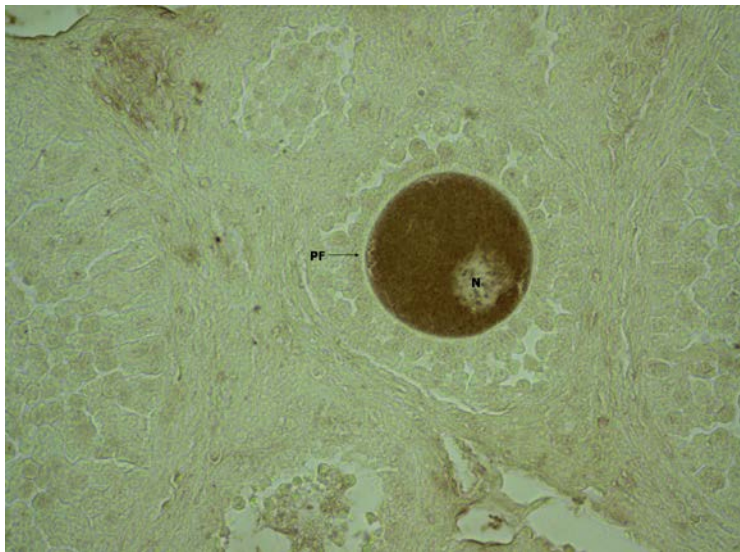
Şekil 4.7.c: 10 Günlük Grup, GDF 9, X 400



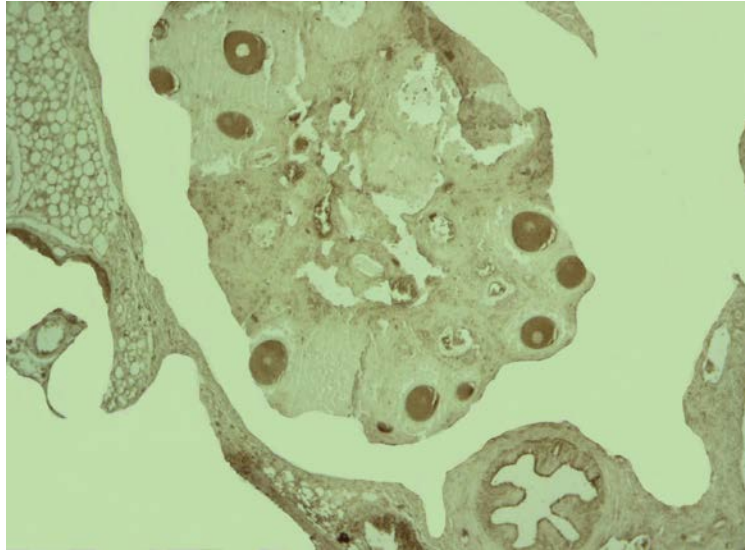
Şekil 4.8.a: 1 Aylık Grup, GDF 9, X 100



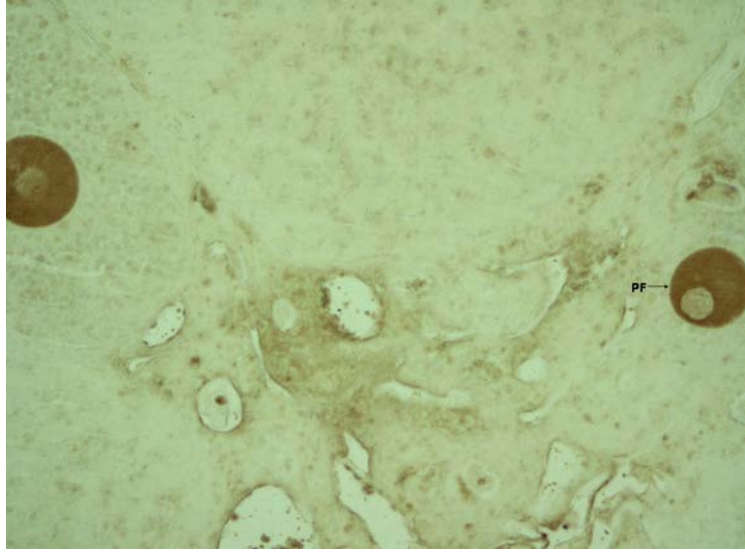
Şekil 4.8.b: 1 Aylık Grup, GDF 9, X 200



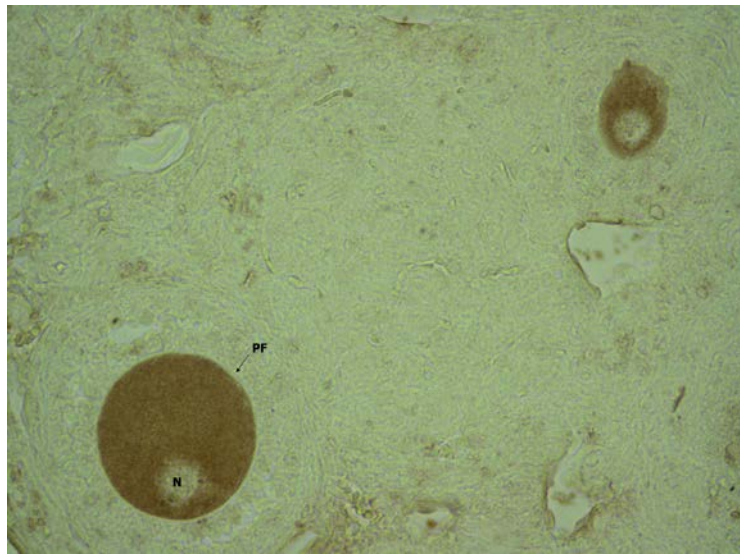
Şekil 4.8.c: 1 Aylık Grup, GDF 9, X 400



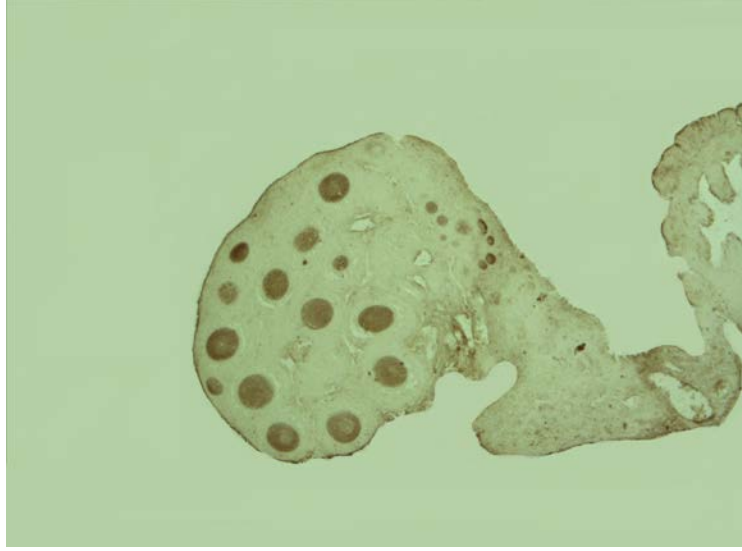
Şekil 4.9.a: 2 Aylık Grup, GDF 9, X 100



Şekil 4.9.b: 2 Aylık Grup, GDF 9, X 200



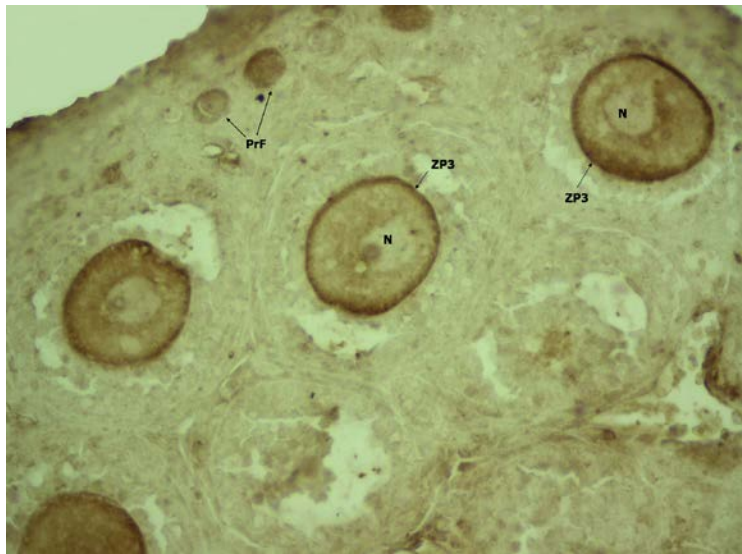
Şekil 4.9.c: 2 Aylık Grup, GDF 9, X 400



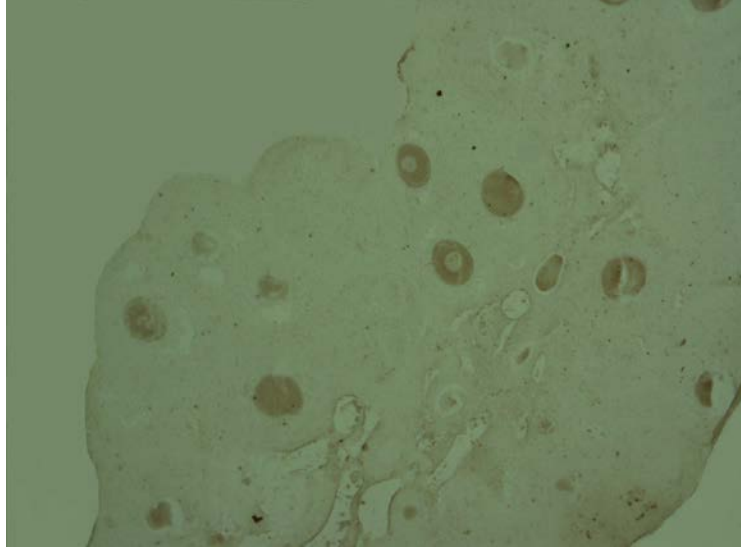
Şekil 4.10.a: 10 Günlük Grup, ZP3, X 100



