



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TROFOBLASTİK HÜCRE ÜRÜNLERİNİN OOSİT  
KÜLTÜRÜNDEKİ YERİ**

HİLAL KABADAYI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

MANİSA-2016



REPUBLIC OF TURKEY  
CELAL BAYAR UNIVERSITY  
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

**THE ROLE OF TROPHOBLASTIC ITEMS  
IN OOCYTE CULTURE**

HİLAL KABADAYI  
MASTER'S THESIS

HISTOLOGY-EMBRYOLOGY DEPARTMENT

SUPERVISOR  
PROF. H. SEDA VATANSEVER

MANISA-2016

## BEYAN

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

HİLAL KABADAYI

İmza

## TEŞEKKÜR/ ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında değerli katkı ve desteğini yol göstericiliği ile esirgemeyen, kıymetli laboratuvar tecrübelerini paylaştan saygıdeğer Danışmanım Prof. Dr. H. Seda Vatansever'e

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaştan hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Kemal Özbilgin, Prof. Dr. V. Sevinç İnan, Prof. Dr. M. İbrahim Tuğlu ve Doç.Dr. Elgin Türköz Uluer'e,

Laboratuvar deneylerimde ve çalışmalarımnda katkılarını esirgemeyen asistan arkadaşlarıma ve özellikle Araş. Gör. Tuna Önal, Araş. Gör. Muhammed Yusuf Pekmezci, Biyolog Fatih Çöllü, Biyolog Damla Akoğulları ve Biyolog Sinem Kara'ya,

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'na deneylerime yaptıkları katkılardan dolayı,

Hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her ihtiyacıma cevap veren ve sabırla arkamda duran aileme ve sonsuz teşekkürleri, minnet ve şükranları borç bilirim.

Bu tez Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 2014-170 Yüksek Lisans tez projesi ile desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım

TEŞEKKÜR/ ÖNSÖZ .....	i
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	i
1. ÖZET .....	1
2.SUMMARY.....	3
1. GİRİŞ.....	4
2. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. KADIN GENİTAL ORGANLARI .....	5
4.1.1. Kadın İç Genital Organları .....	5
4.1.1.1. Ovaryum.....	5
4.1.1.2.Tuba uterina (salpinks, fallop kanalı) .....	9
4.1.1.3. Uterus.....	11
4.1.1.4. Vajina .....	14
4.1.2. Kadın Dış Genital Organları .....	15
4.2. KADIN ÜREME DÖNGÜSÜ .....	17
4.2.1. Hormonal Kontrol .....	17
4.2.2. Ovaryan Döngü .....	19
4.2.3. Folliküler Dönem.....	20
4.2.4. Luteal Dönem .....	20
4.2.5. Oogenez Ve Dominant Follikülün Gelişimi.....	21
4.2.6. Ovulasyon.....	28
4.2.7. Korpus Luteumun Oluşumu .....	30
4.2.8. Luteolizis .....	31
4.2.9. Endometriyal Döngünün Kontrolü .....	31
4.2.9.1. Proliferatif dönem.....	32
4.2.9.2. Sekretuar dönem.....	34
4.2.9.3. Menstrual dönem .....	34
4.2.10. Uterus Serviksinde Döngüsel Değişimler .....	35
4.2.10.1. Vajinal döngü .....	35
4.3. YOLK KESESİNDEN PUBERTEYE KADAR OOSİT MATURASYONU .....	35
4.4. PLASENTA.....	37
4.5. KÖK HÜCRELER.....	44
4.5.1. Embriyonik Kök Hücreler .....	45
4.5.2. Plasenta Kaynaklı Kök Hücreler.....	46

4.5.3. Trofoektodermin İleri Gelişmesi .....	47
<b>4.5.4. Trofoblast Kök Hücreleri</b> .....	<b>50</b>
4.5.5.Reproduktif Tıp Uygulamalarında Kök Hücreler .....	52
4.6. OOSİT MATURASYONUNUN KONTROLÜ .....	53
4.6.1. Matürasyonu Düzenleyici Faktör (Maturation Promoting Factor-MPF).....	55
4.6.2. Siklin B1.....	56
4.6.3. Anafaz Düzenleyici Kompleks (Anaphase Promoting Complex-APC).....	58
4.6.4. Mitoz Arrest Yetmezlik Proteini 1 (Mitotic Arrest-Deficient- MAD1) .....	59
4.4.5. Mitoz Arrest Yetmezlik Proteini 2 (Mitotic Arrest-Deficient- MAD2) .....	59
4.6.6. RAS .....	61
4.7. İN VİTRO MATÜRASYON (IVM) .....	62
4.7.1. İn Vitro Maturasyonda Kullanılan Vasatlar .....	64
5. GEREÇ VE YÖNTEM .....	67
5.1 DENEY HAYVANI.....	67
5.2. TROFOBLAST KÖK HÜCRE ELDESİ.....	67
5.3. TROFOBLAST KÖK HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU .....	70
5.4. OOSİT ELDESİ VE KÜLTÜRÜ .....	71
5.5. OOSİTLERİN İMMUNOFLORESAN BOYAMASI .....	73
5.6. EMBRİYO VE PLASENTA IŞIK MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ.....	74
5.7. DOKU HİSTOKİMYASAL BOYAMASI.....	74
5.8. DOKU İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMASI .....	75
5.9. DNA METİLASYONU ANALİZİ.....	77
5.9.1. DNA İzolasyonu .....	77
5.9.2. DNA Metilasyonu .....	78
6.BULGULAR.....	80
6.1. TROFOBLAST ELDESİ VE KÜLTÜRÜ .....	80
6.2. TROFOBLAST KÜLTÜRÜ VE KARAKTERİZASYONU .....	86
6.3. ANTİKOR İMMUNOREAKTİVİTELERİ.....	88
6.3.1. APC İmmunoreaktivitesi.....	88
6.3.2. MAD1 İmmunoreaktivitesi .....	91
6.3.3. MAD2 İmmunoreaktivitesi .....	94
6.3.4. RAS İmmunoreaktivitesi.....	97
6.3.5.MPF İmmunoreaktivitesi.....	100

6.3.6. SiklinB-1 İmmünoreaktivitesi .....	103
6.4. DNA Metilasyon Analiz Sonuçları.....	106
7. TARTIŞMA.....	108
8. KAYNAKLAR.....	116
9. ÖZGEÇMİŞ.....	121



## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Fare trofoblast serisi hücrelerinin farklılaşmasında rol alan genler, ifade yerleri ve mutasyon etkileri (Can, 2014).....	50
Tablo 2: Hematoksilen- Eozin boyaması.....	73
Tablo 3: İmmunoperoksidaz boyaması.....	74
Tablo 4: DNA metilasyonu yapılan gruplar. NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, TR: Trofoblast kök hücreleri ile ko-kültür yapılan gruplar, M2: M2 vasat ile kültüre edilmiş gruplar, CM: Trofoblast kök hücresi kültür vasatı ile kültüre edilmiş grupları ifade etmektedir. ....	76
Tablo 5: Deney gruplarına ait immunoreaktivite değerlendirmesi .....	103





## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kadın iç genital organları posterior görünümü, ( <a href="https://www.google.com.tr/search?q=female+reproductive+system+internal+organs&amp;biw=1164&amp;bih=523&amp;source=lnms&amp;tbm=isch&amp;sa=X&amp;ved=0ahUKEwjv5iaiZPOAhXiKMAKHf uAD48Q_AUIBigB#imgsrc=gcLJiEvKB4oFCM%3A">https://www.google.com.tr/search?q=female+reproductive+system+internal+organs&amp;biw=1164&amp;bih=523&amp;source=lnms&amp;tbm=isch&amp;sa=X&amp;ved=0ahUKEwjv5iaiZPOAhXiKMAKHf uAD48Q_AUIBigB#imgsrc=gcLJiEvKB4oFCM%3A</a> , erişim tarihi 27.07.2016).....	7
Şekil 2: Ovaryumun şematik çizimi (Ghofrani, 2014).....	10
Şekil 3: Tuba uterina ve kısımları ( <a href="https://global.britannica.com/science/fallopian-tube">https://global.britannica.com/science/fallopian-tube</a> , erişim tarihi: 24.07.2016).....	11
Şekil 4: Uterus tabakaları ( <a href="http://slideplayer.com/slide/6364127/">http://slideplayer.com/slide/6364127/</a> , Erişim tarihi: 24.07.2016). .....	15
Şekil 5: Vajina ve kısımları ( <a href="http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Vulvar+Vestibulitis&amp;lang=4">http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Vulvar+Vestibulitis&amp;lang=4</a> , erişim tarihi: 24.07.2016).....	17
Şekil 6: Dişi menstruasyon döngüsünün hormonal kontrolü. <a href="https://classconnection.s3.amazonaws.com/179/flashcards/3995179/png/flashcard_download-14616F1F2AF65D0A951.png">https://classconnection.s3.amazonaws.com/179/flashcards/3995179/png/flashcard_download-14616F1F2AF65D0A951.png</a> . Erişim tarihi: 10.08.2016.....	19
Şekil 7: Follikül gelişimi <a href="https://classconnection.s3.amazonaws.com/245/flashcards/2198245/jpg/oocyte1366496131622.jpg">https://classconnection.s3.amazonaws.com/245/flashcards/2198245/jpg/oocyte1366496131622.jpg</a> , erişim tarihi: 10.08.2016.....	23
Şekil 8: Oosit granüloza hücreleri arasında bulunan gap junction'lar. <a href="https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/2011_Group_2_Project">https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/2011_Group_2_Project</a> , erişim tarihi: 10.08.2016.....	26
Şekil 9: Oosit ve kumulus kompleksi. <a href="https://www.studyblue.com/notes/n/block-1/deck/4611742">https://www.studyblue.com/notes/n/block-1/deck/4611742</a> , Erişim tarihi: 10.08. 2016.....	29
Şekil 10: Endometrial Döngü ve safhaları. <a href="http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202007/chapter_22%20Fall%202007.htm">http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202007/chapter_22%20Fall%202007.htm</a> . Erişim tarihi: 16.08.2016. ....	32
Şekil 11: 3 haftalık embriyoda yolk kesesi duvarında allantois bağlantısına yakın bir yerde primordial germ hücrelerini gösteren şematik çizim. <a href="http://www.murattosun.com/faculty/Genel%20Embriyoloji%20(2013)%20Total.pdf">http://www.murattosun.com/faculty/Genel%20Embriyoloji%20(2013)%20Total.pdf</a> , Erişim tarihi: 10.08.2016.....	35
Şekil 12: Uterus ve fetal membranlar (Kierszenbaum, 2006) .....	37
Şekil 13: Plasentanın anatomisi ve fizyolojisi (Kierszenbaum, 2006).....	38
Şekil 14: Primer villuslar (Ross, 2016).....	39
Şekil 15: Sekonder (a) ve tersiyer (b) koryonik villuslar (Ross, 2016).....	40
Şekil 16: Gebeliğin üçüncü trimesterindeki insan plasental bariyeri (Ross, 2016). ....	41
Şekil 17: İmplantasyondan sonra ortaya çıkan trofoblast hücre türevleri (Can, 2014).....	47
Şekil 18: Fare blastokistinde postkoital 3,5 günde hücrelerde kutuplaşma olur. Trofoektoderm hücreleriyle iç hücre kitlesi ayrılır. Blastokistin embriyo kutbundaki hücreler polar trofoektoderm olarak farklı bir yapı kazanır. Bu hücreler 6. Gündeki yumurta silindiri içindeki trofoblast kök hücrelerini oluşturur (Can, 2014).....	49
Şekil 19: Fertilizasyon sonrası DNA metilasyonu (Smallwood, 2012) .....	52
Şekil 20: İnsan oositinin moleküler ve hücrel maturasyonu (Gosden ve Lee, 2010). ....	53

Şekil 21: Oosit maturasyonu sırasında MPF aktivitesi. <a href="https://www.researchgate.net/figure/263760816_fig1_Fig-1-Schematic-diagram-of-oocyte-maturation-in-Xenopus-The-figure-shows-the-changes">https://www.researchgate.net/figure/263760816_fig1_Fig-1-Schematic-diagram-of-oocyte-maturation-in-Xenopus-The-figure-shows-the-changes</a> . Erişim tarihi: 14.08.2016 .....	54
Şekil 22: Siklin B1, MPF ve APC ilişkisi.....	56
Şekil 23: Mayoz bölünme esnasında MAD1, MAD2 ve APC ilişkisi (Jones ve ark, 2013...)	59
Şekil 24: Çalışmada yer alan deney grupları. Sırasıyla 24, 36 ve 48 saat Hcg uygulaması farelerden elde edilen Profaz I, Metafaz I ve Metafaz II oositler M2 kültür vasatı, Trofoblast kök hücre kültür vasatı (CM) ve Trofoblast kök hücreleriyle ko-kültür yapılmıştır.....	71
Şekil 25: Yaklaşık 60 somit bulunduran 13,5 günlük embriyo görüntüsü (Kaufman, 1994). .	79
Şekil 26: Plasentaya ait yapılar. <a href="https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Placenta_Development">https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Placenta_Development</a> , erişim tarihi: 29.07.2016.....	82
Şekil 27: DNA metilasyonunda yer alan negative ve pozitif kontrol değerleri eğim grafiği. .....	104
Şekil 28: Deney gruplarında DNA metilasyon değerleri. ....	105
Şekil 29: <a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04114+K06679">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04114+K06679</a> erişim tarihi: 20.07.2016. ....	109
Şekil 30: <a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04114+K06679">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04114+K06679</a> , erişim tarihi: 20.07.2016. ....	111

## RESİM LİSTESİ

Resim 1: Fareden smear örneği. Hematoksilen-Eozin boyaması. Ölçek: 20µm.....	68
Resim 2: Trofoblast Eldesi. A-B: 14 günlük embriyo ve plasenta eldesi, C: Plasentanın PBS içerisinde yıkanması, D: Plasentanın mekanik disseksiyonu.....	69
Resim 3: Enzimatik reaksiyon sonrası plasentadan elde edilen trofoblast hücreleri. Ölçek: 100 µm.....	69
Resim 4: Trofoblast kök hücre kültürünün 5. (A) ve 11. (B) gün. Ölçek: 50 µm.....	70
Resim 5: Oosit ko-kültür işlemi için mitomisin C işlemi ile inaktive edilmiş trofoblast kök hücreleri. Ölçek 100 µm.....	71
Resim 6: Sakrifiye işleminden sonra sırasıyla 24 (A), 36 (B) ve 48 (C) saat gonadotropin uygulanmış fare ovaryumları. X40.....	71
Resim 7: 24 (A), 36 (B) ve 48 (C) saat gonadotropin uygulanmış farelerden elde edilen oositler. Ölçek 100 µm.....	72
Resim 8: Antikorlar ile + 4°C'de 30-36 saat inkübe edilmiş oositler.....	74
Resim 9: Elisa metodu ile global DNA metilasyon ölçümü sırasında stop solusyonu sonrası örneklerde meydana gelen renk değişimi.....	79
Resim 10: 14 günlük embriyoya ait görüntü. H-E boyaması (Sagital kesit). Ölçek: 200.....	82
Resim 11: 14 günlük embriyoya ait görüntü (Transvers kesit). H-E boyaması. Ölçek: 200 µm.....	83
Resim 12: 13,5 günlük embriyo ve plasentaya ait H-E boyaması.....	85
Resim 13: Sitokeratin 7 ile immunohistokimyasal boyaması yapılmış 14. Gün embriyo plasentası. Ölçek A-200 µm, B-50 µm.....	86
Resim 14: 14,5 günlük fare plasentasından elde edilen trophoblast kök hücre karakterizasyonu için sitokeratin-7 immunoreaktivitesinin mitomisin C uygulaması	

öncesi	belirlenmesi.	A,	B-	10
µm.....				87
Resim 15: 14,5 günlük fare plasentasından elde edilen trophoblast kök hücre karakterizasyonu için sitokeratin-7 immunoreaktivitesinin mitomisin C uygulaması sonrası	belirlenmesi.	A,	B-	10
µm.....				87
Resim 16: 14,5 günlük fare plasentasından elde edilen trophoblast kök hücre karakterizasyonu için yapılan indirekt-histokimyasal boyamada kontrol grubu.		A,	B-	10
µm.....				87
Resim 17: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında APC immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				88
Resim 18: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında APC immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				89
Resim 19: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında APC immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				90
Resim 20: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında MAD1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				91
Resim 21: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında MAD1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				92
Resim 22: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında MAD1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.				
µm.....				93
Resim 23: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında MAD2 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				94
Resim 24: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında MAD2 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				95
Resim 25: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında APC immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				96
Resim 26: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında RAS immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				97
Resim 27: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında RAS immunoreaktivitesi. Ölçek: 200				
µm.....				

Resim 28: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında RAS immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 $\mu\text{m}$ .....	99
Resim 29: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında MPF immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 $\mu\text{m}$ .....	100
Resim 30: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında MPF immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 $\mu\text{m}$ .....	101
Resim 31: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında MPF immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 $\mu\text{m}$ .....	102
Resim 32: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında Siklin B1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 $\mu\text{m}$ .....	103
Resim 33: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında Siklin B1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 $\mu\text{m}$ .....	104
Resim 34: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında Siklin B1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 $\mu\text{m}$ .....	105

## KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

APC/C: Anaphase-promoting complex/cyclosome

bFGF: Fibroblast temel büyüme faktörü

BSA: Bovine serum albümine

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: Kalsiyum klorid dihidrat

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

Cdc2: Cell Division cycle mutant

Cdc25: Cell Division cycle mutant 25

CDK1: Siklin bağımlı kinaz 1

Cdx2: Kaudal homeobaks geni

c-kit: Tirozin proteinaz kinaz kit

CM: Trofoblast kök hücre vasatı oosit kültür grubu

CPE: Sitoplazmik poliadenilasyon elementi

CPEB: Sitoplazmik poliadenilasyon elementi bağlayıcı

CSF: Sitotoksik faktör

DAB: Diaminobenzidine kromojeni

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

EKH: Embriyonik kök hücreleri

Elf5: E74-like factor 5

Emi2: Erken mitotik inhibitör 2

Erp1: Early mitotic inhibitor 1- related protein 1

Esrrb: Estrogen related receptor beta

Ets2: E26 transformation-specific 2

FCS: Fötal dana serumu

FGF 2: Fibroblast büyüme faktörü 2

FGF4: Fibroblast büyüme faktörü 4

FGFR2: Fibroblast büyüme faktörünü reseptörü 2

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FoxD3: Forkhead box D3

FSH: Follikül uyarıcı hormon

Gja4: Gap junction alfa 4 proteini

GnRH-a: Gonadotropin realising hormone-analogs

GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon  
GVBD: Germinal vezikül break down  
hCG: İnsan koryonik gonadotropin  
HLA-A: İnsan lenfosit antijeni A  
HLA-B: İnsan lenfosit antijeni B  
HLA-G: İnsan lenfosit antijeni G  
HMG: Human menopausal gonadotropin  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit  
IFN- $\gamma$ : İnterferon  $\gamma$   
IGF-1: İnsülin benzeri - büyüme faktörü-1  
İHK: İç hücre kitlesi  
IL-8: İnterlökin 8  
IVM: İn vitro maturasyon  
LH: Luteinizan hormon  
MAD1: Mitoz Arrest Yetmezlik Proteini 1  
MAD2: Mitoz Arrest Yetmezlik Proteini 2  
MCP-1: Monosit kemoatraktan protein 1  
MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O: Kalsiyum klorid hegzahidrat  
MHC-II: Majör doku uyumluluğu kompleksi II  
MIP-1 $\alpha$ : Makrofaj influmatuvar protein 1 $\alpha$   
MMP: Matriks metalloproteinaz  
Mos: Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog  
MPF: Maturasyon düzenleyici faktör  
MI: Mayoz I  
Oct 4: Octamer-binding transcription factor 4  
OHSS: Ovarian hyperstimulation syndrome  
PAF: Platellet aktive edici faktör  
PAI: Plazminojen aktivatör inhibitörü  
PAS boyası: Periodik asit shiff boyası  
PBS: Fosfat tamponlu solusyon  
PCOS: Polikistik over sendromlu

PGH: Primordial germ hücreleri

pH: Power of hydrogen

RANTES: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

Sox2: Sex determining region Y

TB: Trofoblast hücreleri

TEAD: TEA Domain

TF: Transkripsiyon faktörü

Thy-1: Timosit antijen 1

TKH: Trofoblast kök hücreleri

TIMP: Metalloproteinazların doku inhibitörleri

TNF- $\alpha$ : Tümör nekrozis faktör  $\alpha$

TR: Trofoblast kök hücre oosit ko-kültür grubu

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ZP1: Zona pellusida glikoproteini 1

ZP2: Zona pellusida glikoproteini 2

ZP3: Zona pellusida glikoproteini 3



**Başlık: Trofoblastik hücre ürünlerinin oosit kültüründeki yeri**

**Öğrencinin adı: Hilal KABADAYI**

**Danışman: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER**

**Anabilim Dalı: Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı**

## **1. ÖZET**

**Amaç:** Çalışmamızda elde edilecek trofoblastik hücre ürünlerinin oosit kültüründe kullanılması ve oosit matürasyonuna olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda 14,5 günlük gebe farelerden enzimatik işlem sonucunda trofoblast kök hücreleri elde edildi. Ardından kültür işlemi için profaz I, metafaz I ve metafaz II oositler dişi farelerden elde edilerek M2 kültür vasatı, trofoblast kök hücre kültür vasatı (CM) ve trofoblast kök hücreleri (TR) ile 48 saat kültüre edildikten sonra her gruptan oositler immunofloresan boyama ile anti-APC, anti-MAD1, anti-MAD2, anti-RAS, anti-MPF ve anti-Siklin B1 immunoreaktivitesinin tespiti ve DNA metilasyon analizi için ayrıldı.

**Bulgular:** Trofoblast kök hücreleri plasentadan elde edilerek sitokeratin-7 pozitif olmasıyla karakterizasyonu yapıldı. Profaz I, metafaz I ve metafaz II aşamalarında toplanan oositlerin M2, CM ve TR kültür ortamında kültürleri sonrasında APC immün reaktivitesinin en fazla TR profaz I grubunda, MAD1 immünoreaktivitesinin TR grubunda metafaz II'de olduğu ve diğer gruplarda daha erken dönemde pozitiflik gösterdiği saptandı. MAD2 immünoreaktivitesi ise en fazla CM grubunda, RAS immünoreaktivitesi en az TR grubunda iken diğer gruplarda beklenen şekilde idi. Siklin B1 immünoreaktivitesi tüm gruplarda az iken MPF immünoreaktivitesinin özellikle CM grubundaki tüm oositlerde ve M2 grubundaki metafaz II oositlerde olduğu saptandı. DNA metilasyonunun en fazla M2 metafaz II oositlerde olduğu bunu CM grubundaki metafaz II oositin takip ettiği gözlemlendi.

**Sonuçlar:** Çalışmada ana bilim dalımızda plasentadan ilk defa trofoblast kök hücre eldesi protokolü geliştirilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen oositlerin kültürleri sonrasında CM kültür vasatının RAS, MPF ve MAD2 ekspresyonlarındaki artışa, APC ve siklin B1 ekspresyonundaki azalmaya sebep

olmasından dolayı in vitro oosit maturasyonu kültürü açısından uygun olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Trofoblast kök hücreleri hücreleri, oosit, matürasyon, RAS, MAD1 ve MAD2.



**Title: The role of trophoblastic items in oocyte culture**

**Student name: Hilal KABADAYI**

**Supervisor: Professor Dr. H. Seda VATANSEVER**

**Department: Histology and Embryology**

## **2.SUMMARY**

**Aim:** In this study we aimed to investigate the role of trophoblastic items on oocyte maturation and oocyte arrest.

**Material methods:** Trophoblast stem cells isolated from 14,5 days mouse embriyo plasentas. Prophase I, metaphase I and metaphase II oocytes collected from mice and cultured in M2 culturing media, trofoblast stem cells culturing media (CM) and with trofoblast stem cells for 48 hours. Then the oocytes were seperated into two main groups for whole mount immunohistochemistry, that we anaylsed the immuno reactivity of anti-APC, anti- MAD1, anti-MAD2, anti-RAS, anti-MPF and anti-cyclin B-1, and also for DNA methylation analyses.

**Results:** Trophoblast stem cells were cultured and characterised with cytokeratin 7. After culturing prophase I, metaphase I and metaphase II oocytes in M2, CM, TR medium APC immunoreavtivity was highest in TR prophase I. MAD1 immunoreactivity was only detected in TR metaphase II whereas the other groups was positive at the earlier stages. Although MAD2 immunoreactivity was higher in CM group RAS immunoreactivity was minimum in TR group and the other groups showed the immunoreactivity as they were expected. The immunoreactivity of cyclin B1 was weak in all groups however MPF immunoreactivity detected in all oocytes of CM and metaphase II of M2. While the low level of DNA methylation was detected at CM metaphase II oocytes, the highest ratio was observed in M2 metaphase II oocytes.

**Discussion:** The protocol of trophoblast stem cells derivation was obtained for the first time in our department and characterised. Because of increase of RAS, MPF and MAD2 immunoreactivity and decrease of APC and Cyclin B1 after culturing of oocytes in CM, this culture condition might support the in vitro oocyte maturation.