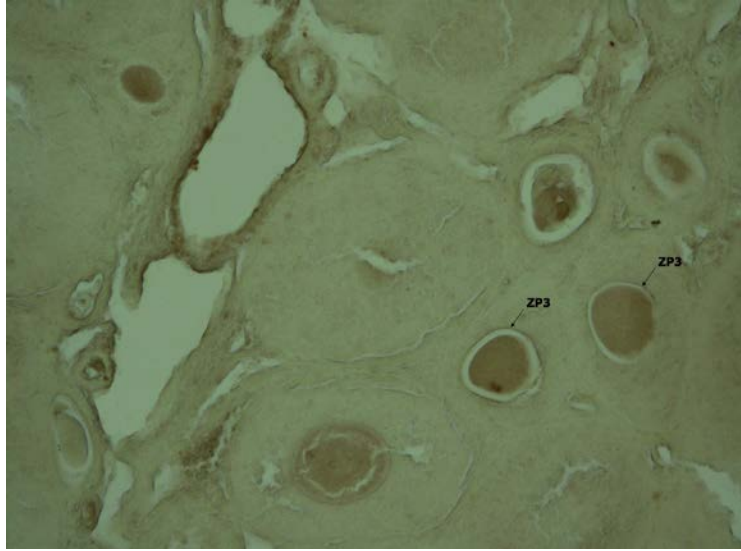
Şekil 4.10.b: 10 Günlük Grup, ZP3, X 200



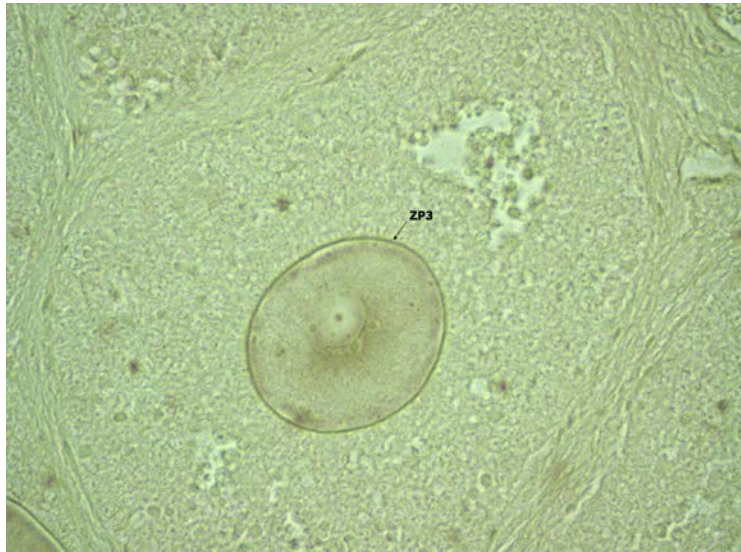
Şekil 4.10.c: 10 Günlük Grup, ZP3, X 400



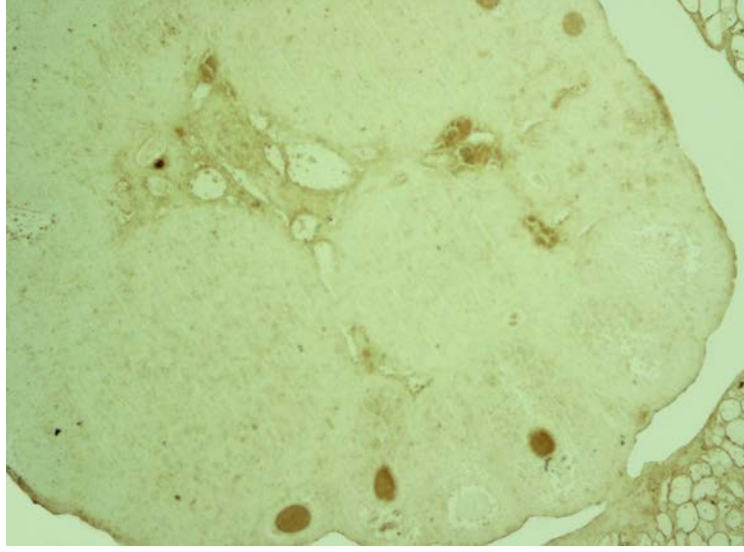
Şekil 4.11.a: 1 Aylık Grup, ZP3, X 100



Şekil 4.11.b: 1 Aylık Grup, ZP3, X 200



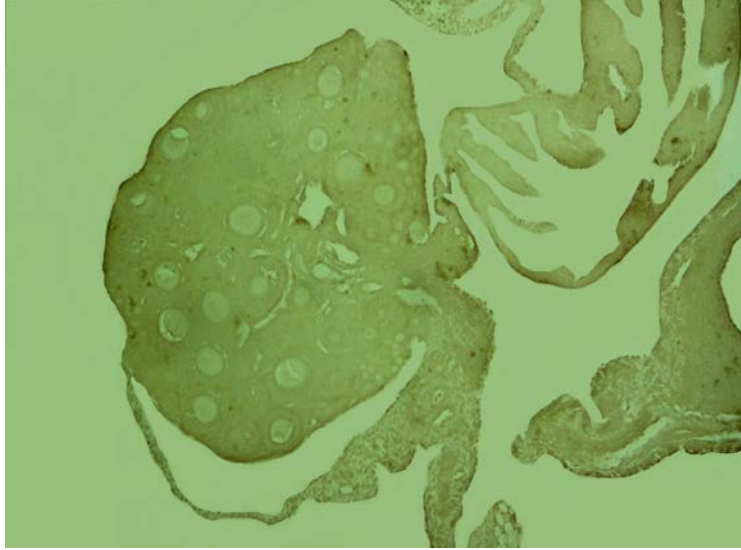
Şekil 4.11.c: 1 Aylık Grup, ZP3, X 400



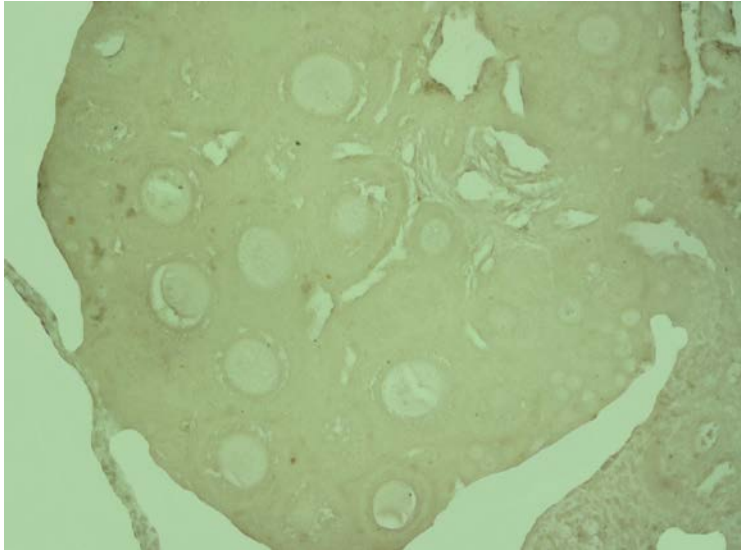
Şekil 4.12.a: 2 Aylık Grup, ZP3, X 100



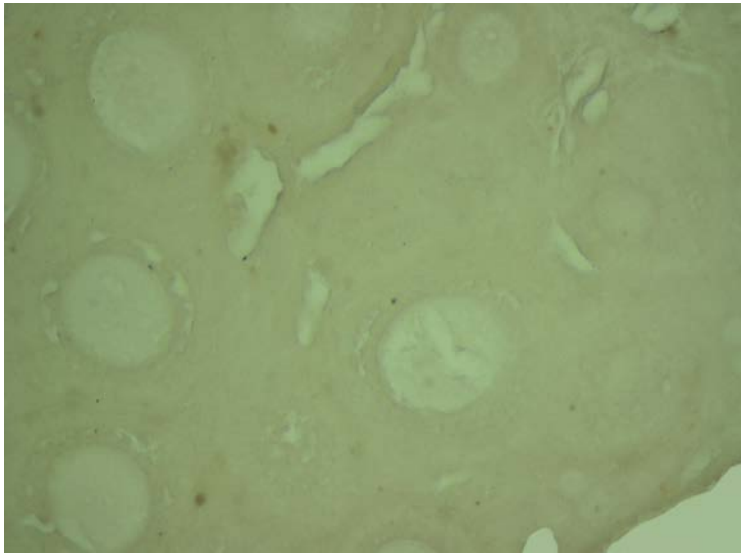
Şekil 4.12.b: 2 Aylık Grup, ZP3, X 400



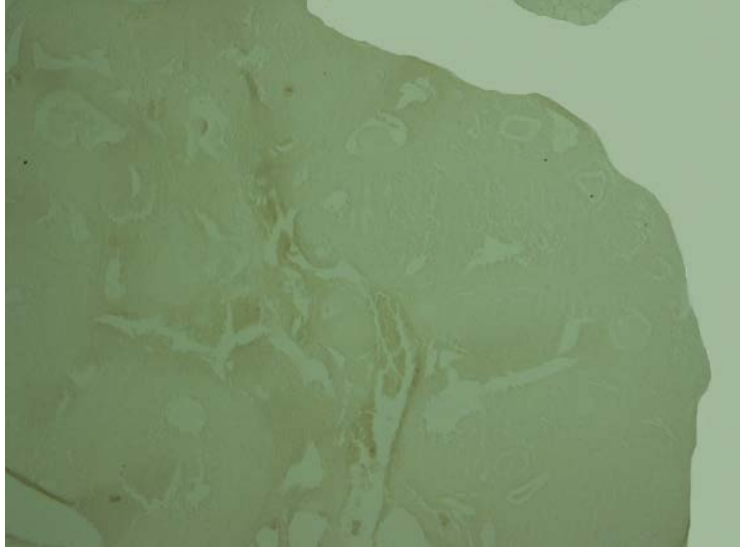
Şekil 4.13.a: Kontrol, 10 Günlük Grup, Primersiz, X 100



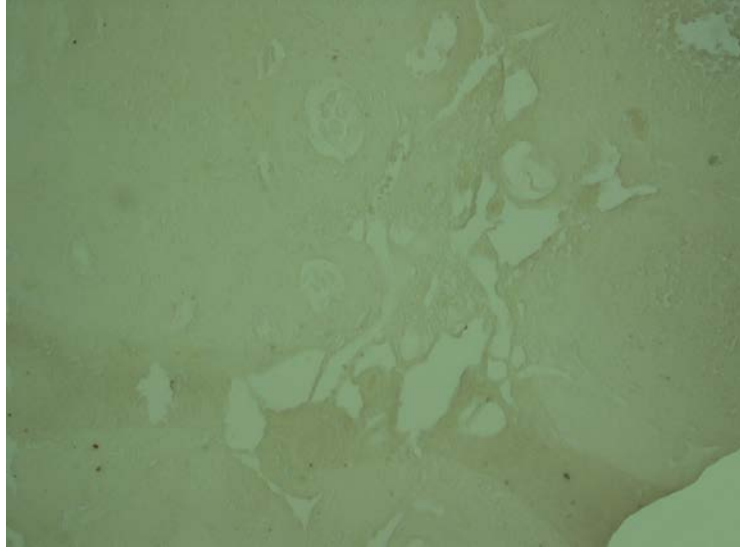
Şekil 4.13.b: Kontrol, 10 Günlük Grup, Primersiz, X 200



Şekil 4.13.c: Kontrol, 10 Günlük Grup, Primersiz, X 400



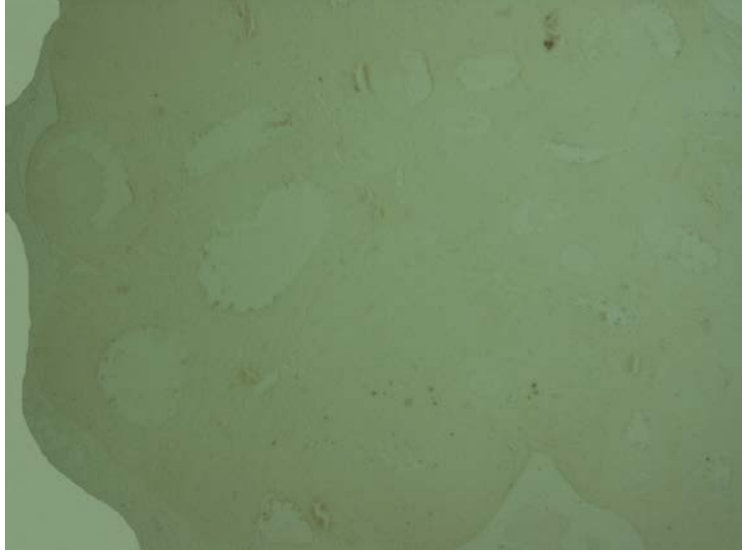
Şekil 4.14.a: Kontrol, 1 Aylık Grup, Primersiz, X 100



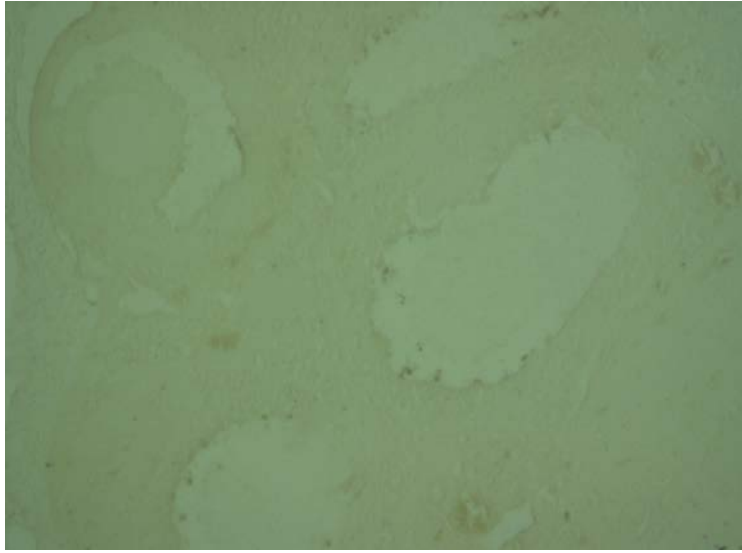
Şekil 4.14.b: Kontrol, 1 Aylık Grup, Primersiz, X 200



Şekil 4.14.c: Kontrol, 1 Aylık Grup, Primersiz, X 400



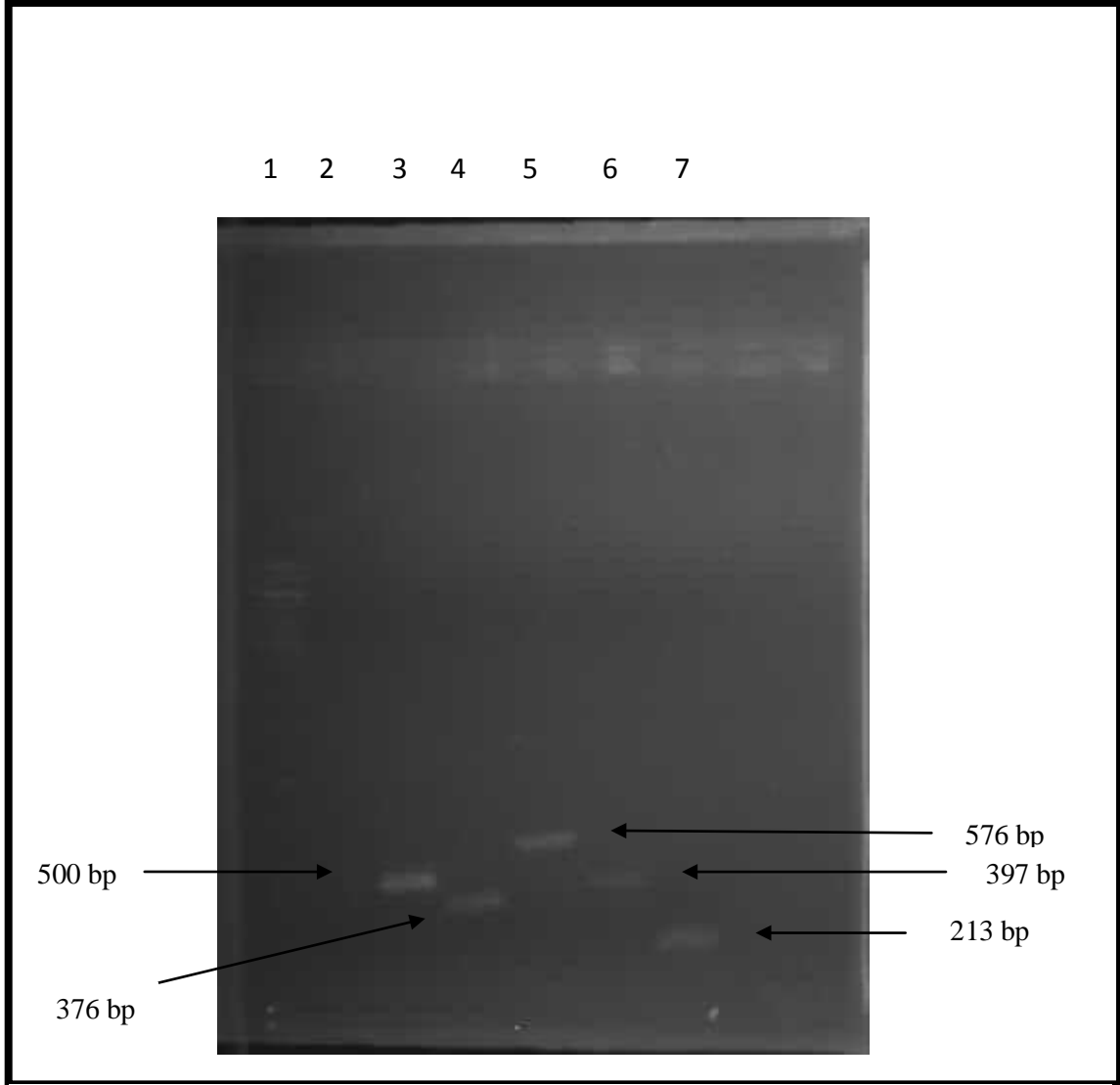
Şekil 4.15.a: Kontrol, 2 Aylık Grup, Primersiz, X 100



Şekil 4.15.b: Kontrol, 2 Aylık Grup, Primersiz, X 200



Şekil 4.15.c: Kontrol 2 Aylık Grup Primersiz X 400



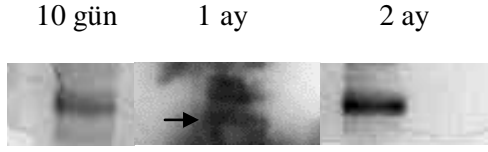
Şekil 4.16 : 10 günlük grup RT-PCR sonuçları. 1) GeneRuler 1kb DNA Ladder 2) negatif kontrol 3) Aktin (pozitif kontrol) 4) Stella 5) SCP3 6) GDF 9 7) ZP3



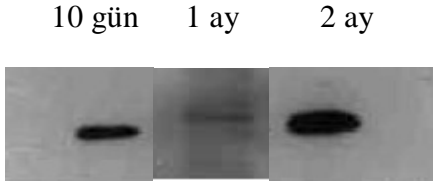
Şekil 4.17: 1 aylık grup RT-PCR sonuçları. 1) GeneRuler 1kb DNA Ladder
2) negatif kontrol 3) Aktin (pozitif kontrol) 4) Stella 5) SCP3 6) GDF 9 7) ZP3