**Keywords:** Trophoblast cells, oocyte, maturation, RAS, MAD

## 1. GİRİŞ

Oosit gelişimi, embriyonik dönemde primordial germ hücrelerinden farklılanarak mezenşimal farklılaşma bölgesi olan genital kabarıklık adı verilen bölgeye göç ederek farklılaşma sürecine girer. Doğuma kadar mitoz ve mayoz bölünme ile primordial germ hücrelerinin oluşumu ile puberteye kadar gelişim sürecinde duraklama dönemine girer. Puberte ile birlikte primordial folliküllerin ileri farklılaşması sonucunda mayoz I tamamlanır ve ovarian siklus ile gelişen folliküllerden sekonder oosit atılımı gerçekleşir. Oositin mayoz I ve II evrelerindeki çekirdek ve sitoplazmik değişiklikleri oosit matürasyonu olarak tanımlanır. Kadın infertilitesinde oosite ait problemler içerisinde sayılan oosit matürasyon problemleri, oositin in vitro kültürü ile desteklenebilir iken, diğer problemler ve/veya infertilite nedeni ile kullanılan ilaçlar oosit matürasyonunu da etkileyebilmektedir. Bu sebeplerden dolayı matürasyon problemlerinde veya oosit eldesi sonrasında matürasyonu tamamlayamamış oositlerde in vitro kültür sistemleri geliştirilmesi önemlidir. Özellikle oosit matürasyonunun hangi aşamada aksadığı ve rol oynayan moleküler faktörlerin ekspresyonlarının başlatılması veya azaltılması (matürasyon için gerekli olan şartlar doğrultusunda) tanımlanması önemli araştırma konularındandır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 4.1. KADIN GENİTAL ORGANLARI

Kadın genital organları iç genital organlar (organa genitalia feminina interna) ve dış genital organlar olmak üzere iki gruba ayrılarak incelenir.

#### 4.1.1. Kadın İç Genital Organları

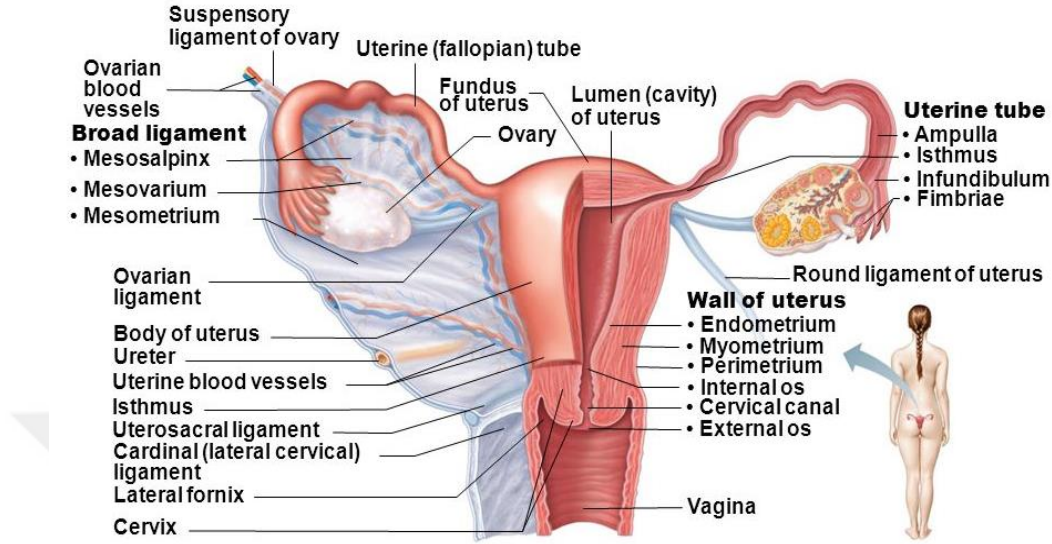
Kadın iç genital organları, pelvis minör içerisine yerleşmişlerdir. Bu organlar; ovaryum, tuba uterina, uterus ve vajina olarak sıralanabilir.

##### 4.1.1.1. Ovaryum

Dişi üreme hücresi olan oositi ve dişiye özgü östrojen, progesteron ve inhibin gibi seks hormonlarını üretmekle görevli olan ovaryumlar erkek üreme sistemindeki testislerin karşılığıdır. Ovaryumlar pimitif gonadın kortikal bölgesinden gelişirler ve farklılaşmamış gonadın kortikal bölgesi, başlangıçta primer seks kordonları içerir. Bu kordonlar, sölom epitelinden mezenşim içine uzanırlar. Yedinci günün ardından, primer hücre kordonlarındaki hücreler dejenere olur ve bunların yerini, oogonyumların etrafını çevreleyen sekonder seks kordonları alır (Kierszenbaum, 2006).

Ovaryumlar pelvis minör içerisinde fosso ovarica adı verilen çukurda yerleşmişlerdir. Arteria iliaca externa ve arteria iliaca interna arasında bulunan bu çukuru aşağı ve önden ligamentum latum uteri'nin tabanı, yukarıdan arteria iliaca externa ve arkadan üreter sınırlar (Şekil 1).

Ovaryumlar pembemsi gri renkli olup, puberteden önce yüzeyleri düz iken puberteden sonra pürüzlü hale gelir. Ovaryumlar, 4 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığında ve yaklaşık 5 gram ağırlığındadır (Şekil 1) (Çelik, 2013).



Şekil 1: Kadın iç genital organları posterior görünümü, ([https://www.google.com.tr/search?q=female+reproductive+system+internal+organs&biw=1164&bih=523&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjkv5iaiZPOAhXiKMAKHfuAD48Q\\_AUIBigB#imgrc=gclJiEvKB4oFCM%3A](https://www.google.com.tr/search?q=female+reproductive+system+internal+organs&biw=1164&bih=523&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjkv5iaiZPOAhXiKMAKHfuAD48Q_AUIBigB#imgrc=gclJiEvKB4oFCM%3A), erişim tarihi 27.07.2016)

Ovaryumlar peritoneum ile dıştan çevrelenmişlerdir. Hilus bölgesinden bir periton katlantısı olan mezovaryum ile uterusun geniş ligamentinin arkasına tutunurlar. Hilusta mezovaryum, ovaryumun yüzeyini döşeyen tek katlı kübik, yer yer tek katlı yassı bir epitel olan germinal epitel ile devam eder. Germinal epitelin altında tunika albuginea olarak isimlendirilen sıkı bir bağ dokusu tabakası yer alır. Yüzey epiteline 'germinal epitel' denilmesinin nedeni embriyonik dönemde ovaryum germ hücrelerinin kökenini oluşturduğunun düşünülmesindedir. Günümüzde pek çok klasik kaynakta primodiyal germ hücrelerinin kökeninin ekstragonadal olduğu, bu hücrelerin embriyonik yolk saktan göç ederek farklılaştığı ve ovaryumun farklılaşmasını uyardığı belirtilmektedir. Ancak son yıllarda bir grup araştırmacının erişkin kadınlarda germinal epitelden oosit geliştirmeyi başarması bu tartışmanın yeniden gündeme gelmesine yol açmıştır (Ross 2016). Bazı in vitro ve in vivo

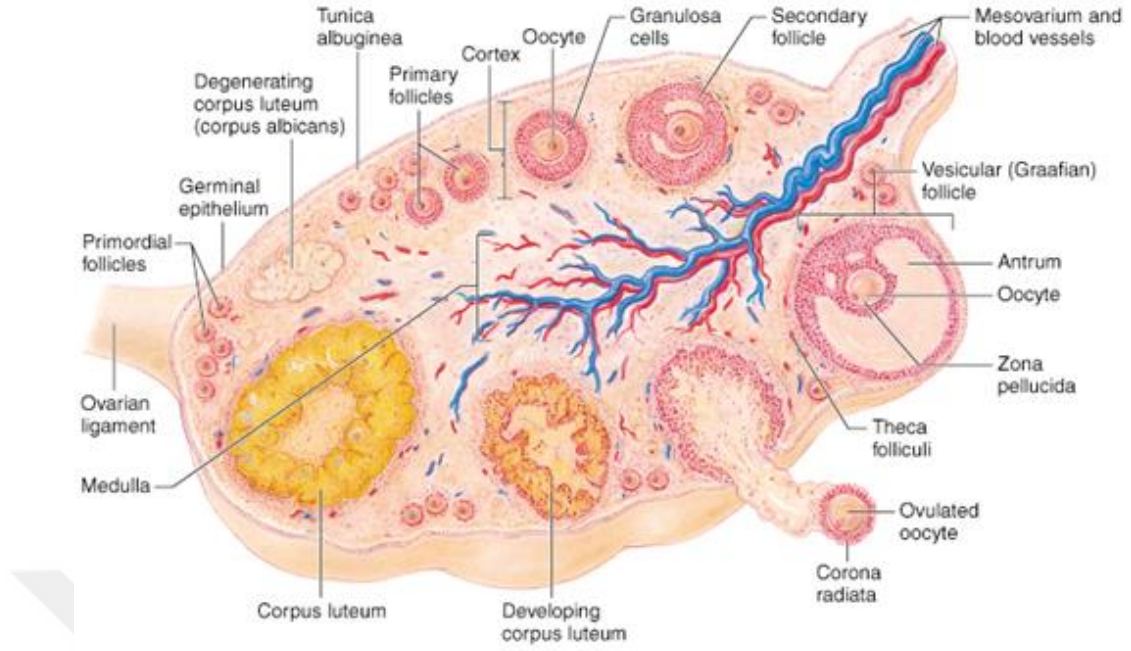
araştırmalar sonucunda fetal ve erişkin insan gonadlarındaki sekonder germ hücrelerinin ve primitif granüloza hücrelerinin germinal epitelden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Ross 2016). Embriyonik kök hücre özelliğine sahip bu epitel hücrelerinden in vitro ortamda oosit üretilmesi, germinal epitelin erken ovaryum yetmezliğine girmiş veya postmenapoz dönemindeki hastalar için yeni bir oosit kaynağı olabilir. Bu alanda çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Son yıllarda tunika albugineanın da mezenkimal hücrelerinin de primer folliküllere, primitif granüloza hücrelerine ve germ hücrelerine kaynak teşkil eden bir bipotent progenitör hücre grubu olduğu düşünülmektedir (Ross 2016). Bu gözlemlere ilaveten, tunika albugineada bulunan sitokeratinden zengin mezenkimal hücrelerin mezenkimal-epitelyal etkileşimle germinal epitel hücrelerine farklılaştığı da gösterilmiştir (Ross 2016).

Kollajen liflerden zengin Tunica albuginea'nın hemen altında ovaryum esas dokusu yer alır. Esas doku dışta korteks ovarii içte medulla ovarii olmak üzere iki bölüme ayrılır. Korteks ovaride farklı gelişim evrelerinde olan folliküller ve bunların arasını dolduran bağ dokusu bulunur. Medulla ovarii ise; ovaryuma giren bağ dokusu, interstisyel hücreler, sinirler, lenf ve kan damarlarından oluşmuştur (Şekil 2).

Ovaryumda, histolojik özellikleri birbirinden farklı olan korteks ile medulla arasında, keskin bir sınır bulunmaz. Çeşitli gelişim aşamalarında bulunan folliküllerin bulunduğu kortekste folliküller arasını dolduran stroma düz kas hücrelerini ve retiküller lifleri içerir. Kortekste puberteden önce sadece primordiyal folliküller izlenirken, puberteden sonra primer, sekonder ve tersiyer folliküllere rastlanır. Seksüel olgunluk döneminde folliküllerden başka, folliküllerden gelişen korpus luteum ve atretik folliküller de görülür. Puberteden önce korteks ovarideki folliküller herhangi bir gelişme göstermeyip primer follikül olarak kalırlar. Bu folliküllerin sayısı yaklaşık 400.000 olup puberteden sonra çeşitli evrelerden geçerek graaf follikülü halini alırlar. Graaf follikülünün olgunlaşması ile içerisinde bulunan oosit dışarı atılır (ovulasyon) ve geriye kalan yapı korpus luteum adını alır. Korpus luteum progesteron salgılar ve gebeliğin ilk altı ayı boyunca fonksiyonunu devam ettirir. Altı aydan sonra korpus luteumun görevini plasenta yapar. Gebeliğin olmadığı durumlarda korpus luteum, korpus albicansa dönüşür. Bir kadın doğurganlık dönemi boyunca ortalama 400 kez ovulasyon gerçekleşir (Ross, 2016, Çelik, 2013 ve Kierszenbaum, 2006).

Dişilerde oogenez, fetal yaşamda primordiyal germ hücreleri olan oogonyumların mitozla bölünerek çoğalması ile başlar. Embriyonik hayatın birinci ayından sonra, primordiyal germ hücreleri (oogonyumlar) vitellus kesesinin allantoise yakın duvarında endoderm hücreleri arasında ortaya çıkarlar. Bu hücreler genital kabartı bölgesine göç ederken birkaç kez mitoz bölünme geçirirler. Oogonyumlar, oluşacak ovaryum korteksi içinde toplanırlar. Mitoz bölünmeler fetal yaşamın 5. ayına kadar devam eder. Fetal hayatın 3. ayından itibaren bazı oogonyumlar mayoz bölünmenin profaz dönemine girerler, primer oosit haline dönüşürler. Doğumda oositlerin gelişimi 1. mayoz bölünme safhasında duraklar. Puberteye ulaşıldığında normalde her menstrual siklusta bir oosit olgunlaşarak atılır. Oositlerin 1. mayoz bölünmesi ovulasyondan hemen önce tamamlanır. Bu durumda primer oositler profaz safhasında 12-50 yıl kalabilirler. Olgun follikülde 1. mayoz bölünme tamamladığında primer oositlerden oluşan iki yavru hücre eşit miktarda kromatin alır, ancak sitoplazma dağılımı eşit gerçekleşmez. Sitoplazmanın büyük bölümünü alan yavru hücre sekonder oosit haline dönüşür. Az miktarda sitoplazma içeren diğer yavru hücreden 1. polar cisimcik oluşur. Sekonder oosit 1. mayoz bölünmesini bitirince, 2. mayoz bölünmeye girer. Korona radyata ile çevrili sekonder oosit ovulasyonla atıldığı sırada 2. mayoz bölünme devam etmektedir. Bu bölünme de metafaz II safhasında duraklar. İkinci mayoz bölünme ancak oosit bir spermatozoon ile döllenirse tamamlanır. Bu bölünme sonrasında da olgun bir ovum ve 2. polar cisimcik oluşur. Polar cisimcikler dejenere olup ortadan kalkar. Oositlerin gelişimi için gerekli olan mikroçevreyi folliküller sağlar. Menapozdan sonraki birkaç yıl içinde ovaryumlarda kalan tüm oositler ortadan kalkar (Çelik, 2013 ve Kierszenbaum, 2006).





Şekil 2: Ovaryumun şematik çizimi (Ghofrani, 2014).

Ovaryumun başlıca; dişi gamet üretimi, östrojen ve progesteron salgılanması, doğumdan sonra üreme organlarının büyümesinin düzenlenmesi ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi gibi başlıca fonksiyonları vardır (Kierszenbaum, 2006).

#### 4.1.1.2.Tuba uterina (salpinks, fallop kanalı)

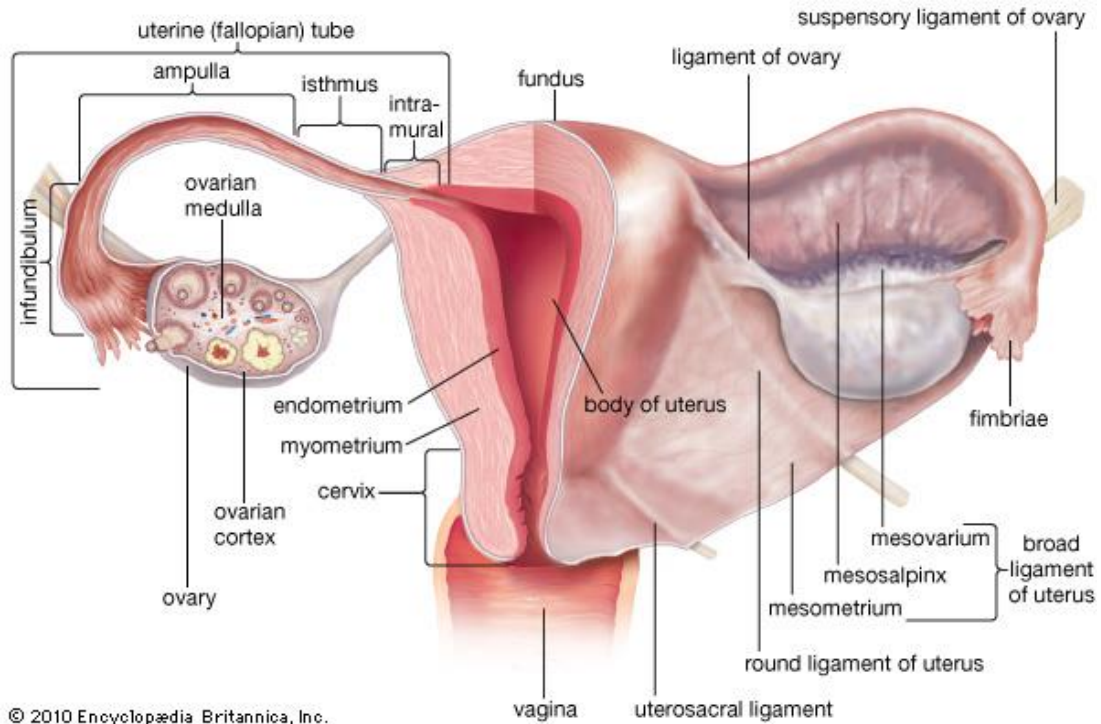
Ovulasyon sonucu dışarı atılan oositin yakalanarak uterusu naklinden sorumlu tuba uterina yaklaşık 10 cm uzunluğunda, 3 mm genişliğindedir. Ligamentum latum uterinin serbest olan üst kenarı boyunca uzanır. Ligamentum latum uterinin, tuba uterinaya yakın olan bölümüne mesosalpinks denir. Tuba uterina'nın uterusu açılan kısmına ostium uterinum tuba, karın boşluğuna açılan kısmına ostium abdominale tuba denir. Uterusa yakın olan bölümü horizontal olarak laterale doğru gider ve arkaya ve yukarıya doğru ilerleyerek ovaryumun üst ucuna gelir (Şekil 1). Ardından içe ve aşağıya doğru dönerek ovaryumun üst kenarını sarar.

Anatomik olarak tuba uterina dört bölümden oluşur. İfundibulum tuba uterina abdominal uçtaki en geniş kısımdır. Bu kısım huni şeklinde olup uçları fimbria tuba denilen saçaklar bulundurur. Bu fibrillerden bir tanesi daha uzun olup ovaryuma

tutunur. Ovulasyon sırasında oositin tuba uterinaya geçişini infundibulum, graaf follikülünün etrafını sararak sağlar. Ampulla tuba uterina, infundibulumdan sonra gelen bölümdür. Oositin döllenişmesi burada gerçekleşir ve uzunluğu 7 cm'dir. İsthmus tuba uterina ampulladan sonra gelen dar bölümdür. Tuba uterina'nın uterus duvarında ilerleyen parçasına pars uterina denir (Şekil 3).

Tuba uterina'nın beslenmesini arteria uterina ve arteria ovarica'dan gelen dallar sağlar. Venler ise aynı yoldan seyredip vena uterina ve vena ovarica'ya dökülür.

Tuba uterina'nın duvarı üç tabakadan oluşur. Dışta peritondan oluşan tunica serosa ortada düz kaslardan oluşan tunica muskularis ve en içte tunica mukoza bulunur. Tek katlı prizmatik silli epitel özelliğindeki mukoza epitelinde bulunan sillerin yönü daima uterusu doğrudur. Buradaki sillerin hareketi ile oosit uterusu taşınır (Çelik Ö, 2013).



© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

Şekil 3: Tuba uterina ve kısımları (<https://global.britannica.com/science/fallopian-tube>, erişim tarihi: 24.07.2016)

#### 4.1.1.3. Uterus

İmplantasyonun ve aylık menstrüasyon siklusunun gerçekleştiği organ olan uterus mesanenin arkasında, rektumun önünde ve pelvis minorun içerisinde yer alır. Hamilelik döneminde boyutunda değişiklikler meydana gelmekle beraber nullipar (doğurmamış kadınlarda) 7,5 cm uzunluğunda, üst tarafında 5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 30-40 gram ağırlığındadır.

Anatomik olarak uterus gövde ve serviks olmak üzere iki bölüme ayrılmaktadır. Gövde uterusun büyük üst kısmıdır ve posteriyor yüzü konveks bir halde iken anterior bölümü ise neredeyse düz haldedir. Gövdenin tuba uterina bağlantısının üstünde genişleyen yuvarlak parçası fundus adını almaktadır. Mesane ile komşuluk yapan alt-ön yüzüne facies vesicalis denir ve uterusun 2/3'lük bölümünü oluşturur. Bu yüzü örten periton mesane ile uterus arasında bir çıkmaza neden olur. Bu çıkmaza ekskavatio vesiko-uterina denir. İnce barsaklarla komşu olan bölüme ise facies intestinalis denir. Bu bölüm arkada serviks uteri ve vajinanın üst bölümüyle devam etmekte olup alt yüze göre daha geniş ve konvektir. Bu yüzü örten periton tabakasında vajina arka üst yüzünü örttükten sonra rektuma gider ve ikisi arasında çıkmaza neden olur. Bu çıkmaza ekskavatio rekto-uterina adı verilir. Uterusun üst dış köşelerine tuba uterinalar açılır. Fundus uterina ise bunların açıldığı köşeleri birleştiren hattın üzerinde kalan korpus bölümüne verilen isimdir. Fundus uteri periton ile kaplanmış olup konveks yapıdadır.

Uterusun alttaki silindirik biçimli bölümüne serviks adı verilir. Uterusun 1/3'lük bölümünü oluşturur ve 2 cm uzunluğundadır. Uterusun gövdesinden istmus ile ayrılmaktadır. Vajina ile isthmus uteri arasında yer alır. Vajinanın üstünde kalan bölümüne portio supravajinalis, vajinanın içerisinde bulunan bölümüne portio vajinalis denir. Serviksin servikal kanal deneni lümeni her iki ucunda dar açıklıklara sahiptir. İnternal os uterin kaviteye açılır iken eksternal os vajinaya açılır. Mesaneye, serviksin ön tarafında bulunan bağ dokusundan oluşmuş parametrium ile komşuluk yapan portio supravajinalis'tir.

Uterus duvarı üç tabakadan oluşmaktadır. Bunlar içten dışa doğru endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olarak isimlendirilir. Ayrıca uterusu örten peritondan meydana gelen tunika seroza yapısı vardır (Şekil 4).

**Miyometriyum:** Düz kas liflerinden meydana gelen uterusun en kalın tabakasıdır. Bu kaslar spiral, longitudinal ve sirküler şekilde düzenlenmiştir. Hormonal etki ile kas tabakası değişiklik göstermektedir. Herbir kas lifi hamilelik döneminde hipertrofiye uğrayarak büyür. Hipofizden salgılanan kasların kasılmasını tetiklerken plasentadan ve korpus luteumdan salgılanan progesteron uterus kaslarının kasılmasına engel olmaktadır. Östrojen hormonu ise kasların normal hacimlerini koruyarak işlevlerini sürdürmelerini sağlarken yokluğunda atrofi meydana gelir (Ross, 2016 ve Çelik, 2013).

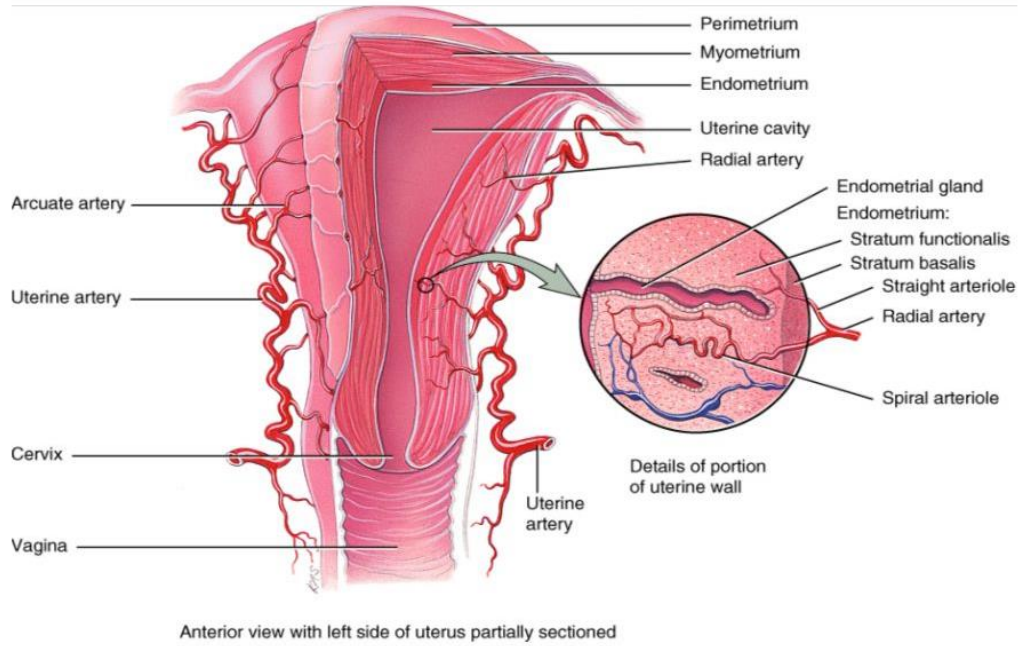
**Endometriyum:** Soluk kırmızı renkli, yaklaşık 5 mm kalınlığında olup, uterusun en iç tabakasını oluşturmaktadır. Yüzey epiteli tek katlı prizmatik silyalı epitel özelliğindedir. Lamina propriyasında uterus bezleri bulunmakla beraber oldukça kalındır. Ovaryan sıklusa bağlı olarak bu bezlerin yapısı değişiklik göstermektedir. Endometriyum iki bölümden oluşur; menstrual siklus sırasında dökülmeyen ve endometriyumun 1/3'lük taban kısmını oluşturan endometriyum bazalis ve endometriyumun 2/3'lük yüzey tabakasını oluşturan ve menstrual siklus sırasında dökülen endometriyum fonksiyonalis (Ross, 2016 ve Çelik, 2013).