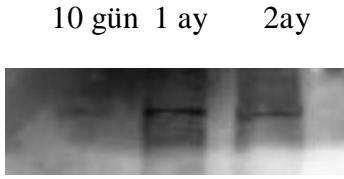
Şekil 4. 18: 2 aylık grup RT-PCR sonuçları. 1) GeneRuler 1kb DNA Ladder 2) negatif kontrol 3) Aktin (pozitif kontrol) 4) Stella 5) SCP3 6) GDF 9 7) ZP3



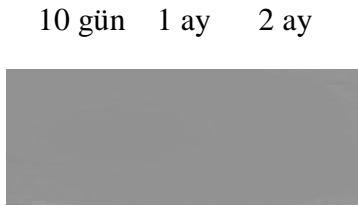
Şekil 4.19 : Western Blot yöntemi ile Zp3 ekspresyonunun gösterilmesi



Şekil 4.20: Western Blot yöntemi ile Stella ekspresyonunun gösterilmesi



Şekil 4.21 : Western Blot yöntemi ile GDF 9 ekspresyonunun gösterilmesi



Şekil 4.22: Western Blot yöntemi ile SCP3 ekspresyonu saptanmadı

5.TARTIŞMA

20. yy' in ilk yarısı boyunca, memeli ovaryumunun kök hücre soyundan germinal kök hücreleri (GKH) içerip içermediği ve ovaryumdaki GKH'in farklılaşması ile oogenesisin yenilenip yenilenmediği sorusu tartışmalara yol açmıştır. 1950'lerde, dişi memelilerin fetüse ait yaşam boyunca germ hücre yenileme kapasitesini kaybettiği kabul edilmişti. Örneğin; follikül ile çevrelenmiş germ hücreleri (oositler) rezervi doğumda sabitlenmiştir ve apoptoziside kapsayan bir mekanizma ile postnatal yaşam boyunca oosit sayısı giderek azalır (Tilly, 2001). Sonuçta oositler ovaryumdan atılır ve ovaryum boşalarak verimsizleşir (Gosden et al., 1983). Diğer bir deyişle, memelilerin postnatal ovaryumunda germ hücre yenilenmesi yoktur (Zuckerman, 1951; Peters and Crone, 1967). O zamandan bu yana spermatogenezisin erkeklerde erişkin hayat boyunca sürdürülmesine rağmen oogenesisin dişilerde ve birçok memeli türünde doğumdan önce durduğu kabul edilmiştir (Borum, 1961, Anderson and Hirshfield, 1992) ve primatların bazı türlerinde mitotik olarak aktif birkaç germ hücrelerinin varlığının rapor edilmesi haricinde bu görüş kabul edilmiştir (Duke, 1967; Ionno, 1967; David et al., 1974). Germ hücrelerinin proliferasyonu ile sağlanan bir ovulasyonun ya da follikülogenezisin gerçekleştiğine dair sağlam bir kanıt elde edilememiştir (Telfer, 2004).

Johnson et al. (2004) erişkin farelerde ovaryum yüzey epitelinde GKH varlığını ve postnatal foliküler yenilenmeyi sürdürdüklerini göstererek bu inancı değiştirdiler. Sonrasında, kemik iliği ya da periferal kanın varsayılan kök hücreler için depo görevi gördüğünü, ovaryuma doğru göç ettiklerini ve erişkin fare ovaryumunda germ hücre yenilenmesini sağladıklarını ileri sürdüler (Johnson et al., 2005). Bunlara ek olarak; farelerde yapılan (Kerr et al., 2006; Zou et al., 2009) ve insandaki (Bukovsky et al., 2004, 2005a,b) bazı çalışmalar erişkin ovaryumda GKH'in olduğunu ve oogenesisin sürdürüldüğünü iddia eden görüşleri desteklemiştir. Bununla birlikte, son zamanlarda ki bazı çalışmalar, fare kemik iliği ya da periferal kan hücrelerinden ovulasyon ile atılacak oosit oluştuğuna dair bir kanıt sağlayamamışlardır. GKH varlığını ve normal erişkin insan ovaryumunda yapılan çalışmalar neo-oogenesisi kanıtlayamamıştır (Eggan et al., 2006; Veitia et al., 2007; Liu et. al., 2007) . Sonuç olarak, postnatal memeli ovaryumunda GKH varlığının olup olmadığı konusu belirsizliğini sürdürmüştür.

Mayotik profaz I; birçok (sinaptonemal kompleks (SCs) oluşumu, çift zincir kırılması (DSB), homologların rekombinasyonu ve DNA tamiri gibi) benzersiz özellik içerir. Bunların arasında, SCs evrimsel olarak korunarak; mayoz özel yapılarının oluşmasında, homolog kromozomların sinapsisinde, kiazmata dağılımında ve kromozom ayrılmalarında merkezi bir rol oynar. Birçok protein ve enzim, örneğin; SCP1-3 (de Vries et al., 2005; Yang et al., 2006), SPO11 (Baudat et al., 2000; Romanienko and Camerini-Otero, 2000), DMC1 (Pittman et al., 1998; Yoshida et al., 1998) mayoz için çok önemlidirler ve bu mayotik genlerdeki bir bozulma fareler de infertilite ya da fertilitate de azalmaya neden olur (Hunt and Hassold, 2002). Dişi germ hücrelerinin gelişmesinin erken basamakları süresince ekspresyonu azalan DMC1 (Menke et al., 2003) ve SCP3 (Bullejos and Kopman, 2004) in vivo olarak mayoza girişte çok önemlidir. Germ hücrelerinin replikasyonu ile postnatal yaşamdaki follikül oluşumu için oositler üretilebilir fakat mayoz bölünmenin başlaması bazı genlerin ekspresyonunu gerektirir.

SCP3 ekspresyonu mayoz bölünme başlangıç belirteci olarak sık kullanılır çünkü daha önceki çalışmalar SCP3 ve DMC1'in germ hücrelerinde mayozun pakiten ya da zigoten basamakları ile ekspresyonunun kısıtlı olduğunu göstermiştir (Yuan et al., 2000; Cohen and Pollard, 2001). Bütün bu basamaklar oositte ilk mayotik duraksamanın gözlemlendiği geç diplotenden öncedir ve mayoz özel proteininin sinaptonemal kompleksin axial lateral elementlerinin oluşumuna ihtiyacı vardır (Yuan et al., 2000). Daha öncesinde farede GKH farklılaşması, postnatal oogenezis için direk kanıt olarak değerlendirilmiştir (Johnson et al., 2004). Bu mayotik genlerin postnatal memeli ovaryumunda neo-oogenezis için mükemmel belirteç oldukları düşünülmektedir.

Mayoz bölünme boyunca sinaptonemal kompleks (SC) gibi özel çok molekül proteinine benzeyen yapılar aracılığıyla homolog kromozomlar rekombinasyon için bir araya gelirler. Proteinlerin şifrelenmesinde SCP1 ve SCP3 genlerinin mayoz bölünme için bir belirteç olarak kullanılan (Johnson et al., 2004; Liu et al., 2007) SC oluşumunda (Lammers et al., 1994; Ollinger et al., 2005) çok kritik rolleri vardır. Zhang et al. (2010) yaptıkları çalışmalarında; erişkin testisin tersine, çocuk ve genç ovaryumlarda SCP1, SCP3 ve SPO11 genlerinin mRNA ekspresyonunu tespit edememiş ve erişkin ovaryum korteksindeki oositlerde SCP3 proteininin immünohistokimyasal olarak ayırt edilebilir nükleer lokalizasyonunun olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, Hodges et al. (2001) çalışmalarında 2 haftalık fare ovaryumunda Western blot ile SCP3 ekspresyonunu tespit edememişlerdir.

Bizde yaptığımız araştırmada, bu çalışmalara benzer şekilde, 10 günlük, 1 aylık ve 2 aylık fare ovaryumlarında, immünohistokimyasal analizler ve Western blot yöntemlerini uygulayarak SCP3 ekspresyonunu tespit edemedik. Ancak, RT-PCR ile bütün deney gruplarında SCP3 geninin varlığını göstermeyi başardık. Fakat , SCP3 geninin sadece ekspresyonunu değil, proteininin fonksiyonel olarak varlığı ve dağılımı da normal bir mayoz bölünme için kritik bir önem taşımaktadır (Novak et al., 2006). Liu et al. (2007) yaptıkları çalışmalarında; insan fetal ovaryumunda SCP3'ün nükleer boyanması ile I. mayoz bölünmenin aktif olarak gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, bizim çalışmamız ile de uyumlu olarak erişkin ovaryum korteksinde SCP3 proteininin nükleer lokalizasyonu ile ayırt edilebilen hiçbir mayotik oosit bulamamışlardır. Bu sonuçlara göre; erişkin insan ovaryumunda I mayozun aktif olmadığını söyleyebiliriz. Erişkin ovaryumda RT-PCR analizi ile tespit edilen SCP3 proteinin ekspresyonu düşük seviyede olmasına rağmen normal bir mayozun fonksiyonel değerlendirilmesinde SCP3 proteininin özel nükleer dağılımı çok daha önemlidir (Novak et al., 2006). Bu sonuçların tersine, erişkin ovaryumunda postnatal oogenezin gerçekleştiğini iddia eden Johnson et al. (2004); SCP3 ekspresyonunu erişkin ovaryumda tespit etmişlerdir. Bütün bu çalışmalar arasındaki farklılıkların kullanılan deney hayvanlarının gruplarının, soylarının, yaşlarının, kullanılan metodun ve materyallerin farklı oluşlarından kaynaklı olabileceğini düşünüyoruz.

Johnson et al. (2005) çalışmalarında, kemik iliği ve periferal kanın dışı germ hücreleri için birer kaynak olabileceklerini ve erişkin dönemde oosit üretiminin devamını sağlayabileceklerini iddia etmişlerdir. Gen ekspresyon analizleri ve kemik iliği transplantasyonu (BMT) deneylerinde alıcıları kemoterapi ile kısırlaştırmışlar, erişkin dışı farede varsayılan GKH deposunun kemik iliğinde bulunduğu ve oogenezi desteklediğini göstermişlerdir. Transplantasyon çalışmalarına ek olarak, transgenik farelerden elde edilen periferal kandaki, ekspresyonu germ hücreleri ile sınırlı olan GFP (green fluorescent protein) ekspresyonunu; kemoterapi uygulanmış alıcı dişilerde GFP pozitif hücreleri göstererek, periferal kanın da varsayılan GKH için depo görevi gördüğü iddialarını güçlendirmişlerdir. Buna göre; kemik iliğinde olduğu varsayılan germ hücreleri, progenitör hücrelerini periferal dolaşım içerisine bırakır buradan da ovaryumlara doğru oosit üretimi için yolculuk ederler. Periferal kandan ve kemik iliğinden elde edilen hücreler gerçek oositlerin temel karakteristiklerinden birçoğunu sergilerler (morfoloji, germ hücre ekspresyonu, oosite özel belirteçler) ancak bu oositlerin normal bir şekilde fertilize olabildiklerini ve canlı yavrular oluşturabildiklerini henüz tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Yaptıkları

çalışmalardaki sonuçlara göre; kemik iliği ve periferal kanın dişi germ hücreleri için potansiyel birer kaynak olduğunu ve erişkin dönemde oosit üretiminin devamını sağlayabileceklerini söylemişlerdir.

Postnatal hayatta hematopoetik sistem kök hücreler (HSCs) tarafından sürdürülür ve buldukları yerde kemik iliğidir (Morrison et al., 1995). PGH'i in vitro olarak ilkel hematopoetik kök hücreler oluşturma kabiliyetindedirler (Rich, 1995) ve yapılan çalışmalar da; kemik iliğinden elde edilen hücreler birden çok hücre soyu oluşturabilme kabiliyetinde olduğunu göstermiştir (Herzog et al., 2003; Grove et al., 2004; Heike and Nakahata, 2004). Bu çalışmalardan sonra, Johnson et al. (2005) erişkin kemik iliğinde germ hücrelerin tespitine yönelik çalışmalar yapmıştır. Erişkin dişi fare kemik iliğinde Mvh, Dazl, Stella ve Fragilis olarak adlandırılan germ hücre belirteçleri izole edilmiştir (Saitou et al., 2002; <http://genome.ucsc.edu>; Benson et al., 2004; Su et al., 2004) ve insan kemik iliğinde de Stella ekspresyonu gözlenmiştir. Johnson et al. (2005) daha sonra bu çalışmalarla uyumlu olarak 24-36 yaş arası bayanlardan elde edilen kemik iliğinde germ hücre belirteçlerini tespit etmişlerdir. Ayrıca, Payer et al. (2003) Stella ekspresyonunu erişkin testiste tespit edemezken, yenidoğan ovaryumundaki immatur oositlerde ekspresyonun devam ettiğini ve ardından matur oositlerde sonrasında da preimplantasyon aşamasındaki embriyoda eksprese olduğunu göstermiştir. Bizde çalışmamızda, postnatal 10 gün, 1 ay ve 2 aylık dişi fare ovaryumlarında germ hücre belirteci olan Stella ekspresyonunu immünohistokimyasal analizler, Western blot ve RT-PCR yöntemleri ile gösterdik. Stella maternal bir faktör olarak geçer ve bu yüzden zigot ve oositlerde tespit edilir. Stellanın sitoplazmada herhangi bir fonksiyonu olmadığı fakat burada depolanmasının inaktif kalmasını sağladığı bilinmektedir (Saitou et al., 2002). Bizde çalışmamızda ki immünohistokimyasal boyanmalarda, özellikle 10 günlük fare ovaryumunda 1 ay ve 2 aylık fare ovaryumlarına oranla yoğun sitoplazmik Stella ekspresyonu gözledik ancak nukleer bir boyanma gösteremedik. Bu da, elde ettiğimiz bulgular ışığında, sitoplazmik Stella ekspresyonunun fonksiyonel olmadığını göstermektedir.

Johnson et al. (2005), kemik iliğinin germ hücreler için bir depo görevi gördüğünü bir diğer deponun da periferal kan olabileceğini söylemişlerdir. Varsayılan germ hücreleri ovaryuma ulaşmak için periferal kandan faydalanacaklardır. Deneylerden bir tanesinde; periferal kan hücresi transfüzyonu (PBT) için donör olarak GFP ekspresyonu Oct4 ile düzenlenen transgenik dişi fare kullanmışlar ve PBT'den önce GFP sinyalinin olmadığı

tespit etmişlerdir. PBT yapıldıktan 20-30 saat içinde kemoterapi etkisi ortadan kalkan dişi fare ovaryumunda primordiyal foliküllerdeki oositlerde yüksek derecede GFP (+) ekspresyonu gözlemlemişlerdir. PBT den sonra konakçının ovaryumundan toplanan oositlerin GFP (+) hücreler içerdiğini ve bunların kendilerinin oosit ya da germ hücre olduklarını destekleyen; MVH, HDAC6, NOBOX ve fonksiyonel bir oosit belirteci olan GDF 9 ekspresyon ettiklerini tespit etmişlerdir. Johnson et al. (2005), erişkin dişi alıcının kemik iliği transplantasyonu ve periferel kan tranfüzyonu ardından oosit oluşturabilme yeteneğinde olduğunu göstermekle birlikte BMT ya da PBT sonucunda üretilen oositlerin fertilizasyon yeteneğinin olup olmadığı ve canlı yavrular oluşturabilecek yetenekte olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bizde çalışmamızda; GDF9 ekspresyonunu immünohistokimyasal boyanma, RT-PCR ve Western blot analizleri ile tespit ettik. Özellikle 10 günlük fare ovaryumunda, 1 ay ve 2 aylık fare ovaryumlarına nazaran daha yoğun sitoplazmik GDF9 ekspresyonu gözlemledik. GDF9 folikül hücrelerinin çoğalmasında son derece önemli bir faktördür ve primordiyal foliküllerin primer foliküllere gelişiminde önemli rol oynar. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, GDF 9'un postnatal erken evrelerden itibaren folikül gelişimi üzerinde oldukça etkili olduğunu göstermiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, in vitro olarak somatik hücre soylarından fonksiyonel olarak oosit ve yumurta elde edilebileceği ileri sürülmüştür. Bukovsky et al. (2004) hipotezlerinde; erişkin insan ovaryumundaki tunika albuginea (TA) bulunan mezenşimal hücreler hem granüloza hem de germ hücrelerinin bipotent öncülleri olduğu görüşünü savunmuşlardır. Erişkin insan ovaryumundaki primer folikül havuzunun durağan olmadığını, farklılaşan ve gerileyen, azalan yapıları ile dinamik bir sürece sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu düşünce ilk kez, Waldeyer (1870) tarafından erişkin memeli ovaryumundaki oosit ve primer foliküllerin orijininin olası gonaddaki kölomik epitelin (germinal ya da yüzey epiteli) proliferasyonu ile sağlandığını ileri sürmesiyle başlamıştır. Weissman (1885)'in teorisi ise buna ters olarak germ plazmasının sürekliliği şeklindeydi. Bu teori; embriyonik gelişimin erken basamakları süresince embriyonik hücreler özelleşmiş bir yolda var olmadan önce germ hücreleri ayrı bir yerdedir ve gamet oluşumuna neden olacak şekilde yönlendirilmişlerdir görüşünü savunmaktadır. 1960 ve 1970'li yılların başında bu görüş memelileri de içerecek bir şekilde kabul görmüştür (Franchi et al., 1962; Baker, 1972).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, fare embriyonik kök hücre kültürlerinde oogenezin gerçekleştiği gösterilmiştir. Bazı oogonyumların mayoz bölünmeye girdikleri

ve birbirine yakın olan hücrelerin folikül benzeri yapılar oluşturdukları ve sonrasında gelişerek blastosist oluştuğu iddia edilmiştir (Hubner et al., 2003). Aynı zamanda, fare embriyonik kök hücre kültürlerinde, haploid erkek gamete farklılaşan hücreler yumurtayı fertilize etme ve blastosist oluşturma yeteneğine sahip oldukları belirtilmiştir (Geijsen et al., 2004). Bütün bu çalışmalar; somatik hücrelerin germ hücresi biçiminde gelişebilme potansiyelinin olduğunu ve bazı memeli türlerinin erişkin ovaryumlarında mitotik olarak aktif germ hücrelerinin bulunduğunu işaret etmektedir. Bununla birlikte çok sayıda bilim adamı tarafından, bütün primer foliküllerin erişkin dişi memelilerde fetal periyotları süresince oluştuğu görüşü desteklenmektedir. Çünkü; erişkin memeli ovaryumunda yeni primer folikül oluşumunu direk olarak kanıtlayacak bir bulgu yoktur (Telfer, 2004). Bunların dışında, Bukovsky et al.(2004) erişkin insan ovaryumunda tunika albugineadaki mezenşimal hücrelerin hem primitif granüloza hem de germ hücreleri ile bağlantılı olduğunu iddia etmiştir.

Taramalı ve transmisyon elektron mikroskoplarında, intrauterin hayattaki 7-24 haftalık insan fetuslarında ovaryum yüzey epitelindeki germ hücreler ortaya çıkarılmıştır. Germ hücreleri; küçük kölomik epitelyal hücreleri (kendi etraflarında yuvarlaklaşmış), düz yüzeyleri ve bazı durumlarda büyük ampisi çıkıntıları ile kolayca ayırt edilebilmiştir (Motta et al., 1986). Erişkin insan ovaryumunda immünohistokimya kullanılarak daha önceki çalışmalarda da olduğu gibi, varsayılan germ hücreleri yüzey epiteli içinde ve kortekste gösterilmiştir. Bu veriler Bukovsky ve ark. nın düşüncelerini desteklemektedir. Onlar, germ hücrelerinin yüzey epiteline yakın yapılardan ya da ovaryumdan çıktığını, orijinlerinin de yüzey epiteli, ovaryum korteksi ya da her ikisi birden olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Bukovsky et al., 1995).