**Perimetriyum** ise dış seröz tabakadır ya da uterusu kaplayan visseral periton tabakasıdır. Abdominal ve pelvik periton ile devam etmektedir. İnce bir gevşek bağ dokusu ve mezotelyumdan meydana gelmektedir. Mezotelyumun altında bir elastik doku tabakası belirgindir. Perimetriyum anterior yüzeyin bir kısmını kaplarken posterior yüzeyin tamamını kaplar. Bağ dokusu veya adventisya anterior yüzeyin kalan kısmını kaplar (Ross, 2016 ve Çelik, 2013).

**Menstrual siklus:** Kadınlarda puberteden itibaren başlayan ve menopoza kadar devam eden, olgunluk dönemlerinde uterus endometriyumlarında meydana gelen değişikliklerdir. Bir döngü ortalama 28 gün sürerken 3 farklı evre burada söz konusudur. Bu döngü süresi kadınlar arasında değişiklik gösterebilir ve 20 günden kısa veya 45 günden uzun olabilir. Üreme yetmezliği ile döngüde meydana gelen

bozukluklar doğru orantılıdır. Ovaryan folliküllerin gelişimi ile uterusun östrojen tarafından uyarılmasıyla, yenilenme olur ve menstrual kanamadan sonra kalan dokunun proliferasyonu gerçekleşir. Menstrual döngünün bu ilk iki haftası overlerde folliküllerin gelişme dönemi olduğu için bu evreye folliküler evre denir. Aynı zamana denk gelecek şekilde uterusunda proliferasyon söz konusu olduğu için proliferatif evrede denilmektedir. Proliferasyon evresi menstrual kanamanın 5. Gününden itibaren başlar ve 15. veya 16. güne kadar devam eder. Follikül uyarıcı hormon (FSH) etkisi ile uterus mukozası kalınlaşır ve uterus bezleri büyür fakat salgı yapmaz. Mukozayı besleyen kan damarları genişler. Menstrual siklusun 14. gününde ovulasyon meydana gelir. Ovulasyondan sonra korpus luteumdan östrojen ve progesteron salgısı ile sekresyon evresi gerçekleşir. Sonuç olarak menstruasyon döngüsünün ikinci yarısına overler için luteal, uterus için sekretuar evre denir. Sekresyon evresi menstrual döngünün 15. ve 16. günlerinde başlar ve daha sonraki döngüye kadar devam eder. Korpus luteumdan salınan progesteronun etkisiyle uterus bezlerinde salgılama olur ve implantasyon için uygun bir ortam oluşturulması için uterus mukozası süngerimsi bir hal alır. Oositte fertilizasyon söz konusu ise uterusun bu durumu bir süre daha devam eder. Ancak fertilizasyon yok ise menstruasyon başlar. İmplantasyonun gerçekleşmediği durumlarda korpus luteumda ani bir gerileme görülür. Bu sebeple östrojen ve progesteron seviyesinde düşüş gözlenir ve bu durumun endometriyumun fonksiyonals tabakasının dökülmesiyle sonuçlanır. Menstruasyon safhası denilen bu evrede arterioller açılıp yırtılarak kanamaya sebep olurlar ve yaklaşık 30-40 ml olup endometriyumun fonksiyonals tabakası ile dışarı atılır (Ross, 2014 ve Çelik, 2013).

Uterusun beslenmesini, a. uterina ve a. ovarica sağlar. Venler ise ligamentum latum uteri içerisine arterleri takip ederek girerler. Vv. Uterinae v.iliaca interna'ya açılırlar (Ross, 2016 ve Çelik, 2013).



Şekil 4: Uterus tabakaları ( <http://slideplayer.com/slide/6364127/>, Erişim tarihi: 24.07.2016).

#### 4.1.1.4. Vajina

Serviks uteri ve vestibulum vajina arasında oblik olarak uzanan, zardan yapılmış kadın cinsel birleşme organıdır. Arkasında rektum ve canalis analis, önünde mesane ve üretra yer almaktadır. Vajina ile serviks uteri arasında forniks vajina denilen çıkmaz yer almaktadır. Vajina ön ve arka duvarları bulunmaktadır. Ön duvar arka duvara göre daha kısadır. Vajinanın uzunluğu ortalama olarak 8-10 cm kadardır. Vajina duvarlarında uzunlamasına seyreden kabarık yapılar bulunmaktadır. Ön duvarda bulunana kolumna rugarum anterior, arka duvarda bulunana kolumna rugarum posterior adı verilmektedir. Bu yapılardan yanlara doğru uzanan mukoza kıvrımlarına rugae vajinalis denir (Çelik, 2013).

Yapısı: Vajina en dışta tunika spongiosa, ortada tunika muskularis ve içte tunika mukozadan oluşmaktadır.

Vajina mukozası açık kırmızı renkte olup daima ıslak ve kaygandır. Uterustan gelen salgılar bu ıslaklığı ve kayganlığı sağlamaktadır. Vajina pH'si 4-4,5 arasındadır ve salgı bezi bulunmaz. pH dolayısı ile spermiyumlar bu ortamda uzun süre canlı

kalamazlar. Ayrıca bu ortam bakterilere karşıda bir koruma oluşturmaktadır. Vajina kas tabakası oldukça zayıf olmakla beraber bunun dışında bulunan bağ doku tabakası paracolpium olarak adlandırılır (Çelik, 2013).

Vajinanın beslenmesini a.uterina'dan çıkan a. vaginalis sağlar. Ayrıca a. vaginalis; a. uterina, a. vesicalis inferior ve a. rektalis media ile anastomoz yapar. Bu anastomoz ile de vajina beslenmesine katkıda bulunur. Venleri ise uterus alt kısmı, mesane ve rektumdan gelen venler ile plexus vaginalis adı verilen bir ağ yapısı oluşturur (Çelik, 2013).

#### **4.1.2. Kadın Dış Genital Organları**

Urogenital diaphragmanın ve arcus pubicus'un aşağısına yerleşmiş organlardır. Bu organların hepsine birden vulva denilmektedir ve mons pubis, labium majus pudendi, labium minus pudendi, klitoris, bulbus vestibuli, glandula vestibularis majoris, ve glandula vestibularis minoris olarak sıralanmaktadırlar (Şekil 5).

Mons pubis: Symphysis pubis ön bölgesindeki deri altı dokusunun kalınlaşması ile ortaya çıkar. Erişkinlerde bu bölgede pubes adı verilen kıllar çıkar.

Labium majör: Genital açıklığı dıştan sınırlayan ve mons pubisten perineuma kadar uzanan deri plikasına denir. Koyu renkli olup üzerinde kıllar bulunmakla beraber erkek üzerme sistemindeki skrotuma karşılık gelir. Her iki taraftaki labium majusların ön uçları birleşerek commissura labiorum anterioru arka uçları birleşerek commissura labiorum posterioru oluşturur.

Labium minör: Kızılımtırak renkli iki küçük deri plakası olan bu yapı labium majus pudendi'lerin arasında bulunur. Yağ bulundurmaz. Erkek üreme sisteminde penis derisine karşılık gelmektedir.

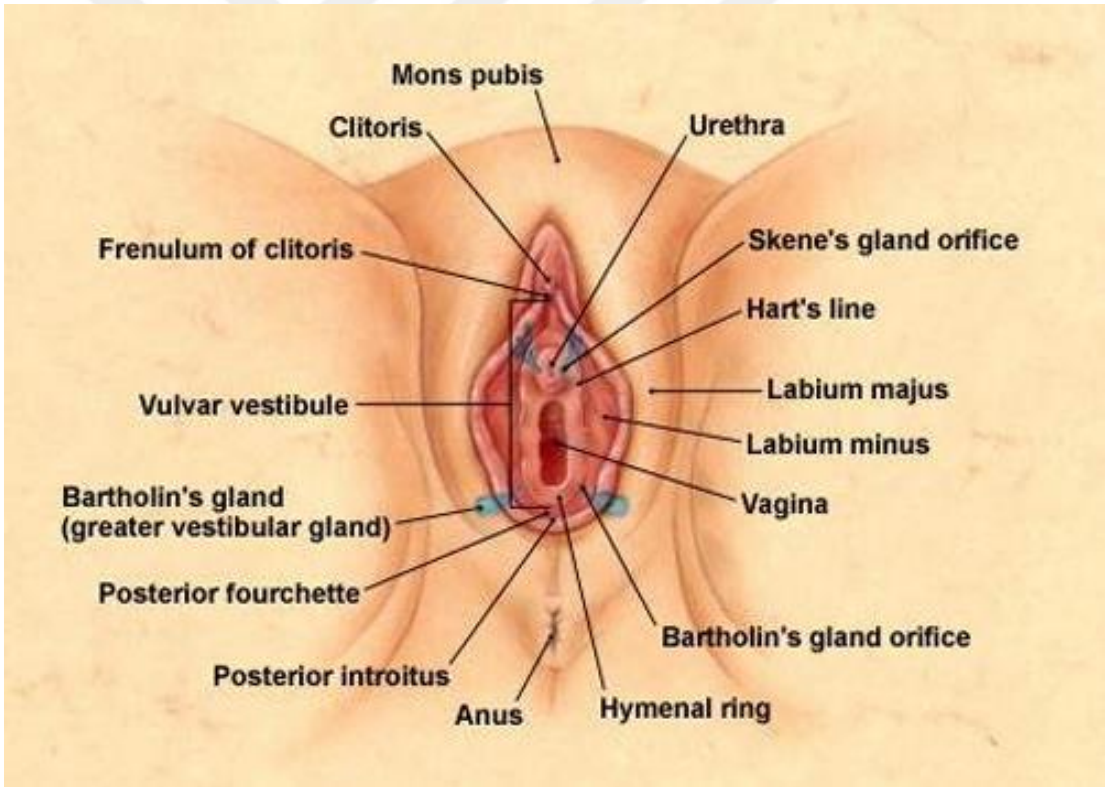
Vestibulum Vaginae: İki labium minus arasında kalan aralıktır. Bu bölgeye ostium vaginae, ostium uretra externum ve oldukça fazla sayıda glandula vestibulares minores açılır.

Klitoris: Erektile bir yapı olmakla beraber erkek üreme sistemindeki korpus kavernozum penisine karşılık gelmektedir (Şekil 5).

Bulbus vestibuli: İki tane erektile doku kitlesidir ve 2,5 cm uzunluğunda olmakla beraber vestibulum vajinanın iki yanına yerleşmiştir.

Glandula vestibularis majör (Bartholin bezi): Bulbus vestibulinin arkasında yerleşmiş bezelye büyüklüğünde iki tane bezdir. Labium minus pubendi ile himen arasına bezin salgı kanalı açılır.

Glandula vestibularis minör (Skene bezi): Çok sayıda, küçük vestibulum vajinaya açılan bezlerdir. Erkeklerdeki prostat bezinin karşılığıdır (Çelik, 2013).



Şekil 5: Vajina ve kısımları ([http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Vulvar+Vestibulitis&lang=4](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Vulvar+Vestibulitis&lang=4), erişim tarihi: 24.07.2016).



## 4.2. KADIN ÜREME DÖNGÜSÜ

### 4.2.1. Hormonal Kontrol

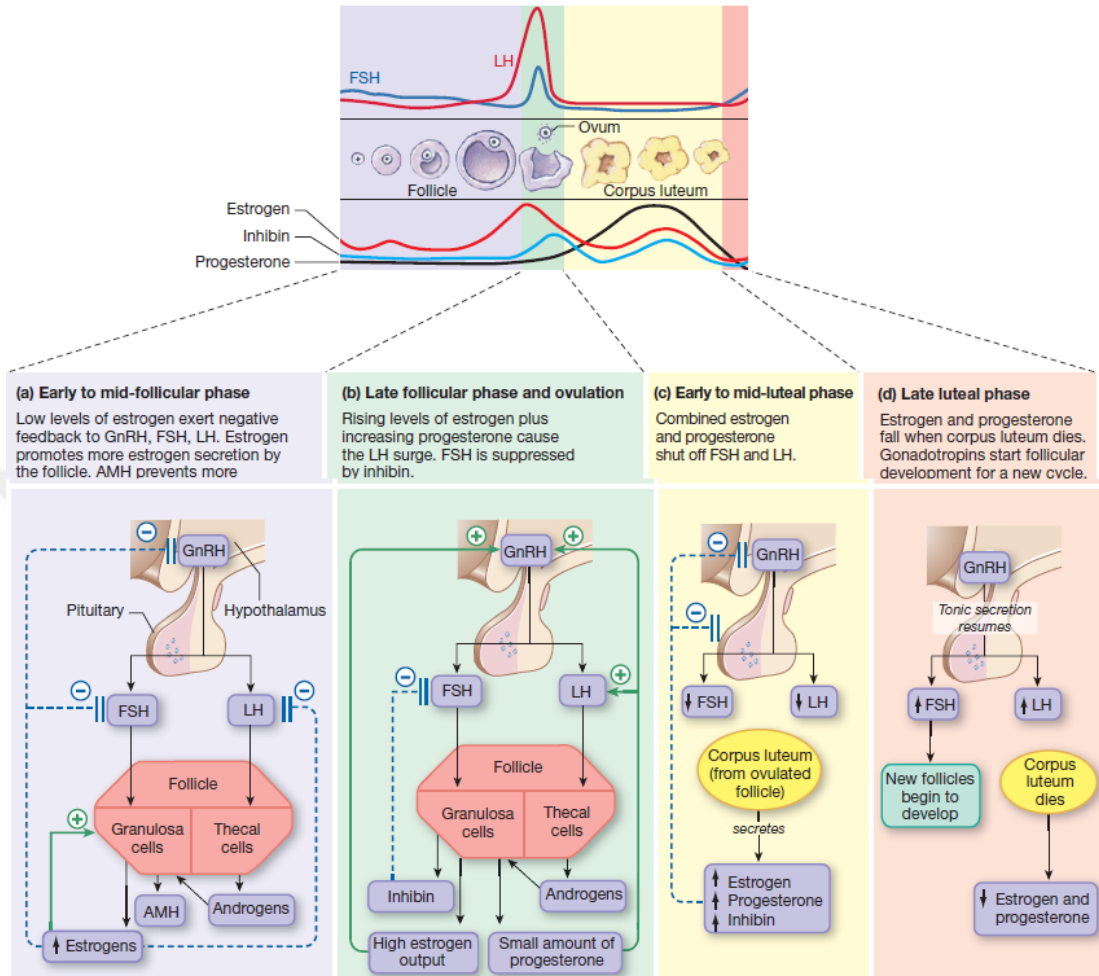
Hipofizin ön bölgesinden salgılanan gonadotropik hormonlar olan FSH ve LH overlerdeki değişiklikleri kontrol ederler. Oositler gonadotropik hormonlarla uyarılmadıklarında inaktif halde bulunurlar. Hipofiz bezinin bu hormonları salgılaması 9-12 yaşlarında artış gösterirken 11-15 yaşlarında FSH ve LH seviyesi en yüksek düzeye ulaşır. Bu gonadotropinlerin seviyesi, pozitif ve negatif geri bildirim mekanizmasıyla overlerden salgılanan östradiol, progesteron ile glikoprotein olan inhibin A ve inhibin B ile kontrol edilir. İnhibin A ve inhibin B yalnızca hipofiz bezinde etkili iken progesteron ve 17 $\beta$ -östradiol hem hipofiz hemde hipotalamus üzerinde etki gösterirler. 17 $\beta$ -östradiol esas östrojen hormonu olmakla beraber daha az etkisi olan östron da önemli miktarda üretilir. Östrojen folliküllerde oosit etrafında bulunan granüloza hücreleri ve korpus luteumdan salgılanır. Ovulasyonun öncesi artmış östrojen pozitif geri bildirim mekanizması ile kan LH düzeyinde 6-10 ve kan FSH düzeyinde 2-3 katına kadar yükselişe sebep olur. 17 $\beta$ -östradiol, GnRH salgı sıklığı ve miktarındaki artışlara hipotalamusa etki ederek olur. Östrojen ve progesteron, gonadotropiklerin salgılanması üzerine sinerjik bir geri bildirim etkisini menstrual döngünün sekretuar evresinde yapar. Östrojen negatif geri bildirim etkisinin primer yeri hipofiz bezidir. Negatif geri bildirim etkisiyle korpus luteum regresyonu sonucu östrojen ve progesteron düzeyi azalır (Çelik, 2013).

Hipotalamusun medyobazal bölgesinin arkuat çekirdeklerinden salgılanan GnRH kadın cinsel davranışlarını belirler. Arkuat çekirdek fonksiyonlarının limbik sistemden gelen çeşitli uzantılarla değişmesiyle menstrual döngü etkilenir. Over hormonları hipotalamustan GnRH uyarı frekansının değişmesi ve hipofizin kendisinden salınan gonodotropin sekresyonu uyararak GnRH potansiyelini etkileyerek gonadotropin salınımını azaltabilir. Folikül stimüle eden hormonun salınımının inhibe olması, östradiolün lüteinizan hormonun salınımını arttırmasıyla olur. Diğer yandan da inhibin A ve B 'de FSH salgılanmasını azaltır. Overlerde ovulasyondan sonra fazlaca progesteron salınımı yapılır. Progesteron hipotalamik opioid aktivitesini arttırır ve LH üretimini azaltan FSH üretimini arttıran GnRH dalga salgısını yavaşlatır. Luteal fazın ortasında inhibin A piki oluşurken, folliküler fazın erken döneminde inhibin B piki oluşmaktadır. FSH biyosentezinin erken folliküler faz düzeylerine göre baskılanması,

inhibin B düzeyindeki artışın aktivin sinyalini kapatarak hipfiz gonadotropinini etkilemesiyle olmaktadır. FSH düzeylerinde yeniden artışı sağlayan ortamı, luteal fazın sonunda inhibin A'daki artış sağlamaktadır.

Gonadotropinlerin düzeylerinin en belirgin olduğu zaman menstrual siklusun tam ortasına denk gelir ve ovulasyon dönemi ile örtüşür. LH ve FSH hormonlarının ön hipofizden pulsatif olarak salgılanmasını hipotalamustan pulsatif olarak salgılanan GnRH uyarır. GnRH salgısı norepinefrin,  $\beta$ -endorfin, serotonin, dopamin tarafından düzenlenir. FSH ile LH folliküllerdeki G-protein ile ilişkili reseptörlere bağlanarak over kökenli progesteron ve östrojen üretimini artırır. FSH, folliküler gelişimine katkıda bulunurken LH, folliküler fazın sonuna doğru reseptör sayısını artırarak folliküler hücrelerde FSH'ın yerini alır. Gonadotropinlerden özellikle FSH'ın kandaki seviyesinin düşmesiyle granüloza hücreleri ölür ve folliküller atreziye uğrar. LH ovulasyonun gerçekleşmesini sağlayarak korpus luteum oluşumuna katkıda bulunmuş olur. Böylece östrojen ve progesteron üretimi desteklenmiş olur. Teka interna hücrelerindeki LH reseptörlerinin aktive edilmesiyle granüloza hücrelerinde  $17\beta$ -stradiol aromataz enzimi ile çevirmek için gerekli olan androstenedionun yapımını uyarır (Şekil 6) (Çelik, 2013).

## HORMONAL CONTROL OF THE MENSTRUAL CYCLE



Şekil 6: Dişi menstruasyon döngüsünün hormonal kontrolü. [https://classconnection.s3.amazonaws.com/179/flashcards/3995179/png/flashcard\\_download-14616F1F2AF65D0A951.png](https://classconnection.s3.amazonaws.com/179/flashcards/3995179/png/flashcard_download-14616F1F2AF65D0A951.png). Erişim tarihi: 10.08.2016

### 4.2.2. Ovaryan Döngü

İnsan menstural döngüsünde, üreme dönemindeki kadında (puberteden menapoz kadar) yaklaşık 20 follikül ovaryumda gelişir. Ancak ovaryumda yer alan bu folliküllerden yalnızca biri ovule olur. Kalan folliküller ise atreziye uğrarlar. Folliküllerin atreziye uğrama mekanizmaları hala açık değildir fakat bilinen bir teoriye göre ovulasyona uğrayan follikül daha fazla FSH ile karşı karşıya gelmektedir ve bunun sonucunda FSH follikül büyümesini stimüle etmektedir. Dolayısıyla rakiplerine göre ovulasyona uğrayan follikül daha büyük, daha vasküler, daha fazla granuloza

hücresine ve FSH reseptörüne sahiptir. Aynı zamanda, seçilmiş olan follikülde östrojen salgılanması artar ve hipofiz bezinden FSH salgılanması negatif geri bildirim ile inhibe edilir. Böylece diğer folliküller FSH'tan mahrum kalırlar ve dejenere olurlar. Bunun yanında GnRH'ında folliküler atrezide görev aldığı düşünülse de bu henüz açıklığa kavuşmamıştır (Jones E. R ve ark. 2013) Menstrual kanamanın başlaması ile menstrual döngünün birinci günü başlamış olup bu folliküler dönem dominant bir follikülün büyüyüp gelişerek ovulasyona hazır hale gelene kadar devam eder. Siklusun 14. gününde östrojen kaynaklı LH artışından 36 saat sonra ovulasyon gerçekleşir ve bunun sonucunda geriye ovulatuvar follikülde korpus luteum kalır. İnhibin A, östradiol, progesteron geçici bir endokrin organ olan korpus luteumda üretilir. Luteal dönem korpus luteum gerilemesi ile son bulur (Şekil 6) (Sadler, 2011).

#### **4.2.3. Folliküler Dönem**

Bu süreçte inhibin B ve  $17\beta$ -östradiol yüksek miktarlarda üretilir bu durum LH salgılanmasını indükler ve follikül gelişimi ile ovulasyon uyarılmış olur. Ayrıca yükselen östradiolün hipotalamusa etki etmesi ile gonadotropik hücrelerin GnRH'a cevap vermesi sonucu östradiol seviyesi pozitif bir geri bildirim mekanizması ile artış gösterir. Bu sırada GnRH reseptör sayısının artmasıyla GnRH piki meydana gelir. Bunun yanı sıra GnRH duyarlılığını arttırarak pozitif geri bildirim sağlayan progesteron, GnRH salgısının artmasını sağlayarak nöropeptid Y salgılanma sıklığını arttırmış olur. Folliküler dönem boyunca inhibin B seviyesi artış göstermekler beraber LH'nin pik yapması ile kısa süreliğine azalır ve ovulasyondan iki gün sonra yeni bir pik meydana getirir. İnhibin A seviyesi ise ancak LH ve FSH'nin pik yapması ile geç folliküler dönemde artış göstermekle beraber luteal fazın ortasında maksimum düzeye ulaşmadan hemen önce kısa süreliğine azalır (Çelik, 2013).

#### **4.2.4. Luteal Dönem**

LH düzeyindeki yükseliş ovulasyona sebep olur ve korpus luteum yaşaması için gereklidir. Ovulasyon sonucunda korpus luteum gelişir ve kan dolaşımındaki yüksek düzeydeki progesteron LH salınımını baskılar ve bu negatif geri bildirim mekanizması hem hipotalamusu hem de hipofizi etkilemektedir. Progesteron hipofizden GnRH reseptör sayısını azaltır ve hipotalamustan ise GnRH artışını bloke eder. Bunun yanında FSH ve LH'nin alt ünitelrine ait gen ekspresyonlarını azaltır. GnRH ve LH

dalgalarının sıklığı progesteronun etkisi altındayken 3-4 saatte pik yapar. Ayrıca progesteron tarafından oluşturulmuş negatif geri bildirim ile ikinci bir LH artışı engellenir ve luteolizis geciktirilmiş olur. Bu durumda bir plasental hormon olan insan koryonik gonadotropin (hCG) ile uyarılmayan korpus luteum küçülmeye başlar. Luteal faz boyunca inhibin B düzeyi düşük kalır. Luteal-foliküler geçiş döneminde döngü ortası FSH pik yaptıktan dört gün sonra inhibin B seviyesinde artış gözlemlenir. Luteal dönem boyunca granüloza hücrelerinden inhibin A salgılanır ve seviyesi luteal faz boyunca progesteron ve östradiol ile senkronize bir şekilde azalır ve erken folliküler dönem boyunca düşük seviyede kalır. LH artışı, mayoz bölünmeyi yeniden başlatır, follikül duvarının luteinizasyonuna ve ovulasyona neden olur (Sadler, 2011 ve Çelik, 2013).

#### **4.2.5. Oogenez Ve Dominant Follikülün Gelişimi**

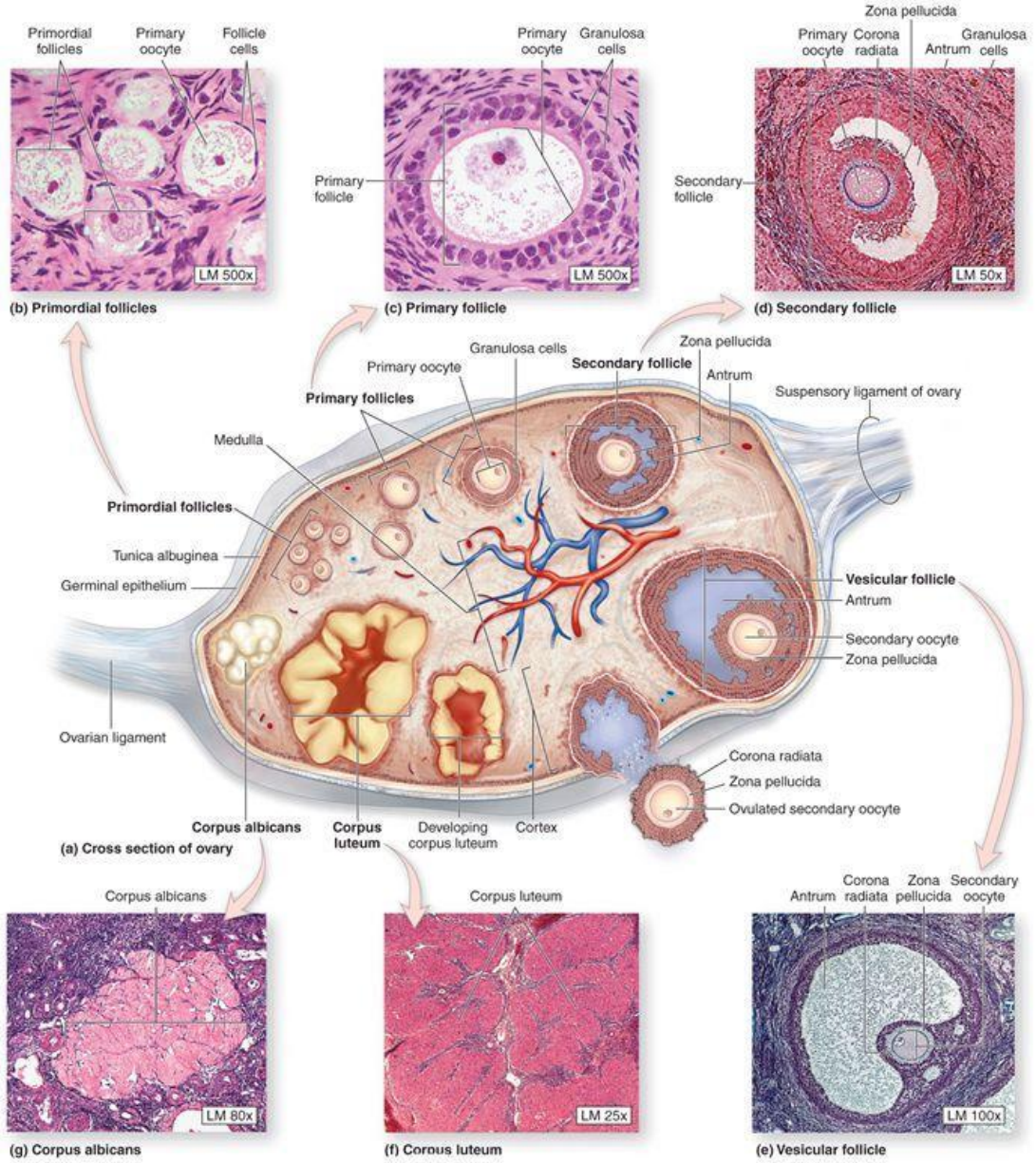
Follikül gelişimi ve dominant follikülün oluşması gonadotropine bağımsız (preantral) ve gonadotropine bağımlı (antral ve graafian) olmak üzere iki aşamadan oluşmasına rağmen fonksiyonel bakımdan aşağıda belirtildiği üzere daha alt bölümlere ayrılarak ovaryan döngü tamamlanmaktadır.

1. Arestteki primordial follikül
2. Büyüyen preantral (primer ve sekonder) follikül
3. Büyüyen antral (tertiary) follikül
4. Dominant (preovulatory, graafian) follikül
5. Preovuluar dönemdeki dominant follikül
6. Korpus luteum (gebelikte ve gebe olmayan kadın)
7. Atretik follikül

Primordial Follikül: Folliküler gelişimin ilk aşamasını temsil eder. Fetal dönemin 3. ayından itibaren izlenmeye başlarlar. Folliküllerin büyük bölümünü oluşturan primordiyal folliküller, korteksin stromasında hemen tunika albuginea altında yer alırlar. Bu folliküller immatür bir oosit (primer oosit) ve çevresinde yer alan tek sıra yassı hücrelerden oluşan küçük folliküllerdir. Yassı follikül hücreleri birbirlerine desmozomlarla bağlıdır. Bu hücrelerin altında bazal lamina uzanır. Yaklaşık 25-30 mikron çapındaki oositler, geniş veziküler çekirdeğe sahip, belirgin bir veya birden

çok çekirdekli içeren yuvarlak hücrelerdir. Organelden zengin olan bu hücrelerde elektron mikroskopik olarak belirgin bir Golgi kompleksi, yaygın bir endoplazmik retikulum, bol mitokondriyon, lizozom ve annuler lameller görülür. Golgi kompleksinin membranları ve veziküllerinin, granüler endoplazma retikulumu keselerinin, mitokondriyon ve veziküllerin yoğunlaştığı sitoplazma bölümleri ışık mikroskopik düzeyde Balbiani cisimleri olarak görülür. Puberteden sonra folliküllerin ileri gelişimi oositin ve folliküler epitel hücrelerinin proliferasyonu ve follikülü saran stromanın değişimi ile devam eder (Şekil 7).

Antral döneme (2 mm) fetal hayata ve yeni doğan dönemine büyüyerek giren primer follikül bu dönemde gonadotropin bağımsızdır. Primordial follikülde tek tabaka halinde granüloza hücre tabakası bulunmakla beraber bu hücreler oositin beslenmesini sağlamaktadır. Bunun yanında oositin mayozun profaz I aşamasında kalmasını sağlayan oosit maturasyonu inhibe edici faktör salgılamasını da bu hücreler yapmaktadır. Bu faktör oositlerin olgunlaşmasını baskılmaktadır. Follikül gelişiminde ilk basamak, oositin genişlemesi sonucu çapı 2-3 katına çıkar ve primer follikül meydana gelir. Burada yassı epitel mitoz bölünme geçirerek küboidal epitel haline gelir ve primer follikül oluşmuş olur (Çelik, 2013).



Şekil 7: Follikül gelişimi  
<https://classconnection.s3.amazonaws.com/245/flashcards/2198245/jpg/oocyte1366496131622.jpg>, erişim tarihi: 10.08.2016

Primer follüküller: Follüküllerin büyümesi primer oositin, follükül hücrelerinin ve follükülleri çevreleyen stromanın büyümesi ile gerçekleşir. Primordiyal follüküllerin yassı hücreleri gelişerek, önce kübik daha sonra prizmatik hücrelere dönüşürler (Şekil 8). Follükül hücreleri tek katlı kübik hücreler haline geldiğinde follüküle unilaminar primer follükül denir. İmmatür oosit büyürken çevresine glikoproteinleri ve glikozaminoglikanları salgılar. Periodik asit shiff (PAS) boyası ile kuvvetli pozitif

boyanan bu bölge zona pellusida olarak isimlendirilir. Zona pellusida, oosit yaklaşık 50-80 mikron çapına ulaştığında görülmeye başlar. Oositi çevreleyen hücreler çoğalarak çok katlı bir epitele dönüşürler. Bu epitele stratum granulozum denir. Tek katlı prizmatik veya çok katlı prizmatik epitel içeren farklı büyüklüklerdeki folliküller de primer follikül olarak değerlendirilir. Tek katlı bir epitel içeren follikül unilaminer primer follikül olarak isimlendirilirken; stratum granulozum olarak da isimlendirilen çok katlı bir epitel içeren folliküle multilaminer primer follikül denir. Granuloza hücreleri arasında yaygın gap junction tipi bağlantılara rastlanır. Follikülde bu değişiklikler olurken, bağ dokusunda da bazı değişiklikler yaşanır. Stroma, follikül çevresinde teka follikülü olarak isimlendirilen sıkı dokuyu oluşturur. Stratum granulozum ile teka arasında camsı membran olarak bilinen bir bazal membran yer alır. Teka follikülü daha sonra kan damarlarından zengin teka interna adı verilen iç tabakayı, kollajen liflerden ve düz kas hücrelerinden zengin teka eksterna adı verilen dış tabakayı oluşturur. Teka internada steroid salgılayan hücreler, fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük kan damarları bulunur. Teka internanın endokrin hücrelerinden LH'la stimulasyonu takiben östrojenlerin prekürsörleri olan androjenler sentezlenerek salgılanır. Androstenedione teka interna hücrelerinden salgılandıktan sonra, granuloza hücrelerinden FSH etkisi ile üretilen bir enzim olan aromataz ile östrojene dönüştürülür. Follikülü çevreleyen stromaya dönen östrojen, damar yolu ile bütün vücuda dağılır.

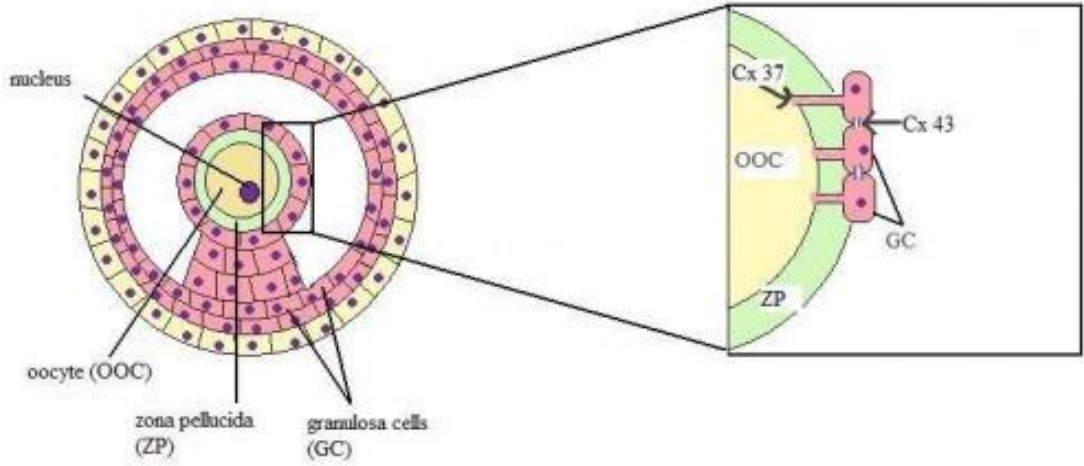
Primer follikül gelişimine devam ederken, oosit de olgunlaşır. Balbiani bölgesinde yoğunlaşmış olan Golgi kompleksi sitoplazmaya yayılır. Serbest ribozom, mitokondriyon, vezikül ve multiveziküler cisimlerin sayıları artar, granüler endoplazma retikulumu yaygınlaşır. Memelilerde plazma membranının hemen altında kortikal granüller denen granüller görülür. Bu granüllerin proteazlardan zengin içerikleri oosit spermiyumla karşılaşınca salgılanır.

Oosit membranının oluşturduğu mikrovilluslar oosit ile granuloza hücreleri arasındaki perivitellin aralığa uzanır. Granuloza hücrelerinin ince uzantıları da oosite doğru uzanarak mikrovilluslarının aralarına karışır, bazıları plazma membranına sokulur.



Sekonder follikül: Stratum granulozum 8-12 hücre katına sahip çok katlı prizmatik epitele dönüşünce bu hücreler arasında şeffaf bir sıvı ile dolu düzensiz boşluklar ortaya çıkmaya başlar. Bu folliküle artık sekonder follikül (veziküler follikül) denir (Şekil 8). Bu boşluklar birbirleri ile birleşerek antrum adı verilen büyük bir boşluğu oluşturacaktır. Sekonder follikülün antrumu hiyaluronik asitten zengin follikül sıvısının içerir. Bu dönemde oositin çapı 250 µm ulaşır. Follikülün gelişimi devam ederken, follikül içinde biriken sıvı artıp antrum genişledikçe bir grup granuloza hücreleri tarafından çevrelenmiş olan oosit follikülün bir kenarına itilir. Oosit ve çevresindeki granuloza hücreleri follikül lümenine doğru kumulus ooforus adı verilen hücre topluluğunu oluştururlar. Oositi çevreleyen granuloza hücrelerine ise korona radyata adı verilir. Bu gelişmelere paralel olarak follikül, tersiyer follikül safhasına ilerler. Korona radyata hücrelerinin yüzeyindeki mikrovilluslarla, oosit yüzeyindeki mikrovilluslar arasında gap junction tipi bağlantı kompleksleri bulunur. Gap junction'lar konneksin adı verilen iç zar proteinlerinden oluşurlar. Altı adet konneksin, hücre zarını kateden içi boş silindirik bir yapı olan konneksonu oluşturur. Komşu hücrelerdeki konneksonların ucuca düzenlenimi iki hücrenin sitosolü arasında iletişim için 1,5-2 nm çapında doğrudan bir kanal oluşumuna neden olur. Konneksonlar küme oluşturma eğiliminde olup 0,3 mm çapında yamalar oluştururlar. Bu bağlantı birimleri hücreler arasında çapı 1,2 nm kadar büyük olan kalsiyum ve cAMP gibi moleküllerin bile hareketini kolaylaştırır. Kalsiyum konsantrasyonu arttığı zaman konneksin kanalları kapanır. Bu bağlantı birimi komşu hücreler arasında kimyasal ve elektriksel uyarımdan sorumludur.

Oosit ile granuloza hücreleri arasında heterolog gap junction'ları oluşturan, konneksin 37'nin kodlanmasını sağlayan Gap junction alfa 4 proteininin (Gja4) delesyonu folliküler gelişimin preantral safhada arrestte kalmasına neden olur. Böylece mayozun tamamlanması engellenmiş olur. Konneksin 43 ise granuloza hücreleri arasında homolog gap junction oluşumunu sağlar (Şekil 8).



Şekil 8: Oosit granuloza hücreleri arasında bulunan gap junction'lar. [https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/2011\\_Group\\_2\\_Project](https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/2011_Group_2_Project), erişim tarihi: 10.08.2016.

İntersellüler ortamda PAS+ boyanan Call-Exner cisimleri olarak isimlendirilen bir materyal görülür. Granuloza hücreleri tarafından üretilen bu materyal hiyaluronik asit ve proteoglikanlardan zengindir.

Tersiyer follikül veya Graaf follikülü: Folliküldeki büyüme devam ettikçe ovum da gelişerek ovulasyondan hemen önce birinci olgunluk bölünmesini bitirir. Tersiyer follikül veya Graaf folikülü olarak isimlendirilen bu follikülün içindeki oosit artık sekonder oositir. Antrum boşluğunu çevreleyen granuloza hücrelerinden oluşan çok katlı hücre tabakasına membrana granuloza da denir. Bu dönemde kumulus ooforus belirgindir. Büyüklüğü 10 mm'ye ulaşan follikül ovaryum yüzeyine doğru kabarr. Oosit ve oositi çevreleyen hücrelerin diğer granuloza hücreleriyle olan bağlantıları gevşer. Böylece oosit atılmaya hazırlanır. Bu dönemde teka tabakasında da değişiklikler yaşanır. Teka interna hücreleri sitoplazmalarında lipid biriktirerek steroid sentezleyen hücre özelliği kazanırlar. LH ile stimüle edilen bu hücrelerden salgılanan andojenler daha sonra östrojenlere dönüşür. Andojenlerden bir kısmı agranüler endoplazmik retikulumunda FSH etkisi ile östrojenlere dönüştürülür. Östrojenler granuloza hücrelerinin çoğalmasını stimüle eder (Çelik Ö, 2013;Kierszenbaum, 2006; Sadler, 2011 ve Monniaux ve ark, 2016).

Overin gelişimi ve varlığını sürdürmesi hipofiz gonadotropinlerine bağlı olmasına rağmen, arrestteki primordial folliküllerin gelişme sürecine geçişleri gonadotropin

bağımsız ve diğer faktörlere bağlı bir şekilde olmaktadır. Hem follüküler hücreler hem de oosit tarafından salınan intraovariyan parakrin faktörler arrestte olan follükülün gelişme aşamasına geçişini sağlar. Somatik hücreler ile germ hücreleri arasında fonksiyon gören intraovariyan parakrin faktörler; büyüme faktörleri (insülin benzeri - büyüme faktörü-1 (IGF-1), epidermal ve fibroblast büyüme faktörleri ve interlökin 1- $\beta$  olarak sıralanabilir ve hücreler arasındaki bilgi ve madde alışverişi gap junctionlar aracılığı ile olmaktadır. Follüküllerin 2-5 mm boyutuna ulaşması ile %50'si apoptozdan kurtulur ve seçilmiş büyüme dönemine girer. Bir hafta ya da biraz daha uzun süreli büyümenin ardından follüküllerden bir tanesi ovulasyon öncesi daha hızlı büyümeye başlar. Diğer follüküller ise baskılanır ve apoptoz ile atreziye girerler. Gelişen follükülerden yalnızca birinin dominant hale gelmesinin mekanizması tam olarak açık değildir. Ancak büyüyen follükülün kendisi pozitif geri bildirimdeki fazlalığa cevap olarak daha çok östrojen salgılar ve böylece hipofizden salınan FSH azaltılır ve diğer follüküllerin atrezisi sağlanmış olur. Apoptozdan kurtulan antral follükül, ovulasyondan 85 gün önce gerçekleşir (Sadler, 2011 ve Çelik. 2013).

Gonadotropinlerin düzenlediği büyüme döneminde follükül hızla büyür. Androjeni östrojene dönüştüren aromataz enzimi dominant follükülde FSH tarafından indüklenir ve böylece östrojen üretimi arttırılır. Aynı zamanda follüküler sıvı yapımını, hücre proliferasyonunu ve LH reseptör ekspresyonunu uyarır. Ovulasyon ile primer follükül gelişimi arasında 10-14 günlük zaman farkı vardır. Follükül içerisinde serbest kalan östrojen FSH reseptör sayısının artmasına neden olur. Böylece pozitif bir geri bildirim oluşarak granüloza hücreleri ön hipofizden salınan FSH'a karşı aşırı duyarlı hale gelir. FSH ve östrojen birlikte LH reseptörlerini uyarır. Böylece LH etkisine de maruz kalan follükül sekresyon miktarını arttırır. Ön hipofizden LH salgısının artması teka hücre oluşumuna neden olmaktadır. Tüm bu sebeplerle follükül beklenenden daha hızlı büyür. Ovulasyon anında follükül 1,5-2,0 cm çapına ulaşır. Oosit preantral gelişme döneminde büyümeye başlar ve hücrel ve salgısal proteinler üretir. Oosit öncelikle ekstrasellüler matriks glikoproteini olan ve zona pellusidanın yapısına katılan ZP1, ZP2 ve ZP3 üretimine başlar. Fertilizasyon sırasında spermilerin türe özgü olarak oosite bağlanmasını zona pellusida sağlamaktadır. Zona pellusida aracılığı ile granüloza hücreleri ve oosit hücrel işlemleri gap junctionlar aracılığı ile devam

ettirirler. Ayrıca oosit follikül hücresi farklılaşması ve gelişimi için parakrin faktörler salgılamaktadır.

Foliküler gelişme döneminde, oosit birinci mayoz bölünmenin tamamlanacağı büyüme dönemine girer. Mayoz bölünmenin yeniden başlaması LH artışı ile gerçekleşir. LH olgunlaşmış folliküllerde follikülogenez ile beraber gen ekspresyonunu sonlandıracak etki yapar. Granüloza hücre proliferasyonunu kontrol eden genlerin (IGF-1, FSH, siklin D2 ve östrojen reseptörleri gibi) (Şekil 6) transkripsiyonu ve kodladıkları steroidojenik enzimler LH aracılığı ile olan hücre içi cAMP artışını hızla etkisiz hale getirir. Ayrıca LH luteinizasyona (protein kinaz, hücre döngü inhibitörü, steroidojenik akut regülatuar protein, P450scc) ve ovulasyona (siklooksijenaz-2 ve progesteron reseptörü) dahil olan genleri indükler. Bu aşamada, mRNA sentezi tamamen durur ve mayozun son evresi tamamlandığında oosit fertilize olduktan 1-3 gün sonrasına kadar yeniden başlamaz (Çelik, 2013 ve Plant ve ark. 2015).

#### **4.2.6. Ovulasyon**

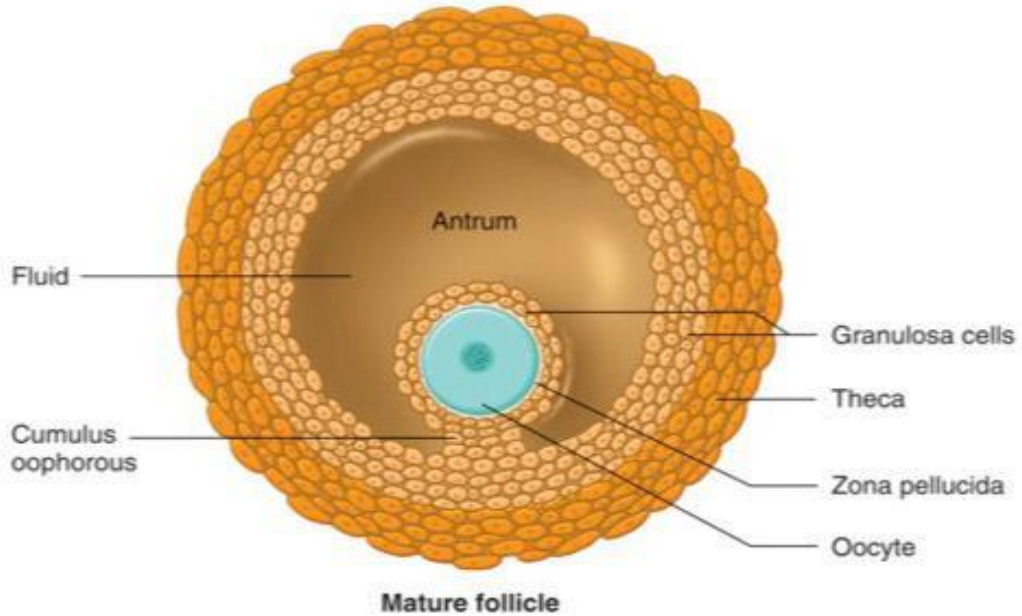
LH'nin maksimum düzeydeki artışı, follikülde önemli değişikliklere sebep olur ve bunun sonucunda ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyondan önce, follikül yüzeyinde küçük, açık renkli, avasküler bölgede stigma bölgesi açığa çıkar. LH piki, granüloza ve teka hücrelerinden sitokinlerle beraber hidrolitik enzimlerin salgılanmasını sağlar. Bu bölgede, yüzey epiteli ve teka bölgesi ince hale gelir ve membrana granüloza bu yüzeyde dejenere olur. Folliküler duvardaki bu incelme ve zayıflama östrojen tarafından indüklenmiş kollajenaz enzimi tarafından sağlanır (etraftaki bağ doku hücreleri sentez yapar). Ardından parçalanmış bağ dokusu sebebiyle bir immün cevap oluşur ve bölgeye beyaz kan hücrelerinin ve prostaglandinlerin göçü söz konusu olur.

Ardından oosit membrana granülozadan ayrılır ve kumulus ooforus ile folliküler sıvı içerisinde serbestçe yüzer hale gelir. Bunun ardından folliküler duvarda yer alan stigma bölgesinden çıkarak serbest hale gelir. Böylece ovulasyon meydana gelmiş olur. Follikülün yırtılmasını siklooksijenaz-2, metallerproteinazlar ve plazminojen aktivatörün içinde yer aldığı çeşitli faktörler sağlar. Oosit, kumulus hücrelerinin dış ve

iç tabakası ile kalın ekstrasellüler glikoprotein örtü ve zona pellusida ile kaplıdır (Şekil 9).

Preovulatuvar evrenin sonuna doğru kumulus hücrelerine yapışık olan granüloza hücreleri dejenere olur ve antral kavitenin içinde yüzen bir oosit- kumulus kompleksine dönüşür. LH pikine yanıt olarak kumulus hücreleri hiyaluronik asit ve diğer ekstrasellüler matriks maddelerini salgılar. Böylece fimbrialar tarafından kolaylıkla tutulmasını ve hareket ettirilmesini sağlamak için oosit-kumulus kompleksinin genişlemesi sağlanmış olur. Bunun yanında spermde oosit-kumulus kompleksini tarafından bulunması sağlanmış olur. Sperm membrana bağlı bir hiyalurinidaz enzimi salgılayarak kumulus hücrelerini kolayca geçebilecek hale gelir.

Ayrıca ovulasyon sırasında yeni oluşacak korpus luteumun beslenmesi için granüloza hücreleri vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) fibroblast temel büyüme faktörü (bFGF) gibi anjiyogenik faktörleri salgılar.



Şekil 9: Oosit ve kumulus kompleksi. <https://www.studyblue.com/notes/n/block-1/deck/4611742>, Erişim tarihi: 10.08. 2016.

LH düzeyinin ovulasyondan 34-36 saat önce artış göstermeye başlaması ve 9-24 saat önce de maksimum düzeye ulaşması preovulatuvar follikülde bir dizi olayları başlatır. Bu dönemler, teka interna ve granüloza hücrelerinde cAMP'yi uyarır ve selektif protein kinaz habercilerinin aktivasyonunu sağlar (şekil 7). Folliküller yırtılma öncesi bu haberci yolaklar geçici olarak eksprese olan spesifik genlerin transkripsiyonuna neden olurlar. Bunların genleri, folliküllerin yırtılması ve follikülden korpus luteumun yeniden modellenmesine sebep olan proteazların kontrol ettiği birbirini izleyen benzer hücre haberci silsilesini başlatır ve değiştirir. Bunun yanında, LH artışı mayoz bölünmeyi başlatarak mayoz II'nin metafaz evresinden sonra birinci polar cisimciğin hücre dışına itilmesini uyarır. Mayoz bölünme tekrar arreste uğrar ve fertilizasyon sonrası ikinci polar cisimciğin atılması ile tamamlanır.

Oositin mayoz II'nin metafaz evresinde durdurulması c-mos protoonkogen ile kodlanan ve oositte bulunan pp39<sup>mos</sup> proteini tarafından sağlanır. Oosit döllendiğinde pp39<sup>mos</sup> kalsiyuma bağımlı bir sistein proteaz olan, kalpain tarafından 30 dakika içerisinde etkisiz hale getirilir.

Kadına ait menstrual döngünün hangi aşamada olduğunun bilinmesi fertilitiyi arttırmak bakımından önemlidir. Ovulasyonun en önemli bulgularından bir tanesi termojenik etkisi olduğu bilinen progesteron ile vücut ısısının artmasıdır. Oositler ovulasyon olduktan 72 saat sonraya kadar yaşayabilmektedirler (Jones ve ark, 2013 ve Çelik, 2013).