Zona pellusida proteinleri oositler için spesifik belirteçlerdir. Postnatal sıçan ovaryumunda primer foliküllerde ilk olarak zona pellusida belirir (Pan et al., 1998). Bununla beraber bazı Zp proteinleri; PS1 gibi, aynı zamanda tavşanda ovaryum yüzey epitelinde, kedide, maymunda, insanda saptanmıştır. Bu yüzden, yüzey epitel hücrelerinde ki Zp proteinlerinin ekspresyonunun oositlerle ilgili olabileceğini akıllara getirmiştir (Skinner et al., 1992; Dunbar et al., 2001).

Germ hücrelerinin ampisi hareketler yaparak göç etme yetenekleri vardır fakat germ hücreleri büyük memelilerde ulaşılacak istenen uzaktaki hedef noktaya varmak için intravasküler transporttan faydalanırlar (Baker, 1972; Wartenberg, 1983). Germ hücrelerinin kan dolaşımından ayrılarak belirli bölgelerde kalmalarının sebebi ise açık

değildir. Bununla ilgili olarak germ hücrelerinin dolaşımında ki sürekliliğini engelleyen bir kapak mekanizmasının olduğu düşünülmüştür (Wartenberg, 1983). Bu yüzden, büyük memelilerde germ hücrelerinin yakınındaki kan damarına göç edip ulaşmak istediği yere gidebilmek için vasküler transporttan faydalandığı düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalar sonucunda, fetal ovaryumda dişi germ hücrelerinin ovaryum stromasından yüzey epiteline kadar göç edip ovaryumdan ayrılırlar mı sorusu akıllara gelmiştir. Bu sürecin fetal ve neonatal ovaryumdaki oosit havuzunu ve germ hücrelerini azaltabileceği izlenimi edilmiştir (Motta et al., 1982; Motta et al., 1986). Bununla ilgili olarak iki görüş tartışılmaktadır; birincisi, fetal yüzey epitelindeki germ hücrelerinin boyutu, korteks yakınındaki oogonya ve germ hücrelerinden ciddi anlamda daha küçüktür. İkinci olarak; kurbağa larvası ya da spermdeki gibi germ hücre göçü her zaman sonda oluşan kuyruk segmentinin yol gösterimi ile gerçekleşir. Bukovsky et al. (2004); fetal ovaryum yüzey epitelinde ki germ hücrelerinin amipsi hareketlerle içe doğru kıvrımlar yaptıklarını ve nükleusun yöneliminin ovaryen stromaya doğru olduğunu tespit etmişlerdir. Bunlara ek olarak; erişkin ovaryumda ZP (+) germ hücrelerinin yüzey epitelinden orijin aldığını ve ovaryum stromasına doğru geçtiğini gözlemlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalarda; yüzey epitelinde saptanan büyük hücrelerin fetal dönemdeki gibi, oositlerle benzerlik gösterdikleri sonucuna varmışlardır (Bukovsky et al., 1995). Yapılan çalışmaların sonucunda; ZP (+) germ hücrelerinin yüzey epitelinde asimetrik bölünmeler yoluyla geliştiklerini ileri sürmüşlerdir. Eğer gerekli ise örneğin; intrauterin hayatta ikinci trimesterdeki gibi ve maksimum üreme periyodunda olduğu gibi, germ hücrelerinin uyarılma ile ovaryum stromasına doğru indiklerini ve burada yeni primer folikül oluşumuna katkıda bulduklarını iddia etmişlerdir. Aksi takdirde, germ hücrelerinin ovaryum stromasına geçişinin durdurulabileceğini dolayısıyla yüzey epitelindeki oositlerin farklılaşp uyarılarak ovaryumdan ayrılacağını öngörmüşlerdir (Johnson et al., 2004). Bazı çalışmalarda, ovaryum yüzey epitelinde bulunan germ hücrelerinin ovaryumdan periferal kan akışı boyunca göç edebildiklerini bu yüzden kemik iliğindeki hücrelerin germ hücre belirteçleri için pozitif olarak genleri eksprese etmekten sorumlu olduklarını savunmaktadırlar (Bukovsky, 2004; Bukovsky, 2005). Bu verilere göre, daha önce belirttiğimiz Johnson et al. (2005) periferal kanda ekspresyonlarını gösterdikleri germ hücre ekspresyonlarının pozitif sonuç vermesinin sebebinin bu olabileceği de akla gelmektedir. Biz de çalışmamızda; ovaryum yüzey epitelinde Zp (+) hücreler gözlemlemedik. Ancak, özellikle 10 günlük fare ovaryumunda 1 ay ve 2 aylık fare

ovaryumlarına oranla daha yoğun Zp3 ekspresyonunu immünohistokimyasal boyanma ile tespit ettik. Buna ek olarak, RT-PCR ve Western blot analizleri ile birlikte Zp3 ekspresyonunun bütün deney gruplarında bulunduğunu gösterdik.

6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmanın sonucunda, mayotik hücre belirteci olan SCP3'ün varlığını ne Western blot ne de immünohistokimyasal olarak gösterebildik. Ancak SCP3 geninin varlığını RT-PCR ile tespit ettik. SCP3, mayoz bölünmenin erken aşamalarında ortaya çıkan bir yapısal protein olduğundan ve varlığı mayoz bölünmeye giren yeni bir hücreyi gösterdiğinden dolayı, çalışmamızda SCP3 proteinini ve ekspresyonunu gösteremeyişimiz postnatal dönem fare ovaryumunda mayoz bölünmeye yeni başlayan bir hücrenin olmadığını göstermiştir.

Yaptığımız çalışmanın sonucunda, primordiyal germ hücre belirteci olan Stella proteinini Western blot ile Stella genini ise RT-PCR ile ovaryumda saptadık. Bununla birlikte, Stella ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak oosit sitoplazmasında gösterdik. Ancak, Stella ekspresyonunu oosit nukleusunda gösteremedik. Bu da, Stella ekspresyonunun sadece oosit sitoplazması ile sınırlı olduğunu, aktif durumda olmadığını, bir başka deyişle, ekspresyonunu saptadığımız hücrenin primordiyal germ hücresi olmadığını göstermiştir.

Yaptığımız çalışmanın sonucunda, ovaryumda GDF9 proteininin varlığını, ekspresyonunu ve genini Western blot, immünohistokimya ve RT-PCR ile gösterdik. GDF 9'un ekspresyonunun sadece oositler ile sınırlı olması bu proteini sentezleyen hücrelerin sadece oositler olduğunu ve ekspresyonun özellikle 10 günlük fare oosit sitoplazmasında yoğun olması ise foliküler gelişimin farelerde postnatal erken dönemlerde başladığını göstermiştir. Bununla birlikte, 1 aylık ve 2 aylık gruplarda da ekspresyonun ılımlı yada yoğun olması folikül gelişiminin sürekli olduğunu göstermiştir.

Yaptığımız çalışmanın sonucunda, ovaryumda ZP3 proteinini Western blot ile, ekspresyonunu immünohistokimya ile ve genini de RT-PCR ile gösterdik. ZP3 ekspresyonu oosit sitoplazması ve zona pellusida tabakası ile sınırlı idi. Ekspresyonun özellikle 10 günlük fare oosit sitoplazmasında yoğun olması ZP3 proteininin prenatal dönemde yoğun olarak sentezlenmesinin bir yansıması olduğunu, 1 ve 2 aylık gruplarda daha ılımlı olması ise ilerleyen postnatal dönemlerde bunun idame ettirildiğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, postnatal dönem fare ovaryumda, kullandığımız tekniklerle primordiyal germ hücresinin ve yeni oosit gelişiminin izine rastlayamadık.

7. KAYNAKLAR

- Allen, E. (1923) Ovogenesis during sexual maturity. *Am. J. Anat.* 31, 439–470.
- Anderson LD, Hirshfield AN, (1992) An overview of follicular development in the ovary: from embryo to the fertilized ovum in vitro. *Md Med J* 41, 614–620.
- Aravind, L., Koonin, E.V. (2000) SAP-a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organisation. *Trends Biochem. Sci.*, 25:112–114.
- Arıncı K., Elhan A. (2001) *Anatomi 1*. Cilt. Ankara Güneş Kitap Evi.
- Baker TG: Oogenesis and ovarian development (1972) In *Reproductive Biology* Edited by: Balin
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S, (2000) Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6, 989–998.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Wheeler, D.L. (2004). GenBank: update. *Nucleic Acids Res. Data- base Issue* 32, D23–D26.
- Bogner K., Hinsch1 K.-D., Nayudu P., Konrad L., Cassara C. and Hinsch E. (2004) Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary.
- Bortvin A., Goodheart M., Liao M. (2004) *Dppa3/Pgc7/stella* is a maternal factor and is not required for germ cell specification in mice. *BMC Dev. Biol.*, 4:2.
- Borum K, (1961) Oogenesis in the mouse. A study of meiotic prophase. *Exp Cell Res* 24, 495–507.
- Bukovsky A, Caudle MR, Keenan JA, Elder RF (2004) Immune system involvement in the regulation of ovarian function: an immunohistochemical study of the developing and adult human ovary and ovarian cancer. *Microsc Res Tech.*
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB, (2004) Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 1–30.
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Wimalasena J, Ayala ME, Dominguez R, (2005a) Oogenesis in adult mammals, including humans. *Endocrine* 26, 1–16.
- Bukovsky A, Keenan JA, Caudle MR, Wimalasena J, Upadhyaya NB, Van Meter SE (1995) Immunohistochemical studies of the adult human ovary: possible contribution of immune and epithelial factors to folliculogenesis. *Am J Reprod Immunol*, 33:323-340
- Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR, (2005b) Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 1–17.
- Bullejos M, Koopman P, (2004) Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 68, 422–428.
- Canning, J., Takai, Y., and Tilly, J.L. (2003). Evidence for genetic modifiers of ovarian follicular endowment and development from studies of five inbred mouse strains. *Endocrinology* 144, 9–12.
- Chamberlin M. E., Dean, J. (1990). Human homolog of the mouse sperm receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6014-6018.