#### **4.2.7. Korpus Luteumun Oluşumu**

LH salgılanmasında meydana gelen artış ile follikül yeniden düzenlenir ve korpus luteum halini alır (Şekil 7). Korpus luteum, büyük miktarda granüloza lutein, az miktarda teka lutein, immün, fibroblast ve endotelial hücrelerden oluşmaktadır. Ovulasyon esnasında az miktarda kanın antral boşluğa girmesi ile korpus hemarajikum oluşur. Bu durum korpus luteumun makrofaj ve mezenkimal hücrelerce istilasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da revaskülarizasyon oluşur. Çevre dokulardaki stromada bulunan kapiller ve fibroblastlar çoğalırlar ve bazal laminaya penetre olurlar. Granüloza-lutein hücreleri korpus luteuma transforme olurlar. Geçici bir endokrin organ sürekli olarak östradiol ve progesteron üretilir, salgılamakla beraber teka

hücreleri kadın cinsel hormonları yerine testesteron ve androstenedion gibi androjenleri salgılar. Bu androjenlerin çoğunluğu granüloza hücrelerinde östrojene dönüştürülür. Bu hormonlar ovaryan döngünün uzunluğunu belirlediği gibi gebeliğin ilk dönemlerinde de önemli yerleri vardır. Gebeliğin ilk evrelerinde plasental hCG korpus luteumun küçülmesini engellediği gibi korpus luteumun hamilelik korpus luteumuna dönüşmesini de sağlar. Ayrıca relaksin yapımını uyaran hCG, doğum ve laktasyon hazırlıkları için gerekli olan büyüme ve yeniden yapılandırmayı sağlayan doku mediyatörleri (uterus, fetal membran, meme bezi ve doğum kanalı) ve metalloproteinazların sentezlenmesini ve salgılanmasını düzenler (Çelik, 2013).

#### **4.2.8. Luteolizis**

Korpus luteumun, regresyonu veya lizisi sürecine luteolizis adı verilir. Bu durum kadın ürme döngüsünün sonlandığının göstergesidir. Bu dönemde ilk olarak fonksiyonel luteolizise neden olan progesteron seviyesinde azalma görülmekle beraber korpus luteumun kademeli olarak gerilemesi ile yapısal ve morfolojik luteinizasyon gerçekleştiğinden sonra küçük bir skar doku olan korpus albicans meydana gelir. Ovulasyondan bir iki gün sonra döllenme işlemi gerçekleşmezse bu olaylar dizini ortaya çıkar. Fakat döllenme gerçekleşirse korpus luteum büyür ve gebeliğin ilk 2-3 ayında işlevini yerine getirir. Placenta tarafından korpus luteumun işlevi devralındığında korpus luteum yavaşça küçülmeye başlar (Çelik, 2013 ve Sadler, 1996).

#### **4.2.9. Endometriyal Döngünün Kontrolü**

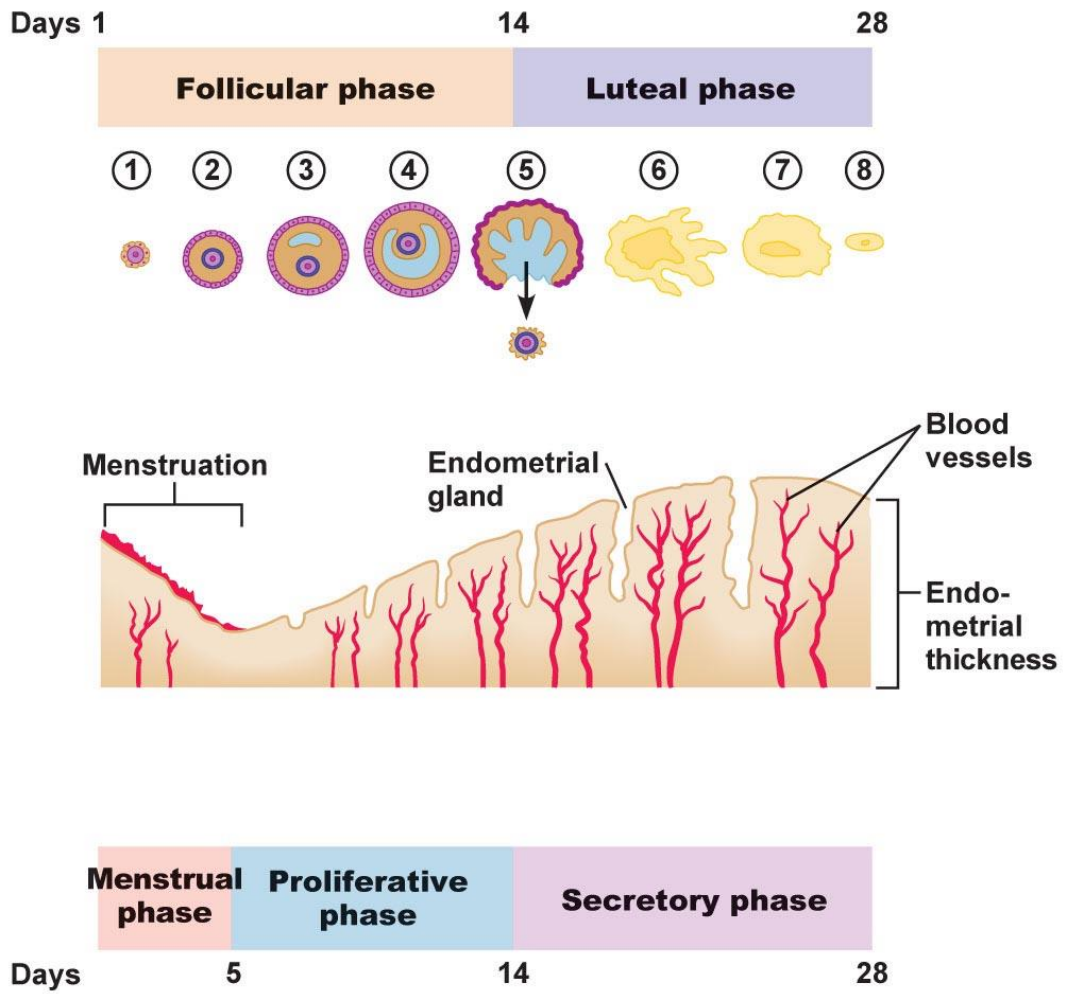
Uterus gebelik boyunca bebeğin gelişmesi ve büyümesi için özelleşmiş bir organdır. Bu hazırlıkların çoğu endometriyumda gerçekleşmekle beraber ovaryan döngüde salınan östrojen ve progesteron endometriyumun büyümesini, değişmesini ve dökülmesi olaylarını kontrol eder. Ancak bu steroid hormonların yanı sıra parakrin ve otokrin faktörleride bu dönemde etkisi vardır. Bu lokal faktörlerin en önemli kaynağı lökositlerdir (Ross, 2016). Endometriyumdaki lökosit sayısında ve tipinde menstrual siklusun zaman ve yerine göre değişiklik söz konusu olmaktadır. İmplantasyon, serviks açılması ve doğumda lökositlerin görevleri vardır. Kemokinler lökositin lokal olarak etkili olmasını sağlar. Endometriyum da birçok fizyolojik ve patolojik olaya neden olan kemokinler overlerin fonksiyonları (foliküler gelişim, ovulasyon,

steroidogenezis, atrezi ve korpus luteum) için de önemlidir. Endometriyum kanlanması arterlerin iki tipi ile olur. Menstruasyon kanaması sırasında dökülen 2/3'lük süperfisyel tabakayı uzun ve sarmal şeklinde olan spiral arterler beslerken, dökülme olmayan stratum bazale bölgesi kısa ve düz olan bazilar arterler tarafından beslenir. Miyometriyumda ovaryan döngüye paralel olarak kas hücre sayısında ve kasılabilme özelliklerinde değişiklikler meydana gelir. Menstrual siklus boyunca endometriyuma ait üç dönem tarif edilir (Şekil 10) (Ross, 2016 ve Çelik. 2013).

#### **4.2.9.1. Proliferatif dönem**

Bu dönem ovaryan folliküler dönem ile eş zamanlı olarak gerçekleşir. Östrojen endometriyal epitel hücrelerinde proliferasyona neden olur ve ovulasyona denk gelen zamanda östradiol ve progesteron reseptör ekspresyonundaki artışın en yüksek seviyeye ulaştığı zaman ile karakterizedir. Endometriyumun olgunlaşmasının ilk dönemi embriyo implantasyonu için hazırlık dönemidir. Preovulatuvar endometriyal çoğalma, uterus mukozasının hipertrofisi ile ilişkilidir.





© 2011 Pearson Education, Inc.

Şekil 10: Endometrial Döngü ve safhaları. [http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202007/chapter\\_22%20Fall%202007.htm](http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202007/chapter_22%20Fall%202007.htm). Erişim tarihi: 16.08.2016.

#### 4.2.9.2. Sekretuvar dönem

Endometrial epitel hücrelerinin progesteron etkisi ile farklılaşarak sekretuvar hücrelere dönüşmesi ile tanımlanan bu süreç overin luteal dönemine denk gelmektedir (Şekil 10). Sekretuvar dönemde implantasyon penceresi olarak adlandırılan embryonun implantasyonu için kısa bir kabul dönemi mevcuttur. Bu sırada IL-8 ve MCP-1 sekresyonunda azalma meydana gelmektedir. Sekretuvar dönemin sonuna doğru yükselen progesteron seviyesinin baskılayıcı etkisinin belirtisi olarak östrojen reseptörünün glandular ekspresyonu belirgin olarak azalır. Luteal fazın son zamanlarında endometriyum ön hipofiz gibi prolaktin üretir, ancak endometriyal prolaktinin fonksiyonu henüz açık değildir. Progesteron implantasyon sırasında lokal inflamatuvar cevabı azaltır. Hamileliğin gerçekleşmesi durumunda IL-8 ve MCP-1 sentezinde azalma gözlemlenirken IFN- $\gamma$ , PAF ve TNF- $\alpha$  sentezinde artış olur.

#### 4.2.9.3. Menstrual dönem

Endometriyumun fonksiyonel tabakasının proteolizisi ve iskemisi sonucu endometriyumun dökülmesi ile karakterizedir. Proteolitik enzimler postovulatuvar periyodun ilk yarısında membrana bağlı lizozomlarda depo edilir. Menstrual döngünün 24-25. günlerinde, östrojen ve progesteron azalması ile bu lizozomların membran bütünlüğü bozulur ve bunun sonucunda glandular, vasküler endotelial ve stromal hücrelerin lizisi gerçekleşir. Menstrual döngünün erken zamanlarında endometriyal damarların vazokonstriksiyonu ile oluşan iskemi sonucu kapillerin yırtılması ile oluşan iskemi sonucu kapillerin yırtılması ve kanama meydana gelir (Şekil 10). Beslenmenin azalmasına bağlı olarak ekstremlüler sıvının azalması ve spiral arterlerin vazokonstriksiyonu ile endometriyum büzülür. Endometriyuma gelen kanın azalması sebebiyle hücreler ölür ve kanama gerçekleşir. Menstrual kanama sırasında endometriyumda MCP-1, makrofaj inflamatuvar protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), IL-8 ve RANTES üretiminde artış meydana gelir. Ek olarak, sekretuvar fazın son döneminde endometriyumdan prostaglandin F2 $\alpha$  yapımında da artış olur. Bu artış, dejenere olmuş endometriyumun dışarı atılmasına yardımcı olmak için lizozomlardan asit hidrolaz yapımını ve miyometriyal kontraksiyonu artırır. Vazokonstriksiyon yavaş yavaş ilerlerken hasara uğramış damarlardan kan sızarak menstrual kanama başlar ve sonuçta bazal tabaka hariç endometriyumun tümü uterustan dökülerek kanla

dışarı atılır. Menstrual kanın büyük bir bölümü arterial kökenliyen %25'i ven kökenlidir. Menstrual kan, prostaglandinler, doku artıkları ve endometriyal dokudan köken alan fibrinolizin içerir. Bu fibrinilozin pıhtıyı erittiği için normal bir menstrual kanda eğer kanama çok fazla olmazsa pıhtılaşma olmaz. Menstrual kanama ortalama 3-5 gün sürmekle beraber ortalama 30 ml kan kaybı gerçekleşir (Ross 2016; Delilbaşı, 2008 ve Çelik, 2013).

#### **4.2.10. Uterus Serviksinde Döngüsel Değişimler**

Serviks uterusun devamı halindedir ancak birçok bakımdan farklılıklarda göstermektedir. Serviks mukozası döngüsel olarak dökülmemesine rağmen servikal mukusta düzenli bir yenilenme söz konusudur. Spermilerin daha uzun süre servikte hayatta kalabilmesi ve uterusu kolaylıkla ulaşım için östrojen servikal mukusu daha ince ve alkali hale getirir. Progesteron ise mukusu daha kalın, hücrece zengin ve yapışkan bir hale getirir. Ovulasyon sırasında mukus ince ve elastitesi daha fazladır (Çelik, 2013).

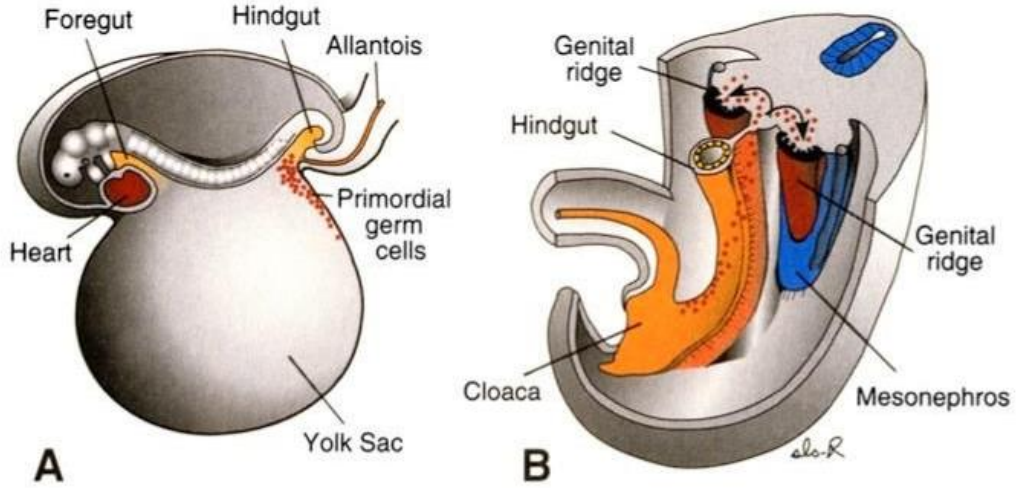
##### **4.2.10.1. Vajinal döngü**

Vajinal epitelyum östrojen etkisi altında kornifiye olmaktadır. Progesteron etkisi ile kalın bir mukus oluşur ve epitelyum proliferasyonla beraber lökositlerce istila edilir.

### **4.3. YOLK KESESİNDEN PUBERTEYE KADAR OOSİT MATURASYONU**

Dişi ve erkek üreme hücresi olan gametler, ilk olarak gelişimin 4. haftasında ayırt edilebilir ve bu hücrelere primordial germ hücreleri (PGH) adı verilir. Bu hücreler vitellus kesesinin arka duvarındaki endodermden köken alırlar. Primordial germ hücreleri gelişimin erken dönemlerinde ilkel çizginin (Primitive streak) yanındaki ekstraembriyonik dokular ile bunların bağlandığı saptta bulunurlar. Burada erken gelişim süresince somatik hücrelerin büyük bir kısmını etkileyen uyarıcı etkide bulunurlar. Primordial germ hücreleri embriyo gelişiminin 11. basamağında (25-30 gün) yapısal hücrelerden büyüklükleri ve kromatin içerikleri bakımından ayrılırlar. Birçok vücut hücresi ile karşılaştırıldığında 12-20 µm çapa kadar ulaşan büyüklükte oldukça iri hücrelerdir. Karakteristik olarak zarı oldukça iyi bir şekilde gözlenebilen veziküller bir çekirdeği vardır. Bu hücreler allantoisin hemen önünde vitellus kesesi

duvarında kaudal bölgede yerleşik durumda bulunur. Hücreler gelişimlerinin 4. Haftasının sonlarına doğru ameboid hareketlerle vitellus kesesi duvarından dorsal mezenter aracılığıyla gonadal kabartıya göç ederler ve göç 6. haftaya kadar devam eder (Şekil 11). Bu göç sırasında ameboid hareketler yanında embriyonun büyümesine bağlı yer değişimi sonucunda primordial germ hücreleri dorsokranial yönde mezenter içine geçer. Buradan çöломun dorsal açısını geçerek genital tüberküle ulaşır. Genital tüberkülün göç etmekte olan primordial germ hücreleri sayısı üzerine geniş bir alanda etki ettiği ve göçün yönünü belirleyip primordial germ hücreleri topluluğuna destek konusunda yardımcı olduklarına inanılmaktadır. PGH'leri göç hareketlerini tamamlayıp gonadal kabartıya ulaştıklarında embriyo dişi karakterdeyse (XX) gonadal kabartının dış kısmına; erkek karakterdeyse (XY) iç kısmına yerleştiğine dair veriler bulunmaktadır. PGH'leri 2n kromozomlu çekirdeğe sahip hücreler olup mitoz bölünmeyle çoğalma gösterirler ve 1. mayoz bölünmeye girmeden önce hücre siklusunda S fazında 2n kromozom sayısına karşın DNA miktarı normalin 2 katıdır. PGH'leri göçleri süresince mitoz bölünmelerine devam ederler. Göç ettikleri gonadal kabartıda embriyonun cinsine göre spermatogonia veya oogonia'lara farklılaşırlar. Bu hücrelerde 2n kromozomlu hücrelerdir. Ama DNA miktarı yarıya indirgenmiştir. Gonadal kabartıya ulaştıklarında gonadın cinsini belirlemek üzere buradaki mezodermal dokuyu uyararak ovaryum veya testis gelişme sinyallerini oluştururlar. Birçok omurgalıda germ hücrelerinde mitoz, genital primordiuma ulaştıklarında yenilenmek için erken dönemde ayrıldıklarından sonra durmaktadır. Bununla birlikte memelilerde duraklama görülmez ve hücreler mezonefrik tüberküle doğru gerek giderken ve gerekse ulaştıktan sonra üremeye devam ederler. Bu göçü tamamlayamayan hücreler parçalanırlar (Sadler,2011 ve Kornbluth ve ark. 2015).



Şekil 11: 3 haftalık embriyoda yolk kesesi duvarında allantois bağlantısına yakın bir yerde primordial germ hücrelerini gösteren şematik çizim. [http://www.murattosun.com/faculty/Genel%20Embriyoloji%20\(2013\)%20Total.pdf](http://www.murattosun.com/faculty/Genel%20Embriyoloji%20(2013)%20Total.pdf) , Erişim tarihi: 10.08.2016.

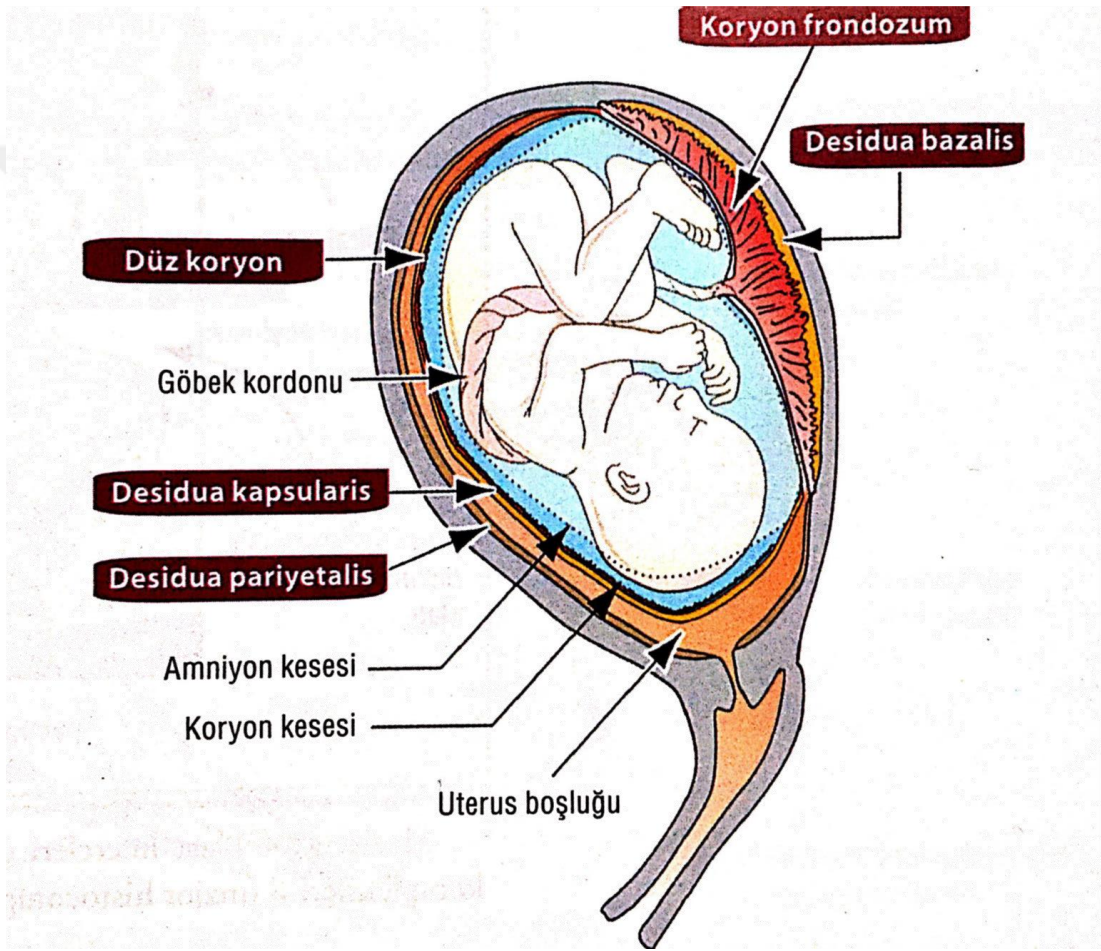
#### 4.4. PLASENTA

Maternal ve fetal dokulardan gelişen plasenta; fetusun devamlılığını sağlamaktadır. Plasenta koryon frondozumdan oluşan fetal ve desidua bazalisten oluşan maternal yüzlerden meydana gelmiştir. Bu iki parça, maternal ve fetal sirkülasyonlar arasında maddelerin fizyolojik değişiminden görevlidir. Fetal gelişimin çeşitli safhalarında plasenta, fetal organlar fonksiyonel hale gelene kadar birçok önemli ve dikkat çekici görevler üstlenir. Bu görevler gaz alış-verişi, boşaltım, homeostazisin sağlanması, hormon salgılanması, kan yapımı ve hepatik metabolik fonksiyonlar olarak sıralanabilir.

Olgun plasenta 3 cm eninde, 20 cm çapında ve yaklaşık 500 gr ağırlığındadır. Fetal yüz düz olmakla birlikte amniyotik zar ile birleşmiştir. Maternal kısım ise desidua bazalisten gelişen plasenta bölmeleri tarafından 30-35 loba ayrılır ve bu plasenta bölmeleri koryonik plağa doğru uzanırlar. Her lob birçok kotiledondan meydana gelmekle beraber her bir kotiledon ana kök villus ve onun dallarından oluşur. Plasentanın maternal yüze ait olan bölümü desiduidan oluşur. Desidua gebe uterusun endometriyumuna verilen isimdir. İmplant olmuş embriyo ile ilişkilerine göre isimlendirilen 3 ayrı desidua bölgesi bulunmaktadır. Desidua bazalis, plasentanın maternal içeriğini oluşturmaktadır. Bunun yanında desidua bazalis tarafında bulunan koryonik villuslar çok iyi gelişerek koryon frondozumu oluştururlar. Desidua

kapsularis ise gelişen embriyoyu ve koryon kesesini kaplayan yüzeysel bir tabakadır. Üçüncü kısım olan desidua pariyetalis ise embriyonun olmadığı uterus boşluğunda bulunan desidua kısmıdır (Şekil 12).

Plasentanın fetal bölümü koryon frondozum tarafından oluşturulur. Koryon plağı ve sitotroblast hücre katmanından köken alan villuslar ise koryon frondozumu meydana getirirler. Koryon villusları desidua kapsularisin dış yüzeyinin atrofisi sonucu koryon leve (düz koryon) adını alan düz koryon oluşumuyla sonuçlanır.