- Cohen P, Pollard JW, (2001) Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *Bioessays* 23, 996–1009.
- David GF, Anand Kumar TC, Baker TG, (1974) Uptake of tritiated thymidine by primordial germinal cells in the ovaries of the adult slender loris. *J Reprod Fertil* 41, 447– 451.
- de Vries F.A., de Boer E., van den Bosch M., Baarends W.M., Ooms M., Yuan L., Liu J.G., van Zeeland A.A., Heyting C., Pastink A., (2005) Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* 19, 1376–1389.
- Demeestere I., Centner J., Gervy C., Englert Y., Delbaere A. (2005) Impact Of Various Endocrine And Paracrine Factors On In Vitro Culture Of Preantral Follicles In Rodents. *Reproduction* 2005; 130 147–156.
- Dietrich A.J.J., Kok E., Offenberg H.H., Heyting C., De Boer P. And Vink A.C.G. (1992). The sequential appearance of components of the synaptonemal complex during meiosis of the female rat. *Genome* 15: 492-497.
- Dobson M., Pearlman R.E., Karaiskakis A., Spyropoulos B. and Moens P.B. (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping, and chromosome disjunction. *J. Cell. Sci.* 107: 2749-2760.
- Dong J., Albertini D.F., Nishimori K., Kumar T.R., Lu N., Matzuk M.M (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* vol.383, 10 October, p. 531-35.
- Duke KL, (1967) Ovogenetic activity of the fetal-type in the ovary of the adult slow loris, *Nycticebus coucang*. *Folia Primatol (Basel)* 7, 150–154.
- Dunbar B.S., Avery S., Lee V., Prasad S., Schwahn D., Schwoebel E., Skinner S. and Wilkins B. (1994) The Mammalian Zona Pellucida: its Biochemistry, Immunocytochemistry, Molecular Biology, and Developmental Expression. *Reprod. Fertil. Dev*, 6, 331–47.
- Dunbar BS, Timmons TM, Skinner SM, Prasad SV (2001) Molecular analysis of a carbohydrate antigen involved in the structure and function of zona pellucida glycoproteins. *Biol Reprod*, 65:951-960.
- Edwards S.J., Reader K.L., Lun S., Western A., Lawrence S., McNatty K.P., Juengel J.L. (2008) The cooperative effect of growth and differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein (BMP)- 15 on granulosa cell function is modulated primarily through BMP receptor II. *Endocrinology* 149(3):1026–1030.
- Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ, (2006) Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* 441, 1109–1114.
- Elvin J.A., Matzuk M.M. (1998) Mouse models of ovarian failure. *Rev. Reprod.* p.183-95. *Endocrinology* 150(6):2740–2748.
- Epifano O., Liang I., Familiari M., Moos M. C., Jr and Dean J. (1995) Coordinate expression of the three zona pellucida genes during Mouse oogenesis. *Development* 121(7), 1947–1956.
- Erkoçak A. (1982) Özel Histoloji. Ankara. Ankara Üniversitesi Tıp Fak. Basım Evi.
- Florman H. M. & Wassarman P. M. oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41, 313-324. (1985) *Cell* 41, 313-324.
- Franchi LL, Mandl AM, Zuckerman S (1962) The development of the ovary and the process of oogenesis. In *The Ovary* Edited by: Zuckerman S. London: Academic Press:1-88.
- Gartner L.P., Hiatt L.J. (2007) *Color Text Book of Histology*. 3. Edition. London : WB Saunders Co.; p. 463-82.
- Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, 427:148-154.
- generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122, 303–315.

- Gilchrist R.B., Ritter L.J., Myllymaa S., Kaivo-Oja N., Dragovic R.A., Hickey T.E., Ritvos O., Mottershead D.G. (2006) Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J Cell Sci* 119(Pt 18):3811–3821.
- Gook D.A., Edgar D.H., Borgl J., Martic M. (2008) Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Human Reproduction* Vol.23, No.2 pp. 394–402.
- Gosden RG, Laing SC, Felicio LS, Nelson JF, Finch CE, (1983) Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod* 28, 255–260.
- Gosden, R.G. (2004). Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? *Hum. Reprod. Update* 10, 193–195.
- Gougeon A. (1996) Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. *Endocr Rev*; 17: 121-155.
- Gövsa F. (2003) *Sistemik Anatomi*, İzmir: Güven Kitapevi.
- Green David P. L. (1997) Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction*, 2, 147–156.
- Greve J. M. & Wassarman P. M. (1985) Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.* 181, 253-264.
- Grove, J.E., Bruscia, E., and Krause, D.S. (2004). Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22, 487–500.
- Gürgen S.G. (2009) Kemoterapi uygulamasının sıçan ovarium follükülleri üzerine etkisi ve çeşitli antioksidanların koruyucu rollerinin yapısal ve immünohistokimyasal düzeyde belirlenmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji A.D.
- H, Glasser S. Amsterdam: Excerpta Medica:398-437.
- Heike, T., and Nakahata, T. (2004). Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int. J. Hematol.* 79, 7–14.
- Herbrandson C, (2005). Learning the Reproductive System, http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/Reproductive%20%20System.htm (Ulaşım 12 Ekim 2011).
- Herzog, E.L., Chai, L., and Krause, D.S. (2003). Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood* 102, 3483–3493.
- Heyting C. (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 389-396.
- Heyting C., Dettmers R.J., Dietrich A.J.J., Redeker E.J. and Vink A.C. (1988). Two major components of synaptonemal complexes are specific for meiotic prophase nuclei. *Chromosoma* 96: 325-332.
- Hodges CA, LeMaire-Adkins R, Hunt PA. (2001) Coordinating the segregation of sister chromatids during the first meiotic division: evidence for sexual dimorphism. *J Cell Sci* 114:2417–2426.
- Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La FR, Wood J, Strauss JF III, Boiani M, Scholer HR (2003) Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 300:1251-1256.
- Hunt P.A., Hassold T.J, (2002) Sex matters in meiosis. *Science* 296, 2181–2183.
- Ioannou JM, (1967) Oogenesis in adult prosimians. *J Embryol Exp Morphol* 17, 139–145.

- Jeffrey D. Bleil and Paul M. Wassarman. (1980) Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Cell Biology* 77(2), 1029–1033.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, et al. (2005). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122:303–315.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL, (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428, 145–150.
- Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2009) *Temel Histoloji, Text and Atlas. Dişi Üreme Sistemi. Çeviri Editörleri Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu, Prof. Dr. Yener Aytekin Nobel Kitapevleri. 11th edition Mc Graw- Hill Companies. s. 435-452.*
- Kerr JB, Duckert R, Myers M, (2006) Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction*
- Kierszenbaum A.L. (2006) *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology. Follicle Development and Menstrual cycle. Mosby.p.565-607.*
- Kumar T.R., Wang Y., Lu N., Matzuk M.M. (1997) Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet* 1997;15:201-4.
- Lammers J.H.M., Offenberg H.H., Van Aalderen M., Vink A.C.G., Dietrich A.J.J. and Heyting C. (1994) The gene encoding a major component of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1137-1146.
- Larsen W.J. (2001) *Human Embryology. 3rd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone; p. 12-13.*
- Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, et al. (2007). Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol* 25: 3198–3204.
- Liang L-F., Chamow S. M., Dean, J. (1990). Oocyte-specific expression of mouse Zp-2: Developmental regulation of the zona pellucida genes. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1507-1515.
- Liang L-F., Dean, J. (1993). Conservation of the mammalian secondary sperm receptor genes results in promoter function of the human homologue in heterologous mouse oocytes. *Dev. Biol.* 156, 399-408.
- Lin Y., Roy A., Yan W., Burns K. H., Matzuk M. (2007) Loss of Zona Pellucida Binding Proteins in the Acrosomal Matrix Disrupts Acrosome Biogenesis and Sperm Morphogenesis. *Molecular And Cellular Biology*, p. 6794–6805.
- Litscher E.S., Qi H., Wassarman P.M. (1999) Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2, and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes. *Biochemistry* 38, 12280–12287.
- Liu J.G., Yuan L., Brundell E., Bjorkroth B., Daneholt B. and Hoog C. (1996). Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp. Cell. Res.* 226: 11-19.
- Liu YF, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, Liu L, (2007) Germline stem cells and neogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol* 306, 112–120.
- Luoh S-W., Bain P.A., Polakiewicz R. D., Goodheart M. L., Gardner H., Jaenisch R., Page D. C. (1997) Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development*. p. 2275-84.
- Martins F.S., Celestino J.J., Saraiva M.V., Matos M.H., Bruno J.B., Rocha- Junior C.M., Lima-Verde I.B., Lucci C.M., Baó SN, Figueiredo J.R. (2008) Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of

goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. *Reprod Fertil Dev* 20(8):916–924.

Mehlmann L.M. (2005) Stops And Starts In Mammalian Oocytes: Recent Advances In Understanding The Regulation Of Meiotic Arrest And Oocyte Maturation. *Reproduction*. 2005 Dec;130(6):791-9.

Menke D.B., Koubova J., Page D.C., (2003) Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-posterior wave. *Dev Biol* 262, 303–312.

Meuwissen, R.L.J., Offenbergh H.H., Dietrich A.J.J., Riesewijk A., Van Iersel M. and Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J*. 11: 5091-5100.

Moore K.L, Persaud T.V.N (2009) The Developing Human. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi, In: Dalçık H. ve Yıldırım M., 8. Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri, (Philadelphia:WB Saunders), p.14-53.

Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 35–71.