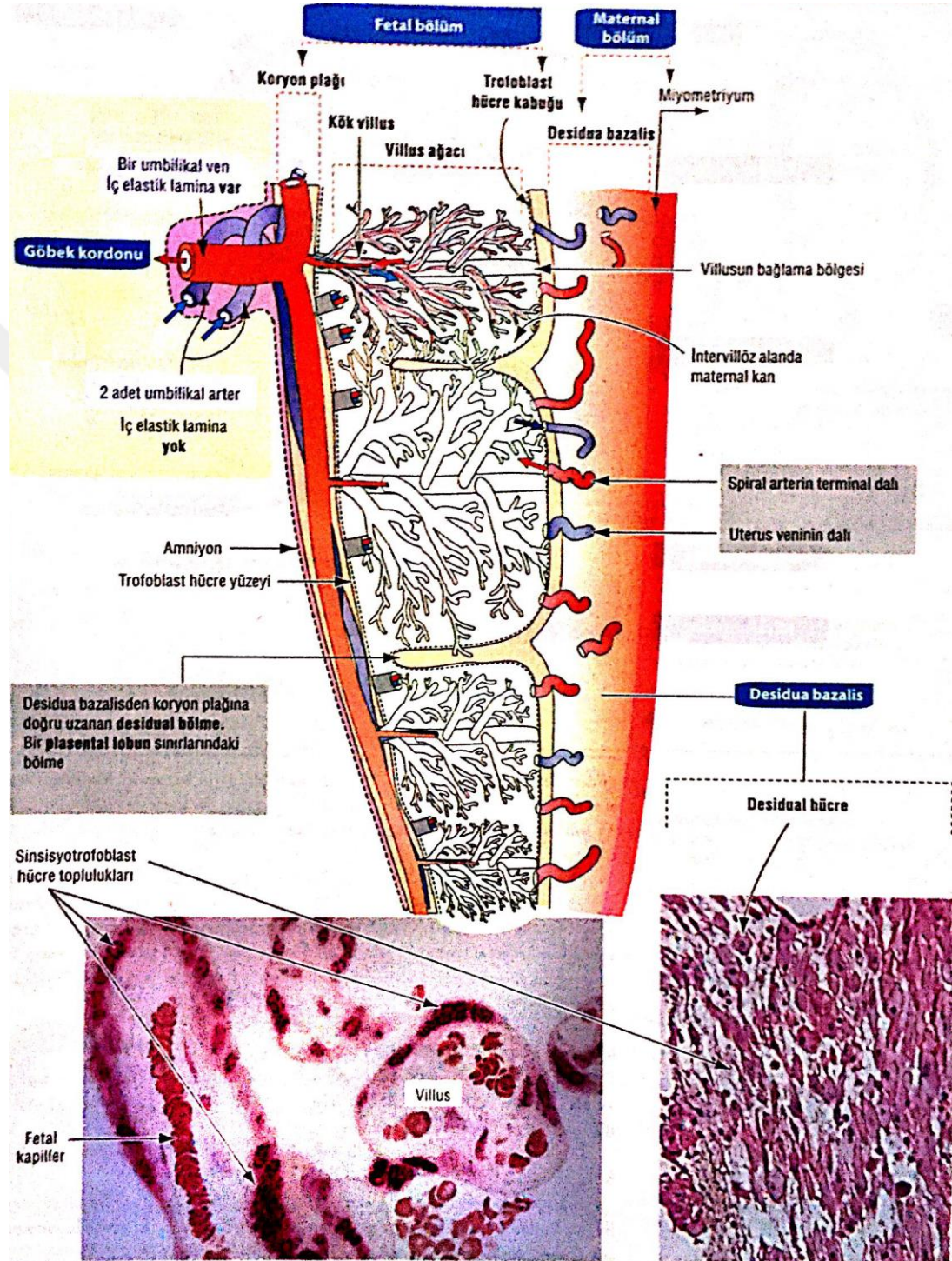


Şekil 12: Uterus ve fetal membranlar (Kierszenbaum, 2006)

Plasentanın embriyoya bakan yüzünde, merkezde göbek kordonu yer alır. Göbek kordonu, iki umbilikal arter yardımı ile fetüsten plasentaya oksijenden fakir kan akışını sağlar. Oksijen bakımından zengin kan ise umbilikal ven yardımı ile fetüse gelir.

Maternal ve fetal yapılar arasında bulunan intervillöz alanlarda maternal dolaşım kanı bulunur. Spiral arterlerin açık uçlarından gelen arteriyel kan intervillöz alanlar

boyunca akarak uterus venlerine gelir. Sitotrofoblast hücrelerden oluşan tikaçlar ve arterlerin duvarlarında bulunan düz kas hücrelerinin kontraksiyonu kan akışını kontrol eder (Şekil 13).

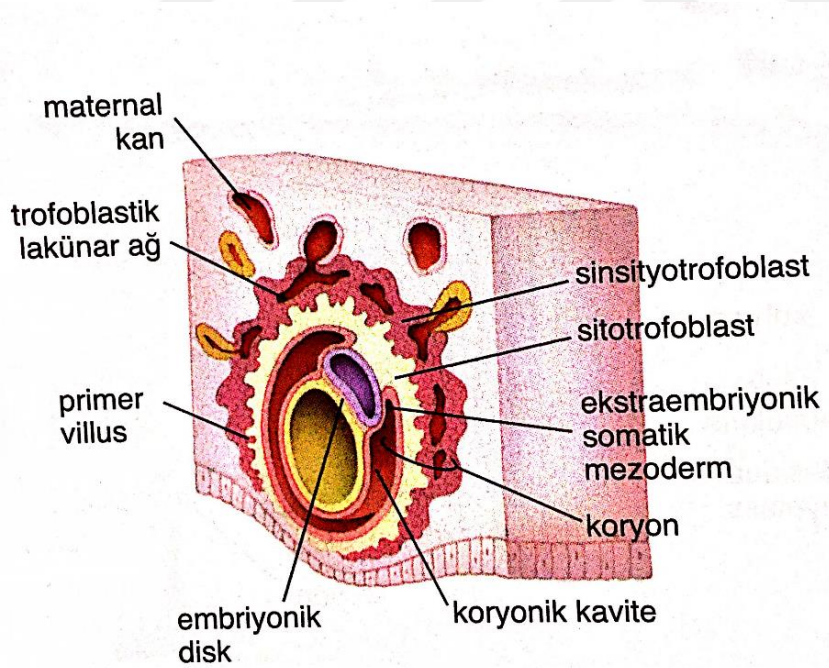


Şekil 13: Plasentanın anatomisi ve fizyolojisi (Kierszenbaum, 2006)

Uteroplazental sirkulatuar sistem, sinsityotrofoblastın içinde trofoblastik lakünaların oluşması ile yaklaşık 9. günde gelişmeye başlar. Maternal yüzün kapillerlerinden gelişen maternal sinüzoidler trofoblastik lakünalar ile anastomoz yaparlar. Lakünelara açılan arteriyal ve venöz kanalların arasındaki basınç farkı, arterlerden venlere doğru akımı sağlar ve böylece primitif uteroplazental dolaşım sağlanır. Sinsityotrofoblastın içinde bulunan çok sayıda pinositik vezikül, maternal damarlardan embriyoya besin transferi olduğunu göstermektedir.

Sitotrofoblastın proliferasyonu, koryonik mezodermin büyümesi ve kan damarlarının gelişimi sırasıyla aşağıdakileri oluşturur.

Primer koryonik villuslar, hızla proliferen olan sitotrofoblastlardan oluşurlar. Sinsityotrofoblastın içindeki kanla dolu trofoblastik lakünelara hücre kordonları ya da hücre kütleleri gönderirler. Primer villuslar gelişimin 11-13. Günleri arasında ortaya çıkar (Şekil 14).

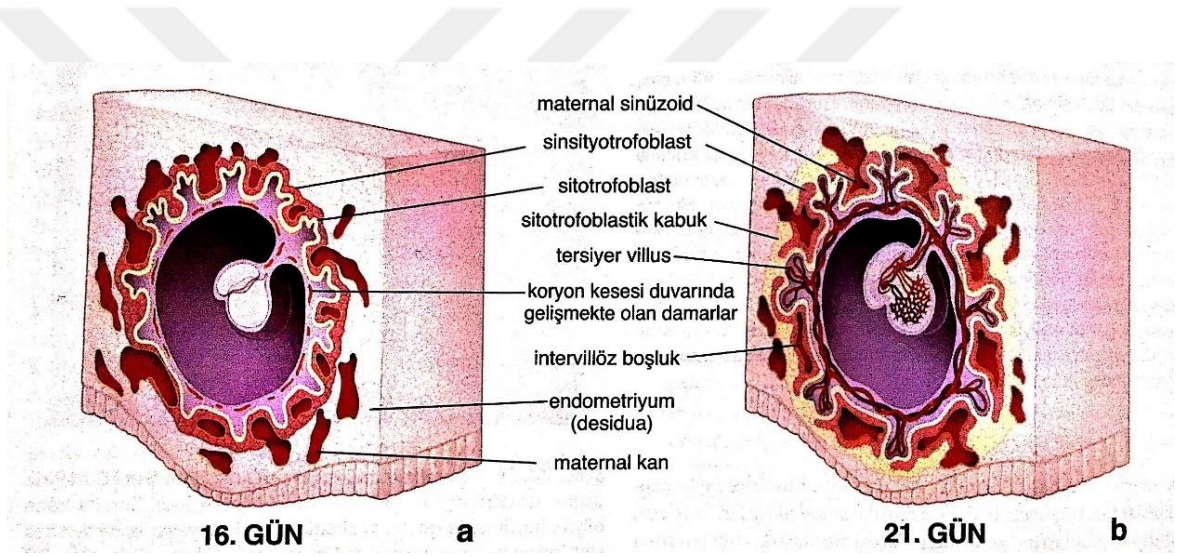


Şekil 14: Primer villuslar (Ross, 2016)



Sekonder koryonik villuslar, mezenkimden meydana gelen bir merkezi bölüm ile onu çevreleyen bir iç sitotrofoblast tabakasından ve bir dış sinsityotrofoblast tabakasından oluşmaktadır. Koryonik mezekimden gelen gevşek bağ dokusu tarafından yaklaşık 16. günde primer koryonik villusların invaze edilmeleriyle oluşurlar. Sekonder villuslar koryonik kesenin yüzeyinin tamamını kaplarlar. (Şekil 15- a)

Tersiyer koryonik villuslar, üçüncü haftanın sonunda sekonder villusların, kendi bağ dokusu yapısındaki merkezi kısımlarında gelişen kan damarları ile vaskülarize hale gelmeleriyle oluşurlar. (Şekil 15-b) (Ross, 2016).

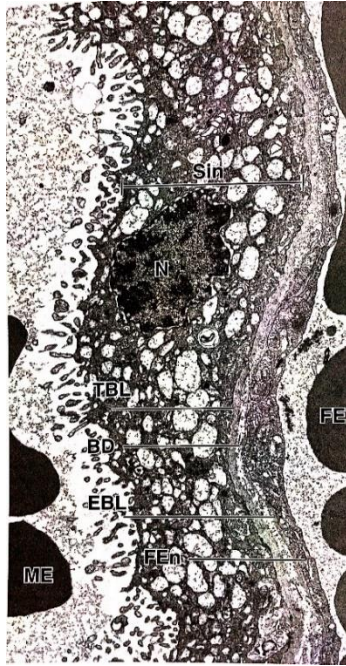


Şekil 15: Sekonder (a) ve tersiyer (b) koryonik villuslar (Ross, 2016).

Tersiyer villuslar meydana gelirken villuslardaki sitotrofoblastik hücreler sinsityotrofoblastın içinden geçerek dışa doğru büyümeye devam eder. Sitotrofoblastik hücreler maternal endometriyuma ulaştıklarında lateral olarak büyürler ve komşu villuslardan büyüyen benzer uzantılarla karşılaşırlar. Böylece sinsityotrofoblastın etrafında sitotrofoblastik hücrelerden oluşan ince bir tabaka oluşur ve bu tabakaya trofoblastik kabuk denmektedir. Trofoblastik kabuk sadece maternal damarların intervillöz boşluklarla bağlantı yerlerinde kesintiye uğrar. Plasentanın ileri gelişimi trofoblastik kabuğun intertisyel büyümesi ile sağlanmaktadır.

Villusun bağ dokusu yapısındaki stromasında birkaç hücre tipi vardır. Bunlar retiküler hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, miyofibroblastlar, mezenkimal hücreler, makrofajlar ve hofbauer hücreler olarak adlandırılan fetal plasental antijen sunan hücrelerdir. Fetal plasental antijen sunan hücreler, fetal kaynaklı spesifik villöz makrofajlardır ve plasental doğal immün reaksiyonlarda rol oynamaktadırlar. Bu makrofajlar antijene cevap olarak proliferasyonla beraber çeşitli patojenleri tanıyıp bağlanan özel yüzey reseptörlerinin ekspresyonunu artırırlar. Stimüle edildiklerinde yüzeylerindeki MHC-II (majör doku uyumluluğu kompleksi) moleküllerinin sayısını artırırlar. Erken dönemdeki plasentada daha yaygındırlar. Bu hücrelerde yer alan vakuoller, lipid, glikozaminoglikan ve glikoprotein içerirler.

Fetal ve maternal kan plasental bariyer tarafından birbirinden ayrılmaktadır. Plasental bariyer maternal ve fetal kanın birbirinden ayrılması durumu olmakla birlikte fetal doku tabakaları tarafından sağlanmaktadır. Bu tabakalar plasental bariyerden madde değişimini kolaylaştırmak için dördüncü ayda başlayarak incelirler. Villusun duvarının incilmesi, kısmen iç sitotrofoblast tabakasının dejenerasyonu ile gerçekleşmektedir. Plasental bariyer; sinsityotrofoblast, kesintili iç sitotrofoblast tabakası, villusun bağ (mezenkimal) dokusu, endotelin bazal laminası ve tersiyer villustaki fetal plasental kapillerin endotelinden oluşmaktadır (Şekil 16).



Şekil 16: Gebeliğin üçüncü trimesterindeki insan plasental bariyeri (Ross, 2016).

Plasenta, maternal ve fetal dolaşım arasında gazların ve metabolitlerin değişim yeridir. Fetal kan plasentaya bir çift umblikal arter yoluyla girmektedir. Bu arterler plasentaya girdiklerinde koryonik plakta birçok dal veren ve radial olarak uzanan birkaç dal verirler. Bu damarların dalları villuslara girerek intervillöz boşluklarla yakın ilişkili yaygın kapiller ağ oluştururlar. Gazlar ve metabolik ürünler, iki akımını ayırırın ince fetal tabaka üzerinden karşılıklı olarak değiştirilir. Antikorlar bu tabakayı geçerek fetal dolaşıma katılırlar ve enfeksiyöz ajanlara karşı pasifik bağışıklık sağlarlar. Fetal kan, arterlere paralel uzanan ven sistemi üzerinden geri döner ve bu venler tek bir umblikal veni oluşturmak üzere birleşirler.

Maternal kan plasentaya bazal plağı penetre eden 80-100 spiral endometriyal arter ile ulaşır. Spiral arterlerden gelen kan intervillöz boşlukların bazaline akar. İntervillöz boşluklar dakikada 3-4 kez yenilenen 150 ml civarında maternal kan içerirler. Spiral arterlerdeki kan basıncı intervillöz boşluklardakinden çok daha fazladır. Her atımda boşluklara kan enjekte edildiğinde boşlukların derinine doğru yönelir. Basınç azaldığında kan villusların yüzeyine geri akar ve boşlukların bazalinde bulunan endometriyal venlere girer.

Kan, villusların üzerinden geçerken gazların ve metabolik ürünlerin değişimi gerçekleşir. Normalde su, karbondioksit, metabolik atık ürünler ve hormonlar fetal kandan maternal kana geçer. Su, oksijen, metabolitler, elektrolitler, vitaminler, hormonlar ve bazı antikorlar zıt yönde geçerler. Plasental bariyer, alkol, nikotin, virüsler, ilaçlar, eksojen hormonlar ve ağır metaller gibi potansiyel olarak tehlikeli ajanları dışlamaz. Be sebeple gebelik sırasında bu tür ajanların alımından kaçınmak gerekmektedir.

Plasental kan akımı başlamadan önce, embriyonun gelişimi trofoblastlar tarafından sentezlenen ya da taşınan metabolik ürünler ile gerçekleşir. Sinsityotrofoblast, glikojen, kolesterol, yağ asitleri ve embriyo tarafından kullanılan diğer ürünleri sentezlenir (Çelik 2013, Kierszenbaum 2006, Ross 2016, Sadler 2011).

Plasentada yer alan villözler fonksiyonel birimler olarak adlandırılırlar. Herbir villözün dış tabakası çok çekirdekli sinsityotrofoblastlardan oluşur. Bu tabakanın

hemen altında tek çekirdekli sitotrofoblastlar yer alır ve kesintili bir tabaka oluşturur. Herbir villözün stroması fibroblastlar ve plasental makrofajlardan oluşur. Stroma içerisinde fetal kan damarları endotelial hücreler ile çevrelenir. Ekstravillöz trofoblastlar plasental septa ile fetal ve maternal plakaları doldurmaktadır. Ekstravillöz trofoblastlar maternal desidua ve miyometriyumun üçte birlik bölümüne invaze olurlar. Burada vaskülarizasyona destek vererek plasentanın kanlanmasını sağlarlar.

Endotheliokorial yüzeyde, trofoblast hücrelerinin invazyonu uterin epitelin yok olmasını sağlayarak fetal ve maternal bariyerin incelmelerini sağlar. Invaziv hemokoryal yüz, trofoblastlar ile maternal damarlar arasındaki direkt bağlantı ile karakterizedir. Bunun yanında birkaç tabaka hücre maternal ve fetal kanı birbirinden ayırmaktadır (Plant ve ark, 2015).

#### **4.5. KÖK HÜCRELER**

Kök hücreler; özelleşmemiş, süresiz olarak kendini yenileyebilen, sürekli bölünme yeteneği sayesinde var olan popülasyonunu koruyarak gelişim sürecinde kendisinden sonra gelen progenitör hücre popülasyonunu oluşturan, uygun ortam ve şartlar sağlandığında istenilen somatik hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir. Farklanma, çok hücreli organizmaları oluşturan hücrelerin olgunlaşma sürecinde geçirdikleri bir dizi değişimi tanımlamak için kullanılır. Farklanma sitokinlerin, büyüme ve farklanma faktörlerinin, hücre dışı matris proteinlerinin ve hücrelerarası iletişimlerin kombine etkisiyle başarılan karmaşık olaylar bütünüdür.( Deveci, 2012 )

Doku ve organların oluşum ve gelişimleri sırasında kök hücrelerden oluşan progenitör hücreler ve bu hücrelerden meydana gelen daha alt grup hücreler zaman içerisinde farklılaşarak buldukları doku ve organa fonksiyonel ve metabolik özelliğini kazandırır.

Kök hücrelerin gelişim biyolojisi ve genetik alanlarında erken dönem doku ve organ gelişimi ile genetik hastalıkların embriyo aşamasındaki etkilerinin incelenmesinde, farmakolojide yeni ilaçların geliştirilmesi ve geliştirilme aşamasında olan ilaçların memeli modellerinde verimli olarak denenmesi aşamasında, toksikolojide ve toksik maddelerin tayini ve fetal dönemdeki gelişme etkilerinin

incelenmesinde ve en önemlisi tıbbın yetersiz kaldığı ölümcül hastalıkların tedavisinde yakın gelecekte büyük oranda fayda sağlayacağı öngörülmektedir.

Son yıllara kadar kemik iliği, periferik kan ve göbek kordonu gibi kök hücre kaynakları olduğu bilinirken günümüzde pek çok doku ve organın kök hücre kaynağı olduğu yapılan yeni çalışmalar ile gösterilmektedir. Memelilerde kök hücreler temel olarak blastokist evresinin iç tabakasından elde edilebilen embriyonik kök hücreler ve çeşitli dokularda bulunan erişkin kök hücreler olarak ikiye ayrılabilir (Can 2014).

#### **4.5.1. Embriyonik Kök Hücreler**

İmplantasyon öncesi gelişim dönemindeki bir embriyonun fetüsü oluşturacak olan iç hücre kitlesinin (İHK) trofoektoderm hücrelerinden ayrıştırılması ve izolasyonu sonrasında laboratuvar ortamında çoğaltılması ile elde edilirler. Uygun şartlar sağlandığında elde edildikleri organizmanın bütün somatik hücrelerine farklılaşabilme özelliğine sahip olan embriyonik kök hücreler, bunun yanında sürekli ve yapısal bir değişiklik olmadan çoğalabilirler. Kök hücreler farklılaşabilme özellikleri sebebiyle erişkin hücrelere önemli bir alternatif kaynak olarak görülmektedir.

Evans ve Kaufman, fare modelinde ilk kez 1981 yılında embriyonik kök hücreleri (EKH) elde etmişlerdir. İnsanda EKH eldesini ise 17 yıl sonra bildirilmiştir (Thomson ve ark, 1998). İlk elde edilışinden şu ana kadar elde edilen EKH'lerinin hepsi blastokist aşamasındaki insan embriyolarından elde edilmiştir. Ancak son yapılan çalışmalar daha erken ya da geç gelişim dönemindeki embriyolardan da EKH'lerin elde edildiği gösterilmiştir.

Ayrıca EKH'ler elde edildikleri kaynaklara göre birçok genetik geçişli hastalıkların erken embriyo evresi modellenmesinde de kullanılabilir son derece önemli bir kaynaktır. İmplantasyon öncesi genetik tanı ile belirli bir hastalığı taşıyan embriyolar implantasyon öncesi dönemde embriyoyu oluşturan hücre grubu içerisinden bir hücre alınması ve incelenmesi sonucunda tespit edilebilmekte, böylece genetik hastalığı taşımayan embriyolar transfer edilerek ailenin sağlıklı bir çocuğa sahip olması mümkün kılmaktadır. İnsan EKH'lerinin tüm bu potansiyelinin yanında tedavi amaçlı kullanımlarını engelleyen hayvan kaynaklı kültür araçlarının kullanımı,

doku uyum problemi, tümör oluşturma riski gibi ortaya konulmuş avantajlı olmayan durumlar vardır. Ayrıca etik problemlerde EKH kullanımını kısıtlamaktadır

Fertilizasyon sonrası implantasyon oluşması trofoblast hücrelerinin uygun şekilde farklılaşmasına ve işlevsel bir plasenta dokusu oluşturulmasına bağlıdır. Sitotrofoblast denilen ektoderm kökenli kök hücreler plasentayı rahim içerisindeki kan dolaşımına bağlarlar ve neticesinde adı geçen doku gebelik sırasında gaz, besin maddesi ve atık maddelerin sirkülasyonunu sağlar. Plasenta ayrıca hematopoietik bir organ görevi de görmektedir. Farelerde embriyogenez sırasında plasenta dokusunda karaciğer ve yolk kesesine göre karşılaştırıldığında 2-4 kat daha fazla hematopoietik progenitör hücre olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalar bu hücrelerin yanında plasentanın mezenkimal kök hücrelere benzer morfolojide multipotent kök hücrelerin varlığı tespit edilmekle beraber c-kit, Thy-1 gibi mezenkimal kök hücrelere ait yüzey belirteçleri buldukları gözlemlenmiştir. Bu hücreler, vasküler endotelial, pankreatik ve nöron benzeri hücrelere dönüşebilmektedir.

İnsan plasenta dokusu mezenkimal kök hücre içerir (Igura ve ark, 2004). Ayrıca yapılan diğer çalışmalarla plasenta dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücre arasında belirgin farklılıkların olmadığı gösterilmiş olup klinik tedavide kullanılabileceği ortaya konulmuştur. Aynı zamanda özellikle sitotrofoblastların invaziv karakterleri ve tümör oluşturma riskleri göz önüne alındığında bu hücreler ile gerçekleştirilecek potansiyel klinik uygulama öncesinde çok sayıda güvenlik çalışması yapılması gerektiği ortaya konulmuştur (Delilbaşı, 2008 ve Can, 2014).

#### **4.5.2. Plasenta Kaynaklı Kök Hücreler**

İnsan plasentasından kök hücre özelliklerini irdeleyen çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir. Doğumu izleyen birkaç dakika içinde, etik kaygılar olmaksızın, bu hücreleri barındıran dokuya kolayca ulaşılabilmesi bu dokulardan elde edilen kök hücrelerin hücresel tedavideki yerlerinin ayrıntısıyla değerlendirilmesini sağlamıştır (Can 2014).

Plasenta karmaşık bir histolojik yapıya sahiptir. Doğumdan sonra inovulasyonla ayrılan fetüse ait olan parçası plasentanın temel yapısını oluşturur. Desiduaya bakan

yüzünde milyonlarca koryon villusunun tersiyer dallanmaları yaklaşık 35 lob oluşturur ve bunun altında da bu hücelere alttan desteklik görevi yapan ve fetüse ait kan damarlarını barındıran koryon plakası yer alır. Koryon villuslarının üzeri trofoblastların türevi olan sinsityotrofoblastlarla kaplıdır. Buradan ayrılan trofoblastlar villus dışı trofoblastlar olarak saplı veya serbest hücre kolonları meydana getirilir. Koryon terimi koryon villuslarının üzerini örten trofoblast hücreleri ile birlikte altındaki mezenkim dokusunu tanımlar. Koryon plakası ise embriyo dışı mezodermden köken alan embriyoya özgü bağ dokusu bölümüdür (Can 2014).

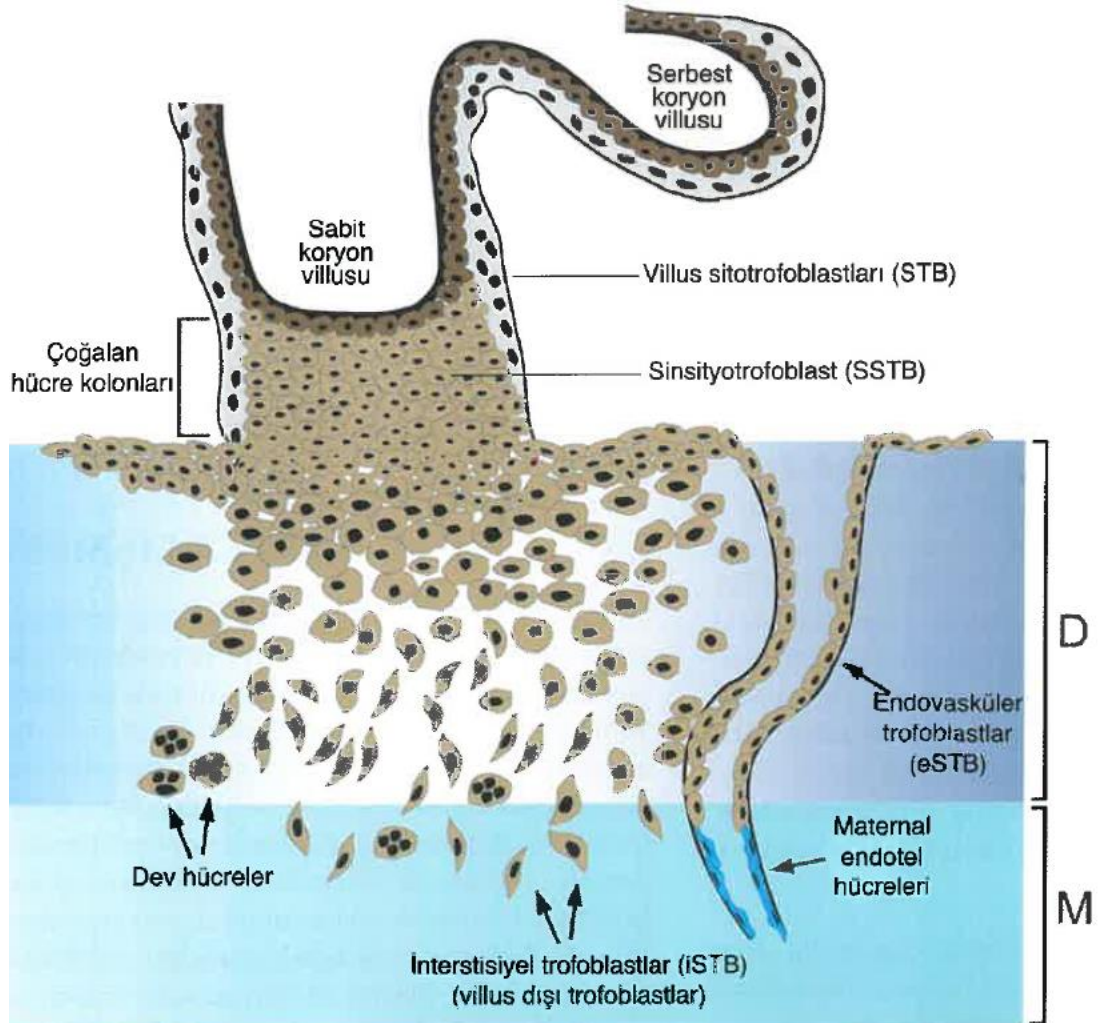
#### **4.5.3. Trofoektodermin İleri Gelişmesi**

Kelime anlamı ‘besleyici hücre’ anlamına gelen trofoblast, plasentalı memelilerin erken embriyogenez sürecinde ortaya çıkan hücrelerdir. Bu hücreler türler arasında bazı farklar gösterir. Kemiricilerde trofoblast serisi hücrelerin tipi ve bu sebeple isimlendirilmesi insandankinden farklıdır. Örneğin, farede dev trofoblastlar, spongiyotrofoblastlar, glikojen hücreleri gibi isimlerle tanınan trofoblast türevlerinin tanımı insanlarda farklıdır (Can 2014).

Endometriyum epiteliyle implantasyon sırasında karşılaşan trofoblastlar, kısa süre sonra sinsityotrofoblast haline gelirler. Epitel ve bazal membranın geçilmesiyle desidua (gebelikteki endometriyum) ve anneye ait kan damarlarıyla karşılaşan sinsityotrofoblastlar hızla çoğalarak ilk birkaç gün içinde embriyonun içinde yer aldığı küresel yapının dışındaki yüzey alanını genişletmeye çalışır. Desiduanın içine doğru parmak benzeri çıkıntılar yaparak ilerleyen sinsityotrofoblastlar, böylece birincil koryon villuslarını dışardan saran hücre tabakasını oluşturur. Villusların içindeyse embriyo dışı mezodermden gelişen embriyo bağ dokusu yer almaya başlar. Kısa zamanda, bu doku içerisinde fetüse ait kan damarları belirginleşir. Ardından fetüs anne engeli (fetomaternal bariyer) ortaya çıkmaya, yani fetüs ile anne arasında önemli miktarda madde ve gaz alış-verişi başlar. Sitotrofoblastlar gebeliğin sonuna kadar varlıklarını sürdürürler ve diğer trofoblast türleri için öncü hücre olma görevini üstlenirler (Can, 2014).

Gelişmekte ve yapısını giderek dallandırmakta olan koryon villusları ya gövdesinden koryon plaskasına bağlı olarak ya da serbest şekilde bulunur. Her iki

koryon villusunun da yüzeyinde bulunan sinsityotrofoblastların altında ikinci bir trofoblast türü olan sitotrofoblast tabakası gelişir. Sonuç olarak, villus yüzeyi altta sitotrofoblast ve onun üzerinde sinsityotrofoblast olmak üzere iki tabakalı hücre kılıfıyla sarılmış olur. Sinsityum (ağ, şebeke) yapan bu hücreler çok çekirdekli olup tek bir hücre gibi davranırlar. Sinsityotrofoblastların süratle çoğalıp villus üzerinde hücre kolonları oluşturmasıyla bir dizi sinsityotrofoblast türevi hücre tipi ortaya çıkar. Villusun gövdesinden ayrılıp desiduanın derinliklerine doğru ilerleyen sinsityotrofoblastlara intertisyel trofoblast denir. Annenin kan damarlarına doğru ilerleyip spiral arterlerdeki endotel hücrelerinin yerini alan trofoblastlara ise endovasküler trofoblast denir. Trofoblastlar besleyici maddeleri ve gazları taşıyan, plasenta laktojeni ve insan koryon gonadotropini gibi hormonları salgılayan ve gebeliğin devamı için yaşamsal öneme sahip bir organ haline gelirler (Şekil 17) (Can, 2014).



Şekil 17: İmplantasyondan sonra ortaya çıkan trofoblast hücre türevleri (Can, 2014).



Trofoblastlar invazif özellikleri sebebiyle tümör hücreleri ile benzerlik gösterirler. Yayılımın olması gerekenden fazla olduğu gebeliklerde komplikasyonlar ortaya çıkar ve anne ya da fetüsün ölümü ile sonuçlanabilir. İntertisyel trofoblastlar hücrelerin kendine yer açmaları ve desiduanın derinlerine doğru ilerlemeleri için hücre dışı matriks proteinlerini sindiren proteaz enzimlerini (matriks metalloproteinaz; MMP), katepsinleri ve ürokinaz plasminojen aktivatörünü salgılar. Desidua hücreleri ise denge sağlamak amacıyla bunların engelleyicisi olan proteinleri (metalloproteinazların doku inhibitörleri; TIMP) ve plazminojen aktivatörü inhibitörünü (PAI) salgılar. Ayrıca, intertisyel trofoblast hücreler yayılıcı özelliklerini yüzeylerinde bulunan laminin-5 reseptörü olan  $\alpha 5\beta 1$ -integrini ile arttırmırlar. Epitel hücrelerinde bir bağlantı proteini olan E-kaderimin ise trofoblast yayılımı sırasında azaldığı bilinmektedir.

İnsanda bulunan trofoblastların önemli özelliklerinden biri, temel doku uyumluluğu antijenlerini ve bunların reseptörlerini ifade etmiyor olmamalarıdır. Bu sayede desidua ile fetüs arasında doku reddi ortaya çıkmamaktadır. Trofoblastlarda HLA-A (insan lenfosit antijeni) ve HLA-B sınıf I genleri sessiz iken, polimorfik olmayan sınıf I moleküllerini kodlayan HLA-G sınıf Ib genleri, villus dışı trofoblastlarda, fetüsün kılcal damarlarında yer alan endotel hücrelerinde ve amniyon sıvısı sentezleyen amniyositlerde ifade edilmektedir. Bu nedenle trofoblastlar doğal öldürücü hücrelerin (natural killer) neden olduğu doku reddi yanıtını oluşturmazlar. HLA-G, T hücrelerine antijen sunarken, trofoblastları doğal öldürücü hücrelerin etkisinden korur.

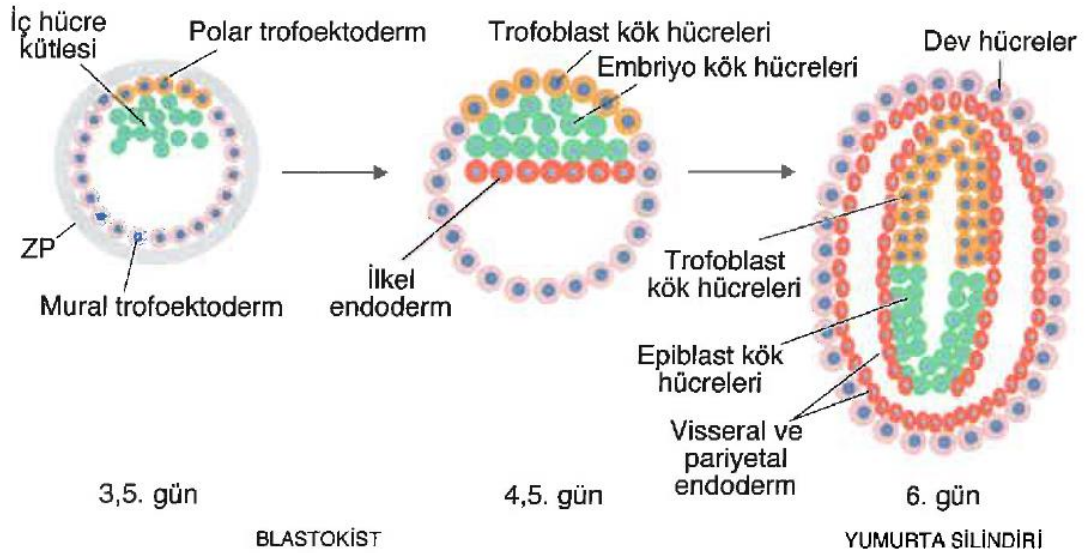
Deneysel olarak trofoblastlar ele alındığında blastkistteki trofoblastların trofoblast kök hücresi olarak kullanıldığını görürüz. Bunun yanında, ilk trimester plasentasından elde edilen çok sayıda trofoblast hücre dizisi bulunmaktadır. Bu hücrelerin kültürdeki üretimi için FGF4 ve besleyici tabaka gerekmektedir. Bu etkileşim sayesinde trofoblastlarda bulunan FGF reseptörü 2, hücrelerin çoğalmasını kontrol eder. Blastokist evresinde bulunan embriyoda, iç hücre kitlesi hücreleri FGF salgılayarak trofoblastların sayısını kontrol altında tutar. Diğer yandan bir homeobox transkripsiyon faktörü olan Cdx2 ve Eomes, FGF sinyal mekanizmasıyla etkinlik kazanarak trofoblast kök hücrelerinin sağ kalması için kaçınılmaz rol üstlenir. Kültür

ortamında FGF4 ve FGFR2'nin çekilmesi, Cdx2 ve Eomes'in ifadesini durdurur (Can, 2014, Zhang ve ark, 2015).

#### 4.5.4. Trofoblast Kök Hücreleri

Embriyonun ilk haftasındaki gelişiminde ortaya çıkan ve daha sonra hızla farklılaşan trofoblastlar (TB) her ne kadar embriyo gövdesinin dışında kalan yapılara (plasenta vb.) farklılansada, 4. Günden başlayarak embriyo gövdesini oluşturacak olan iç hücre kütesindeki (İHK) embriyoblastların ortaya çıkmaları, sayılarının belirlenmesi ve daha sonra farklılaşacakları hücelere yönelmelerinde yaşamsal rol oynar. TB'nin hızlı büyümesi, yayılıcı özelliği ve göç edebilme yeteneği ilginç bir hücre modeli olarak kabul edilmesini sağlar. Trofoblast kök hücreleri (TKH) ise laboratuvarında implantasyon öncesi ve sonrası fare blastokistinden elde edilen hücrelerdir. FGF4'ün etkisi altında kendilerini yenileyebilirler, yokluğunda ise plasentadaki gibi bazı hücre türlerine dönüşürler (Can, 2014 ve Roberts M. R, 2011) .

TB hücreleri ilk kez blastokist aşamasındaki embriyoda İHK'den farklı bir hücre grubu olarak ayrılmaya başlar (Şekil 18).



Şekil 18: Fare blastokistinde postkoital 3,5 günde hücrelerde kutuplaşma olur. Trofoektoderm hücreleriyle iç hücre kitlesi ayrılır. Blastokistin embriyo kutbundaki hücreler polar trofoektoderm olarak farklı bir yapı kazanır. Bu hücreler 6. Gündeki yumurta silindiri içindeki trofoblast kök hücrelerini oluşturur (Can, 2014).

Gebeliğin ilk haftalarında, yani embriyonun anneye ait endometriyum arterlerinden diffüzyonla beslendiği dönemde, plasenta yapısında birbirinden farklı yapı ve özellikte bir dizi hücre ortaya çıkar. Bu hücrelerin birbiriyle uyum içinde çalışması plasenta işlevlerinin yerine getirilmesini sağlar. Bu hücrelerin hemen hepsi multipotent özelliğe sahip, kendini yenileyebilen (en azından in vitro ortamda) ancak in vivo ortamda yaşam süresi oldukça kısa olan, blastokistin çevresini saran hücrelerdir. Farede ilk olarak çıkışları postkoital 84. Saate 32 hücreli embriyo dönemine karşılık gelir. 108. Saatte (4,5. Gün) abembriyonik kutuptaki hücrelerin uterus yüzeyindeki epitelle teması sonucunda implantasyon başlar ve ilk desidua yanıtları oluşur.

Bir transkripsiyon faktörü olan Cdx2 birkaç günlük embriyodaki hücrelerin birbirinden farklı yolları izleyerek farklı hücreler olarak yola devam etmelerinde anahtar rolü oynar. Cdx2'nin yokluğunda önce blastokiste benzeyen bir oluşum ortaya çıkar, ancak kısa süre içinde dejenere olur. Dolayısıyla Cdx2, her ne kadar TB'nin ortaya çıkması için önemli bir transkripsiyon faktörü olarak kabul edilse de hücrelerdeki farklılaşmayı başlatan bir etken olmayabilir. Bu etkenin morula dönemindeki hücrelerin asimetric bölünmesi olduğu varsayılmaktadır. TEAD ailesi üyelerinden Tead4'ün de TB'nin özelleşmesinde rol aldığı bilinmektedir. Bu genin kodladığı protein embriyoda kısa süreliğine sentezlenir; implantasyondan önce miktarı artar, yokluğunda TB yönünde farklılaşma gerçekleşmez. Ancak blastokist içindeki yeri ve Cdx2 ile olan etkileşimi henüz bilinmemektedir. Cdx2 morula aşamasındaki blastokistte dışarıda yerleşen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmaya başlar. Öte yandan diğer bir TF olan Oct4 ise önceleri moruladaki tüm hücrelerde bulunurken blastokist aşamasında sadece İHK'de ve hemen sonrasında da epiblast hücrelerinde izlenir. EKH kültüründe Cdx2 ile Oct4'ün birbirini karşılıklı olarak engellediği saptanmıştır. Bu ikili etkileşimin in vivo anlamı TB yönünde farklılaşacak olan hücrelerin farklılaşmasını iki koldan kontrol altında tutmak olabilir. Yüne de bugün, TB ile İHK arasındaki kutuplaşmada rol alan moleküler etkileşimlerin sırasını tam olarak bilinmemektedir. Ancak son yıllarda, Cdx2 ve Tead4'ten bağımsız olarak üçüncü bir faktör olarak Eomes'in de TB farklılaşmasının ilk adımlarında rol aldığı gösterilmiştir. T-kutusu transkripsiyon faktörü olan Eomes Cdx2 'ten kısa süre

sonra devreye girer; yokluğunda blastokist ortaya çıksa da implante olamaz. TB'nin kimliklerini korumak ve çoğalmalarını sürdürmek için başka transkripsiyon faktörlerine de gereksinimleri vardır (Tablo1). Esrrb östrojen ile ilişkili bir reseptör olup embriyoda gastrulasyona kadar embriyo dışı ektoderimde ifade edilir. Esrrb barındırmayan embriyolar yaklaşık TB yokluğundan dolayı 10,5 günde ölürlür. Dolayısıyla TB yaşamı için Esrrb'nin kaçınılmaz olduğu söylenebilir. Diğer iki TF'den birisi olan Ets2 ve Elf5 TB'nin çoğalması için gereklidir. Bunlardan başka Sox2 ve FoxD3 olarak bilinen iki TF de TB ve epiblast oluşumu için yaşamsal önemdedir. Bu iki TF'nin yokluğunda epiblast yok olur ve embriyo dışı ektoderm tamamen dev TB hücrelerine dönüşür (Tablo 1) (Can, 2014).

Tablo 1: Fare trofoblast serisi hücrelerinin farklılaşmasında rol alan genler, ifade yerleri ve mutasyon etkileri (Can, 2014).

Transkripsiyon faktörleri		
Tea4	2 hücreli aşama, implantasyondan sonra sadece TB serisi hücreler	3,5. günde ölür, blastokist oluşmaz
Cdx2	3,5. günde polar ve mural TE, proksimal EdEka	TE kararlanması olmaz
Eomes	TE, proksimal EdEk ve koryon, arka epiblast ve ilkel çizgi	Blastokist aşamasında durma, implantasyon yok
Elf5	5,5. günde ve sonrasında EdEk	5,5. günde EdEk oluşmaz
Sox2	İHK, epiblast, EdEk, koryon	6. günden önce ölür, epiblast kaybolur
FoxD3	İHK, epiblast, EdEk'in bazı hücreleri, dev hücreler	6,5. günde ölür, epiblast kaybolur
Ets2	5,0-6,75 günlerde TE, 7,75. günden sonra ilkel çizgide	8. günde ölür, EdEk oluşmaz
Esrrb	5,5. günde EdEk, 7,5 günde koryonda	10,5. günde ölür, trofoblastın yavaş çoğalması, plasenta gelişmez
Dll1	6,5. günde EdEk	10. günde ölür, anormal plasenta gelişmesi
Fgf sinyal yolağı		
Fgf4	İHK, epiblast	5,5. günde implantasyondan sonra ölür
Egfr2	Blastokist, sonra EdEk içinde sınırlanır	4,5. günde implantasyondan sonra ölür
Frs2	Polar ve mural TE, EdEk	8,5. günde ölür, ön-arka eksen hatası
Ptpn11	Her yerde	İHK'nin ölümü, dev hücrelerde sayıca azalma
Erk2	Her yerde	8. günde ölür, EdEk oluşmaz
Tgfb sinyal yolağı		
Nodal	İHK ve epiblast	7,5. günde ölür, ilkel çizgi oluşmaz, ön-arka eksen hatası
Activin A	Desidua	-
Furin ve Pace4	EdEk	Her ikisinin de mutasyonunda ilkel çizgi oluşmaz
Smad2	Her yerde	8,5. günde ölür, gastrulasyon hatası
Wnt3	5. günde arka epiblast sonra ilkel çizgi	8. günde ölür, ilkel çizgi oluşmaz
Bmp4	3,5. günde İHK ve polar TE	9,5. günden önce ölür, mezoderm hatası

#### 4.5.5.Reproduktif Tıp Uygulamalarında Kök Hücreler

Kök hücre ve reproduktif tıp uygulamaları gerek kaynak gerekse uygulama potansiyelleri olarak iç içe geçmiş durumdadır. Uygulama potansiyeli olarak değerlendirildiğinde reproduktif tıp uygulamaları üç temel noktada kök hücre

araştırmaları ile kesişmektedir. Fertilitenin korunması, fertilitenin sağlanması amacı ile doku ve organ üretimi ve kök hücrelerden fonksiyonel gamet hücresi üretimi.

Erişkin bir bireyde sperm ve oositi oluşturan kök hücreler primordial germ hücreleridir. Başlangıçta gonadal bölgede bulunmayan germ hücreleri embriyonik gelişim sırasında ilk olarak yolk kesesi endoderminde görülürler ve daha sonra ameboid hareketler ile genital çıkıntılara göç ederler. Bu migrasyon olayı insanda 5. haftada başlar ve 6. haftada tamamlanır.

Dişilerde gonad korteksine yerleşen germ hücreleri mitoz bölünme ile çoğalırlar. Sayılarının 20. hafta itibarı ile 5-7 milyona ulaştığı bilinmektedir. Bu sırada yüzey epitelinden oluştuğu bilinen (kortikal) cinsiyet kordları primordial germ hücrelerini çevreleyerek folliküllerin granüloza tabakalarını oluşturular. Oluşan primordial folliküllerin büyük bir kısmı fetal gelişim döneminde atreziye uğramaktadır ve doğumda ortalama olarak 1-2 milyon germ gücresi kalır.

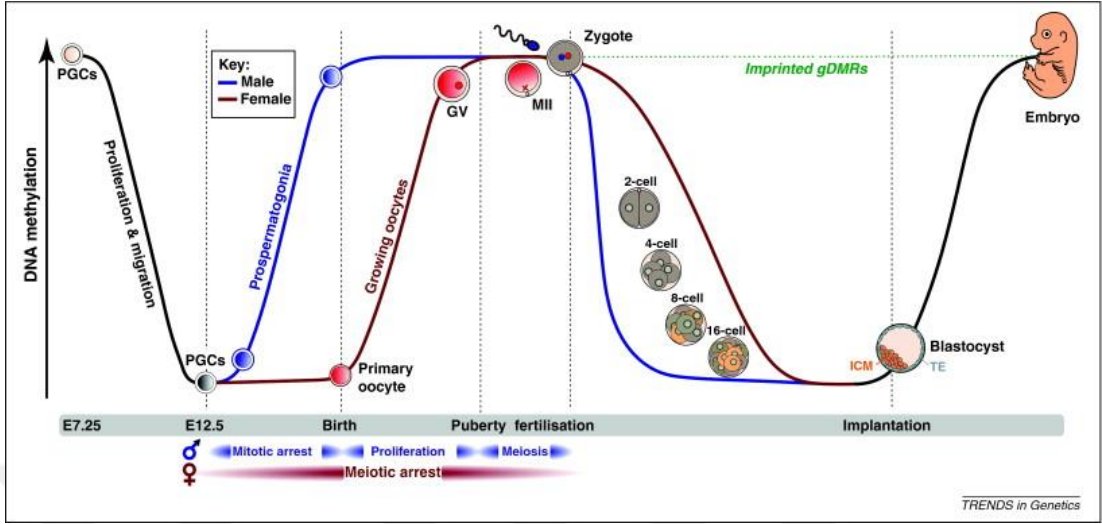
Teorik ve bugüne kadar yapılan hayvan deneylerinde elde edilen verilere göre kök hücrelerden gamet elde etme yaklaşımlarında temel olarak 3 farklı kök hücre kaynağından yola çıkılmaktadır. Bunlar EKH'ler, kemik iliği veya kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve yetişkin gonadlarında mevcut olan öncül hücrelerdir.

Özellikle cerrahi bir operasyon veya kanser tedavisi öncesinde fertilitenin korunmasına yönelik klinik ve deney hayvanları ile gerçekteştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar, tedavi öncesi germ hücre kriyoprezervasyonu tedavi sonrası hastaya geri verilmesi yaklaşımının yeni doğan ve puberte öncesi fertilitenin tekrar sağlanmasında faydalı olabileceği bildirilmiştir. Yapılan bazı çalışmalar da primordial germ hücrelerinin farklılaşabildikleri, hatta bazı deney hayvanları modellerinde gamet hücresine dönüşebildiği, ardından fertilizasyonunun ve implantasyonunun gerçekteştirilip canlı birey elde edildiği bulgularına varılmıştır (Can, 2014; Delilbaşı 2008 ve Çelik, 2013).

#### **4.6. OOSİT MATURASYONUNUN KONTROLÜ**

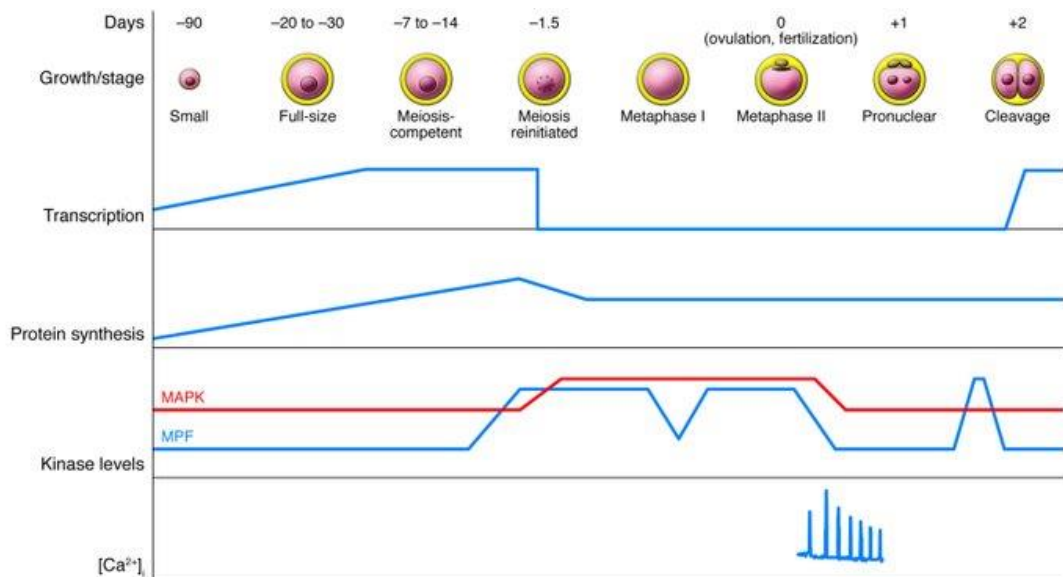
Oosit matürasyonu oogenez sırasında görülen dinamik bir süreçtir. Primordial germ hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu sürecinde DNA metilasyonu hızla azalır, gonadların gelişim sürecinde erkekte ise hızla artar. Bu aşamadan doğuma kadar olan süreçte ise DNA metilasyonunun en az olduğu görülmektedir (Şekil 19). Puberte

döneminde GV oositte DNA metilasyonun tekrar arttığı, fertilizasyona kadar stabil kaldığı bilinmektedir.