Motta PM, Makabe S (1982)Development of the ovarian surface and associated germ cells in the human fetus. *Cell Tissue Res*, 226:493-510.

Motta PM, Makabe S (1986) Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three-dimensional microanatomical study by scanning and transmission electron microscopy. *J Submicrosc Cytol*, 18:271-290

Nahirney P.C., Ovale W.K. (2009) Netter Temel Histoloji. Çeviri editörleri: Muftuoğlu S., Kaymaz F., Atilla P. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; s.400-425.

Nayler, O., Stratling, W., Bourquin, J.P. (1998) SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res.*, 26:3542–3549.

Novak, I., Lightfoot, D.A., Wang, H., Eriksson, A., Mahdy, E., Hoog, C., (2006) Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells* 24, 1931–1936.
Offenbergh H.H., Dietrich A.J.J. and Heyting C. (1991). Tissue distribution of two major components of synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 101: 83-91.

Ollinger R, Alsheimer M, Benavente R, (2005) Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structure in the absence of meiotic chromosomes. *Mol Biol Cell* 16, 212– 217.

Orisaka M., Jiang J.Y., Orisaka S., Kotsuji F., Tsang B.K. (2009) Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis.

Pan J, Auersperg N (1998) Spatiotemporal changes in cytokeratin expression in the neonatal rat ovary. *Biochem Cell Biol*, 76:27-35.

Payer B., Saitou M., Barton SH., Thesher R., Discon JPC., Zahn D., Nakano T. and Suroni MA. (2003) Stella is maternal effect gene required for normal early development in mice. *Current Biology*, Vol. 13, 2110-2117.

Pellicer A., Albert C., Garrido N., Navarro J., Remohi J., Simon C.(2000) The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J. Reprod. Fertil. suppl* 2: 173-88.

Peng X., Yang M., Wang L., Tong C., Guo Z. (2010) In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. *J Assist Reprod Genet* 27(5):247–257.

Perez, G.I., Robles, R., Knudson, C.M., Flaws, J.A., Korsmeyer, S.J., and Tilly, J.L. (1999). Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by *Bax*-deficiency. *Nat. Genet.* 21, 200–203.

- Peters H, Crone M, (1967) DNA synthesis in oocytes of mammals. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 56, 160–170.
- Phillips D. M., Shalgi R. (1980). Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *J. Ultrastruct. Res.* 72, 1-12.
- Philpott C. C., Ringuette M. J., Dean, J. (1987). Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Dev. Biol.* 121, 568-575.
- Pittman D.L., Cobb J., Schimenti K.J, Wilson L.A., Cooper D.M., Brignull E, Handel M.A., Schimenti J.C., (1998) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1, 697–705.
- Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA, Schimenti JC, (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1, 697–705.
- Pousette A., Leijonhufwd P., Arver S., Kvist U., Pettari J. And Hoog C. (1997). Presence of synaptonemal complex protein 1 transversal filament-like protein in human primary spermatocytes. *Hum. Reprod.* 12: 2414-2417.
- Rankin T., Soyal S. , Dean J. (2000) The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 163: 21–25.
- Rankin T., Talbot P., Lee E., Dean J. (1999) Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 126, 3847–3855.
- Rich, I.N. (1995). Primordial germ cells are capable of producing cells of the hematopoietic system in vitro. *Blood* 86, 463–472.
- Richardson, S.J., Senikas, V., and Nelson, J.F. (1987). Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65, 1231–1237.
- Ringuette M. J., Chamberlin, M. E., Baur, A. W., Sobieski, D. A., Dean, J. (1988). Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein of the mouse zona pellucida. *Dev. Biol.* 127, 287-295.
- Romanienko P.J., Camerini-Otero R.D., (2000) The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 6, 975–987.
- Ross H.S. (2003) *Histology: A Text and Atlas. Female Reproductive System.* 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; p. 726-742.
- Sadler T. W. (2005) *Langman's Medical Embryology.* *Medikal Embriyoloji.* In: Başaklar C., 9. Baskı. Ankara Palme Yayıncılık, p.257-77.
- Saitou, M., Barton, S.C., and Surani, M.A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418, 293–300.
- Salzmann G.S., Greve J.M., Roller R.J., Wassarman PM. (1983) Biosynthesis of the sperm receptor during oogenesis in the Mouse. *The EMBO Journal* Vol.2 No.9 pp.1451–1456.
- Sato, M., Kimura, T., Kurokawa, K. (2002) Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech. Dev.*, 113:91–94.
- Scherthan H., Weich S., Schwegler H., Heyting C., Harle M. And Cremer T. (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J. Cell. Biol.* 134: 1109-1125.
- Simkins CS. (1932). Development of the human ovary from birth to sexual maturity. *Am J Anat* 51:465–505.

- Skinner SM, Dunbar BS (1992) Localization of a carbohydrate antigen associated with growing oocytes and ovarian surface epithelium. *J Histochem Cytochem*, 40:1031-1036.
- Smith A. and Benavente R. (1992). Identification of structural protein component of rat synaptonemal complexes. *Exp. Cell. Res.* 198: 291-297.
- Su Y.Q., Sugiura K., Wigglesworth K., O'Brien M.J., Affourtit J.P., Pangas S.A., Matzuk M.M., Eppig J.J. (2008) Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP-15 and GDF-9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135(1):111–121.
- Su, A.I., Cooke, M.P., Ching, K.A., Hakak, Y., Walker, J.R., Wiltshire, T., Orth, A.P., Vega, R.G., Sapinoso, L.M., Moqrich, A., et al. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6062–6067.
- Teixeira Filho F.L., Baracat E.C., Lee T.H., Suh C.S., Matsui M., Chang R.J., Shimasaki S., Erickson G.F. (2002) Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87(3):1337–1344.
- Tekelioğlu M. (2002) Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp A.Ş. yayınları.
- Telfer EE, (2004) Germline stem cells in the postnatal mammalian ovary: a phenomenon of prosimian primates and mice? *Reprod Biol Endocrinol* 2, 24.
- Telfer, E. E. et al. (2005) On regenerating the ovary and generating controversy. *Cel* 122, 821–822.
- Tilly JL, (2001) Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 838–848.
- Veitia RA, Gluckman E, Fellous M, Soulier J, (2007) Recovery of fertility after chemotherapy, irradiation and bone marrow allograft: further evidence against massive oocyte regeneration
- Waldeyer W (1870) Eierstock und Ei. Leipzig: Engelmann.
- Wartenberg H(1983) Germ cell migration induced and guided by somatic cell interaction. *Bibl Anat*, 24:67-76.
- Wassarman P. M. (2005) Contribution of Mouse Egg Zona Pellucida Glycoproteins to Gamete Recognition During Fertilization. *Journal Of Cellular Physiology* 204:388–391.
- Wassarman P.M. (1988) Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.*1988 57, 415–522.
- Wassarman P.M., Jovine L. and Litscher E. S.(2004) Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res.* 105:228–234.
- Weissmann A (1885) Die Continuitat des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung Jena: Fischer-Verlag.
- Yan C., Wang P., DeMayo J., DeMayo F.J., Elvin J.A., Carino C., Prasad S.V., Skinner S.S., Dunbar B.S., Dube J.L.(2001) Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol. Endocrinol*, 2001;15:854-66.
- Yanagimachi R. (1981) in *Fertilization and Embryonic Development in Vitro*, eds. Mastroianni, L. & Biggers, J. D. (Plenum, New York), pp. 81-182.
- Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ, (2006) Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol* 173, 497–507.

Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T, (1998). The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1, 707–718.

Yuan L, Liu J, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Ho¨ o¨ g C, (2000) The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 5, 73–83.

Zhang P, LX Lv, WJ Xing, (2010) Early Meiotic-Specific Protein Expression in Post-natal Rat Ovaries. Reproduction in Domestic Animals Volume 45, Issue 6, 447–453.

Zinn A.R., Tonk V.S., Chen Z., Flejter W.L., Gardner H.A., Guerra R., Kushner H., Schwartz S., Sybert V.P., Van Dyke D.L., Ross J.L. (1998) Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-p22.1. *Am. J. Hum. Gen.* p. 1757-66.

Zou K, Yuan Z, Yang ZJ, Luo HC, Sun KJ, Zhou L, Xiang J, Shi LJ, Yu QS, Zhang Y, Hou RY, Wu J, (2009) Production of offspring from a germline stem cell line derived from

Zuckerman S, (1951) The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* 6, 63–109.

Zuckerman, S., and Baker, T.G. (1977). The development of the ovary and the process of oogenesis. In *The Ovary*, S. Zuckerman and B.J. Weir, eds. (New York: Academic Press), pp. 41–67.

www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1269611236.ppt (Ulaşım: 14 Aralık 2011).

home.anadolu.edu.tr/~hzeytino/Mol.Gel.Bio.2.pdf (Ulaşım 3 Aralık 2011).

<http://genome.ucsc.edu>. (Ulaşım: 5 Mart 2011).

8. ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

➤ **Adı Soyadı** : GÖZDE YAZICIOĞLU

➤ **Doğum yeri ve tarihi:** ANKARA 23.08.1986

➤ **Uyruğu** : T.C.

➤ **Medeni Durumu** : BEKAR

İletişim Adresi : KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ A.D.

➤ **Telefon** : 0 262 3193912

2. Eğitimi

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2009-2012	Yüksek Lisans	Kocaeli Üniversitesi	Histoloji ve Embriyoloji A.D.
2003-2008	Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	Biyoloji
2000-2003	Lise	Ayrancı Lisesi	Fen Bilimleri

➤ **Yabancı dili:** İNGİLİZCE

3. Unvanları

BİYOLOG

4. Mesleki Deneyimi

Görev Dönemi	Ünvan	Yer	Bölüm
2009-2012	Yüksek Lisans Öğrencisi	Kocaeli Üniversitesi	Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji A.D.
2008 Temmuz	Stajyer	Özel Karadeniz Hastanesi	Merkez Laboratuvarı