Şekil 19: Fertilizasyon sonrası DNA metilasyonu (Smallwood, 2012)

Oogenez sırasında transkripsiyonun mayoz I aşamasına kadar ki oogenezin erken dönemlerinde fazla iken, protein sentezinin mayoz I'e kadar artarak devam ettiği, metafaz I sonunda azaldığı ve diğer evrelerde stabil kaldığı gözlenmiştir (Şekil 20). Ca seviyesinin özellikle metafaz II oositte artışının matürasyon için önemli olduğuda bilinmektedir MPF ve MAPK'de oluşan fosforilasyon değişiklikleri ise mayozun safhalarındaki gelişimi etkiler (Gosden ve Lee, 2010).

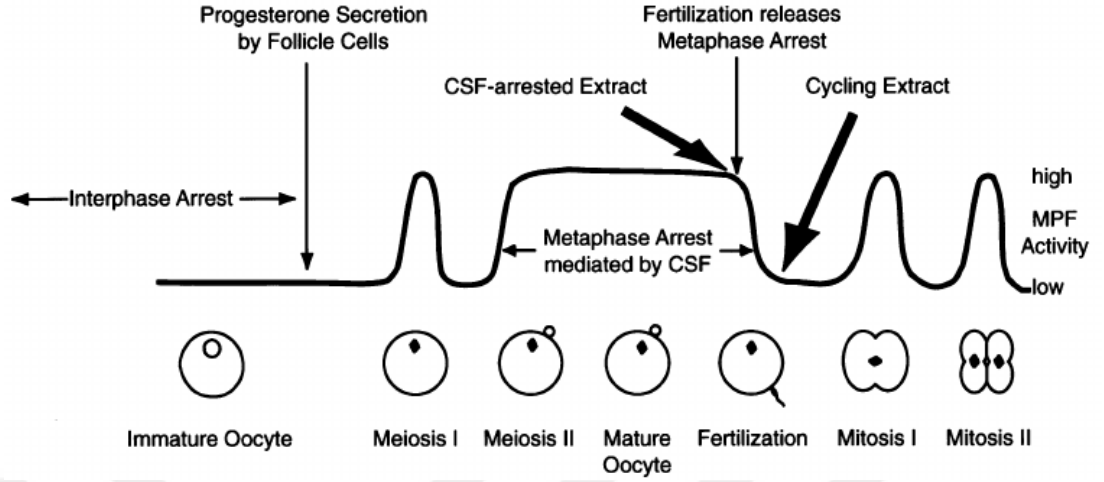


Şekil 20: İnsan oositinin moleküler ve hüresel maturasyonu (Gosden ve Lee, 2010).

Mayoz sırasında önemli olan bir diğer konu ise iğ ipliği kontrol noktasıdır (SAC-Spindle Assembly Checkpoint). SAC kardeş kromatidlerin erken ayrılmasını önleyen bir takip mekanizmasıdır. SAC bu önlemeyi, prometafaz evresinde iğ ipliklerinin mikrotübüllere bağlanmasını izleyerek yapar. SAC, APC/CCdc20'nin ayrıştırmak üzere substratları hedef alma yeteneklerini inhibe eder. Özellikle iğ ipliği üzerindeki her bir sentromer çift yönlü stabil hale gelene kadar, anafaz başlangıcını önlemek için, Siklin B ve Securin substratları bu şekilde APC/C Cdc20'ye karşı korunur. Cdc20'nin SAC tarafından inhibe edilmesi, birçok protein ve çok sayıda mekanizmayı kapsar. İğ ipliği kontrol noktaları bölgesindeki veriler, kontrol noktası inaktivasyonunda, Cdc20'nin oto-ubikuitinleşmesinin bir rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır. Dimerizasyon aracılığıyla meydana gelen bu değişimlerin yanlış bir şekilde bağlanan sentromerlerden gelen bir sinyalin yayılmasına hizmet edebileceğini düşündürmüştür (Jillian, 2008).

#### **4.6.1. Matürasyonu Düzenleyici Faktör (Maturation Promoting Factor-MPF)**

Oosit mayozunun anahtar düzenleyicisi olan olgunlaşmayı sağlayan faktör MPF, siklin B1 ve Cdc2 kinaz heterodimeridir ve hücre döngüsünde farklı dönemlerinde fonksiyonu vardır. MPF aktivitesi mayoz I'in profaz ve metafazı sırasında artar (Şekil 21). Bunun sebebi SiklinB1 mRNA'sının artmasıdır ve SiklinB1 ile kompleks yapmış Cdc2 defosforile olur. Oosit mayoz I' e geçerken MPF'nin geçici olarak aktifleşmesi SiklinB1'in proteozomal yıkımı ile gerçekleşir. Ardından birçok oosit mRNA'sının translasyonu (örneğin SiklinB1 ve Mos) ve Cdc25 fosfataz ile Cdc2 kinaz aktifleşmesi olur. Bu sebeple metafaz II'de MPF aktivitesi fazladır. Fertilizasyon sırasında oosit sperm füzyonu,  $Ca^{+2}$  seviyesini arttırarak,  $Ca^{+2}$  kalmodülin kinaz II'yi aktive ederek ve ubikitin proteozom yoluyla yıkım için SiklinB1 ve Mos'u yönlendirerek, oositin metafaz II'deki arrestini çözer. Ovulasyondan hemen önce MPF aktivitesi artar, germinal vezikül yırtılır ve oosit mayoz I'i tamamlar. MPF aktivitesi aslında mayoz ve mitoz sırasında hücre siklusunun ilerlemesini kontrol eden fosfatazlar tarafından yönlendirilir. Cdc25b sentezi yapamayan mutant erkek fareler fertil olmalarına rağmen dişileri infertildir. Bunun sebebi oositlerin kalıcı olarak mayoz I duraklamasıdır (Çelik, 2013).



Sekil 21: Oosit maturasyonu sırasında MPF aktivitesi.

[https://www.researchgate.net/figure/263760816\\_fig1\\_Fig-1-Schematic-diagram-of-oocyte-maturation-in-Xenopus-The-figure-shows-the-changes](https://www.researchgate.net/figure/263760816_fig1_Fig-1-Schematic-diagram-of-oocyte-maturation-in-Xenopus-The-figure-shows-the-changes). Erişim tarihi: 14.08.2016

#### 4.6.2. Siklin B1

Memeli oositi, mayoz I profazında arrestte kalır. Hücre bölünmesinin yeniden başlaması hormonal tetikleyici stimülasyonu ya da oositin follikülden dışarı atılmasıyla başlar. Bu tetikleyiciler MPF aktivitesini arttırmaları. MPF bir heterodimer olup; kinaz, cdk1 ve onun düzenleyici partneri siklin B1'den oluşur. MPF aktivitesinin artması germinal vezikül break down (GVBD) sağlayarak mayoz I'e girişi sağlar. Uzun süren mayoz I (MI) M-fazı sonrasında MPF aktivitesinde meydana gelen düşüş, birinci mayoz bölünme ile sonuçlanır. Ardından MPF aktivitesi oositi mayoz II metafazına kadar götürür. Bu durum mos/MAP kinaz yolağı ile gerçekleşir. Hücre bölünmesi fertilizasyona kadar bu safha da durur.

Siklin B1 varlığı cdk1 aktifleşmesi için oldukça önemlidir. Farelerde germinal vezikül safhasındaki oosit arrestinde, MPF aktivasyonu veya GVBD için protein sentezi gerekli değildir. Siklin B1, mayoz I metafazında gerekli olan bir protein olup GVBD ve MI arasında MPF aktivasyonunu artırır (Şekil 22). Dolayısıyla mayoz I metafazı siklin B1 sentezi ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanında siklin B1 mRNA enjeksiyonu poli A kuyruğunun uzunluğuna göre mayoz I metafazını hızlandırır ya da geciktirir. Bu mekanizma translayonel verimi etkilemektedir. Elde edilen veriler

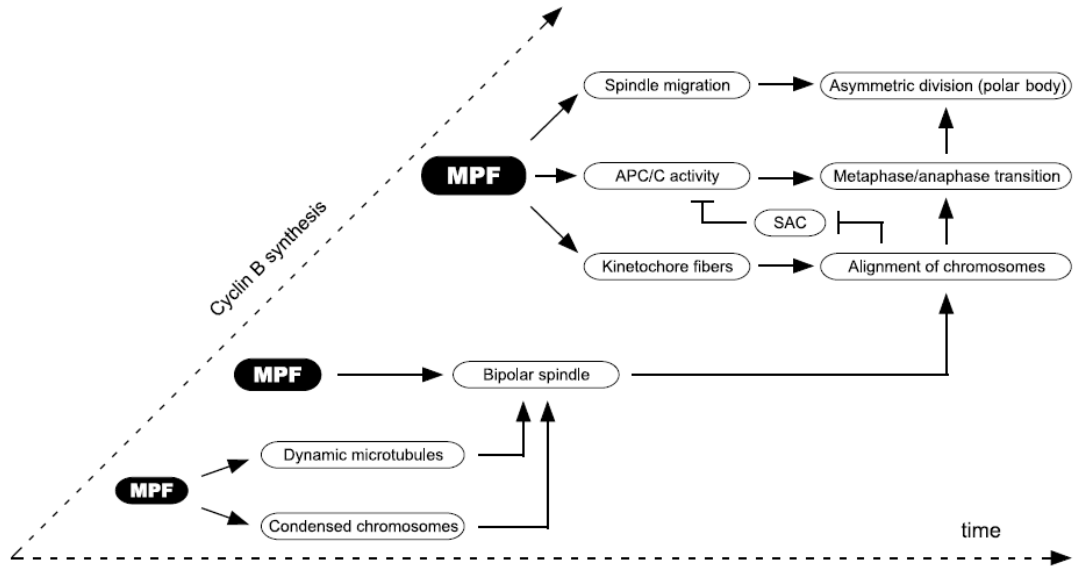


siklin B1'in mayoz I metafazı zamanlamasının belirlenmesinde önemli bir yere sahip olduğunu göstermiştir. Cdk1-siklin B1 interfaz sırasında sitoplazmada yer alırken geç profaz I'de GVBD gerçekleştiğinden sonra nukleusa girerler. (Marangos, 2004)

Cdk1-siklin B1 kinaz aktivitesi oositte mayotik maturasyonda görevlidir. MPF heterodimer bir yapıya sahip olmakla beraber katalitik CDK1 alt ünitesi ve regülatör siklin B alt ünitesinden oluşur. En az üç tip siklin B vardır. Siklin B1, B2 ve B3 Memelilerde siklin B1 başlıca MPF aktivitesinden sorumludur. CDK1'nın siklin B1'e bağlanması önemli bir gereklilik olsada, kinaz aktivitesi için yeterli değildir.

Mitoza girilmeden önce siklin B1 sitoplazmada yer alır. Hücre mitoza girdiğinde siklin B1 fosforillenir ve çekirdekte birikimi olur.

Farelerde germinal vezikül yıkımı herhangi bir protein sentezi yokluğunda devam edebilir. Germinal vezikül safhasında siklin B1 mRNA'sı transkripsiyonel olarak baskılanmıştır ve 3' transkripsiyon olmamış bölgede, siklin B1 mRNA'sı sitoplazmik poliadenilasyon elementi (CPE) içermektedir. CPE; CPEB ve RNA- bağlayıcı protein bağlar ve transkripsiyon etkiler. Oosit maturasyonu sırasında CPEB, IAK1/Eg2 kinaz tarafından fosforillenir ve bunun sonucunda siklin B1 aktiveleşir, kinaz aktivitesi metafaz I'de pik yapar ( Jones, 2004).



Şekil 22: Siklin B1, MPF ve APC ilişkisi

#### 4.6.3. Anafaz Düzenleyici Kompleks (Anaphase Promoting Complex-APC)

Mayoz II'ye giren sekonder oosit ovulasyondan 3 saat önce metafaz II evresinde duraklar. Bu duraklama oosit fertilize oluncaya kadar devam eder, fertilizasyon gerçekleşmediği takdirde ovulasyondan 24 saat sonra oosit dejenere olur ve menstrüasyon kanıyla dışarı atılır. Fertilizasyonun olması halinde ise sekonder oosit II. mayoz bölünmeyi tamamlar. Bu duraklamayı sağlayan oositin salınan sitostatik faktör (Cytostatic Factor, CSF) aktivitesidir. CSF, fertilizasyon meydana gelinceye kadar mayotik çıkışı ve siklin B yıkımını önleyerek anafaz başlatıcı kompleks/siklozomun (anaphase-promoting complex/cyclosome APC/C) ubikuitin ligaz aktivitesini antagonize eder. Devam eden siklin B sentezi APC/C-aracılı siklin B yıkımının sınırlı miktarıyla dengelenir (Şekil 22). Böylece siklin B/siklin bağımlı protein kinaz (Cdc2) aktivitesi sabit bir durumda kalır. Sitostatik faktör siklinin yıkımı aracılığıyla olan APC/C'yi inhibe ederek sekonder oositin metafaz II de beklemesini sağlar. MPF somatik hücreleri mitoz, germ hücrelerini ise mayoz bölünmeye sokar. Aktivitesi CDK1 fosforilasyonu ve siklin B'nin yıkımıyla kontrol edilmektedir. Sitostatik faktörle indüklenen metafaz evresindeki duraklama süreci, sadece fertilize sperm tarafından başlatılan  $Ca^{+2}$  artışıyla ve siklin B'nin yıkılması sonucuyla durdurulur. Son zamanlarda yumurtaya özgü bir protein olduğu tespit edilen erken mitotik inhibitör 2 'nin (Early mitotic inhibitor 2-Emi2 ya da Early mitotic inhibitor 1-related protein 1; Erp1) yıkımının  $Ca^{+2}$  a bağımlı olduğu ve muhtemelen APC/C' nin inhibisyonuyla CSF arrestini gerçekleştirme ve sürdürme fonksiyonlarını gördüğü de tahmin edilmektedir.

Son zamanlarda iğ ipliği kontrol noktası ve APC'nin kemirgen mayoz I'indeki rolünün ne olduğu merak konusudur. Xenopus oositinde APC'ye metafaz I'in anafaz I'e geçişinde ihtiyaç olmayabilir. İğ ipliği kontrol noktası aktivatörleri ve APC inhibitörleri oosit metafaz I aresti sırasında başarısız olmaktadır. Bunun sonucunda kemirgenlerde en azından mayoz I sırasında zayıf iğ bütünlüğü göstermektedir. Ancak memelilerde mayoz I'in uzun süre arrestte kalması sebebiyle mikrotübül yapısının bozulması spindle checkpointi indüklemektedir. Bu sonuç APC'nin memeli oosit mayozundaki gelişmeleri desteklemek amacıyla gerekli olduğunu göstermektedir. Buna ilaveten siklin B1 seviyesinin oosit maturasyonu sırasında artmasının 1. kutup cisimciğinin formasyonunun gecikmesine sebebiyet vermektedir. Ayrıca oositte

homolog kromozomların ayrılması için siklin B1 degradasyonunun gerçekleşmesi gerekir. APC tarafından degrede edilemeyen kesilmiş siklin B1, insan ve farede oositin mayoz I'ini önler. Bu da siklin B1'in APC tarafından degradasyonunun homolog kromozom ayrılması için gerekli olduğu sonucunu verir (Jones, 2004).

#### **4.6.4. Mitoz Arrest Yetmezlik Proteini 1 (Mitotic Arrest-Deficient- MAD1)**

Mad 1 non esansiyel bir protein olmakla beraber iğ ipliği kontrol noktasında fonksiyon görür ve bütün ökaryotlarda bulunur. Kardeş kromatidlerin doğru ayrılmasında fonksiyonları vardır ve bunu SAC aracılığı ile yapar. İğ ipliği kontrol noktası kromozomları iğ ipliği oluşana kadar izler. Kemirgen oositleri hücre döngüsünde bozulmamış iğ ile mayoz II'nin metafazında fertilizasyona girmeden arreste girer. Bu arrest, APC/C'nin inhibisyonun sağlaması ile söz konusu olur. Bu inhibisyon sitostatik faktör (CSF) aracılığı ile MAD1 tarafından gerçekleştirilir (Şekil 23) (Tunquist, 2003).

#### **4.4.5. Mitoz Arrest Yetmezlik Proteini 2 (Mitotic Arrest-Deficient- MAD2)**

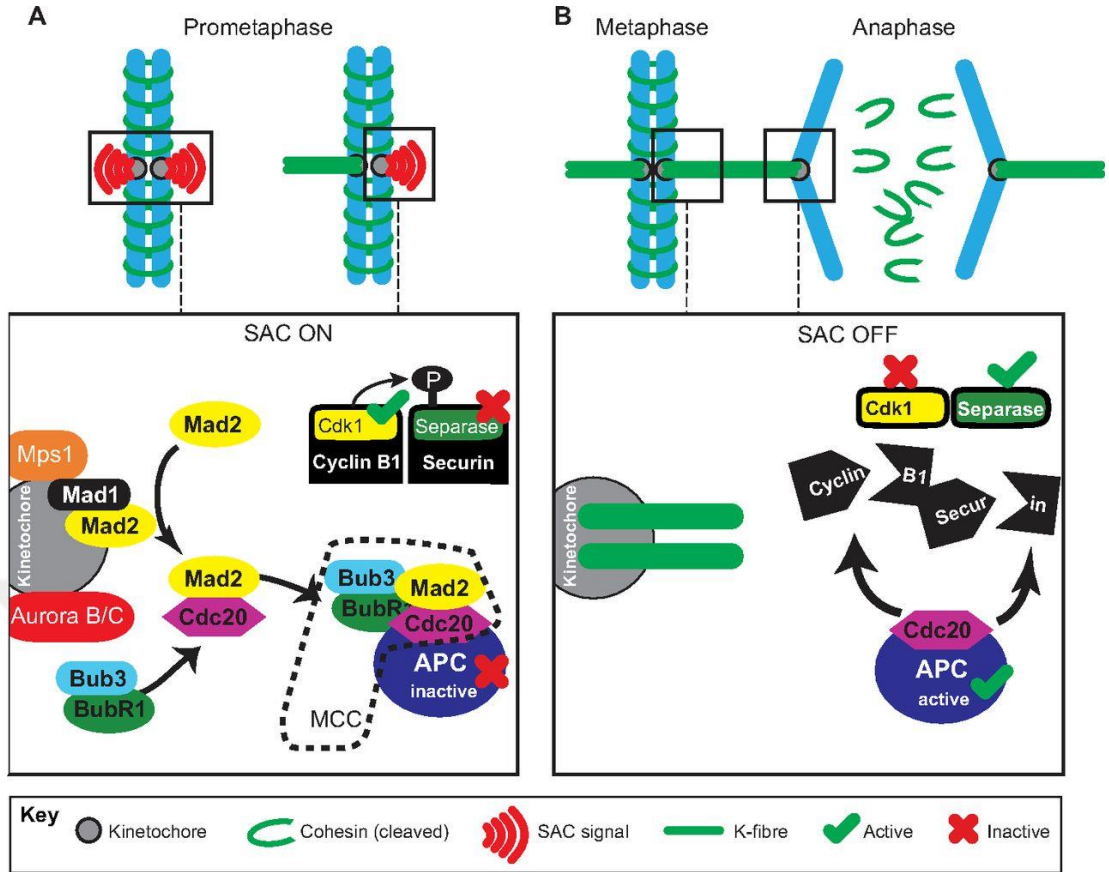
Memeli mitozu sırasında, düzenleme ağı diye bilinen iğ iplikçiği kontrol noktası (SAC) kromozom ayrılması için kaçınılmaz bir gerekliliktir. İnhibitör SAC sinyali, mitotik hücre bölünmesi sırasında yanlış sıralanmış kromozomlara cevap olarak mitozu inihibe eder, böylece kromozomların eşit şekilde dağılımı sağlanmış olur. SAC proteinleri arasında MAD2, SAC sinyalinin transdüksiyonu sırasında önemli bir rol oynar. İnsanlarda konjenital anomalilerden biri olan down sendromu, kadınlardaki yüksek yaş sebebiyle artış göstermektedir. Down sendromu, yüksek oranda, mayoz I de meydana gelen bir hata sonucu ortaya çıkar. Oositte SAC fonksiyonunu düşürmek, bu tür hatalara sebebiyet verebilir.

İğ iplikçiği kontrol noktası, kardeş kromatitlere somatik hücrelerde doğru bir şekilde ayrılmasını sağlar. Eğer kardeş kromatitlerin bu ayrılması doğru değilse, hücreyi metafaz dinlenmesine zorlar. Uzun süreli metafaz, MAD2 fazla ekspresyonuna sebep olmakla beraber nesillerde anaploidiye ve tümörogeneze sebep olmaktadır. Ek olarak bazı SAC içerikleri pro-metafazın doğru zamanlaması için gereklidir. Yapılan çalışmalar, fare oositinde MAD2 bağımsız SAC'ın I.mayoz bölünmede işlevsel olduğunu göstermişlerdir. MAD2'nin dominant negatif bir şekilde

ekspresyonu (ifadesi), SAC'la birlikte metafaz I'de devam etmektedir. RNA-interferens ile yapılan bir nokta uygulaması sonucu mayoz I anafaza geçişin hızlandığı görülmüştür.

Memeli dişi mayozunda kromozomların yanlış ayrılması, anaploidiye sahip embriyolara ve spontan düşüklere sebep olmaktadır. İnsanlarda kromozom ayrılma, kadınlarda kromozom ayrılma hataları, trizomi21 gibi trizomilerin gelişmesine sebebiyet verebilir.

SAC mitoz sırasında kromozomların doğru bir şekilde ayrılması için gereklidir. Kardeş kromatidlerin kinetokorlar aracılığı ile doğru bir şekilde bağlanmasını sağlar. Tek bir yanlış bağlanmış kinetokor varlığında SAC aktive olur ve bu durum metafaz arestine yol açar. Böylece bağlanmanın tamiri mümkün olabilecektir. MAD2, APC aktivitesini ubiquitinasyon aktivitesini inhibe etmede doğrudan bir rolü vardır. MAD2 bu inhibe işlemini cdc20 üzerinden yapar. SAC bir kere inaktive edildiğinde APC/C-cdc20 sekurin ve siklin B1 i ubiquitine eder (Şekil 23). Her iki proteini de 26 proteozomlar tarafından degradasyon için yönlendirir. Bunun yanında MAD2 enjeksiyonu ya da dominant negatif MAD2 ekspresyonu, mayoz I'i hızlandırmaktadır. Mitozda ise MAD2 allelindeki kayıp sonucu, MAD2 protein seviyesinde %30 kayıpla beraber, bu durum hct116 hücre hattında kromozomal kararsızlığa sebep olmaktadır. MAD2 pozitif/negatif fareler yaşamaktalar, ancak akciğer kanseri geliştirmekteler. Ancak MAD2<sup>-/-</sup>, yüksek kromozom kaybıyla beraber embriyonik ölüme sebep olur. Fare oositinde mayoz I safhasında doğru kromozom ayrılması için MAD2 gereklidir. Ayrıca MAD2'nin fazla ekspresyonu mayoz I safhasında kromozom ayrılmasını engellemektedir (Niault ve ark, 2007; Homer, 2006).



Şekil 23: Mayoz bölünme esnasında MAD1, MAD2 ve APC ilişkisi (Jones ve ark, 2013).

#### 4.6.6. RAS

RAS bir proto-onkogen ailesinden olup kodlayan genin adıdır. RAS onkogenleri birbirleriyle ilişkili beş onkogenden oluşan bir gruptur. Bu aileye mensup proteinler proto-onkogendir. Aktive olduklarında onkogen durumuna geçerek kanser patogenezinde önemli rol oynarlar. RAS, hücrelerin; sinyal transdüksiyonu, proliferasyonu, farklılaşması, adezyonu, apoptozu ve göçü gibi süreçlerinde rol alır. RAS ve RAS-ilişkili proteinler arttığında; invazyon ve metastazı artırmak ve apoptozu azaltmak yoluyla sıklıkla kanserlerin oluşumuna neden olmaktadır. RAS ailesinde meydana gelen mutasyonlar çok sık görülmekte ve tüm insan kanserlerinin %20 ile %30'una neden olmaktadır. Uygun olmayan aktivasyonunun; hücrelerin sinyal iletimi, proliferasyon ve malign dönüşümde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Çeşitli genlerdeki mutasyonlar ve bizzat RAS geninin kendisinin mutasyonları buna neden olabilir.

Ortaya konulan çalışmalar RAS proteinin, protein sentez inhibitörü varlığında oosit maturasyonunda rol aldığını göstermiştir. Memelilerde RAS gen ailesi p21 proteinleri ile yakından ilişkili proteinler üretir ve GTP ile GDP bağlayarak ve GTPaz aktivitesinde rol alır. Yapılan araştırmalar sonucunda *Xenopus laevis* oositine yapılan mikroenjeksiyon oosit maturasyonunu indüklediği yönünde veriler elde edilmiştir (Kretser, 2012).

#### **4.7. İN VİTRO MATÜRASYON (IVM)**

İlk IVF bebeği, 1978'de doğal siklus sonrası elde edilse de; günümüzde IVF uygulamalarında çok sayıda follikül geliştirilmesi amacıyla gonadotropinler kullanılmaktadır. Bunun sebebi gebelik oranları ile transfer edilen kaliteli embriyo sayısının doğru orantılı olmasıdır. In vitro fertilizasyon tedavisi sırasında matür follikül sayısını arttırmak için gonadotropin salgılatıcı hormon analogları (Gonadotropin realising hormone-analogs, GnRH-a), insan menopozal gonadotropini (Human menopausal gonadotropin, HMG) veya saflaştırılmış FSH ile ovaryan stimülasyonu hedeflenmektedir. Ancak bazı hastaların gonadotropine karşı fazla duyarlı olmaları ovaryumların fazlaca uyarılmasına sebep olarak ovaryan hiperstimülasyonu sendromuna (Ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS) yol açmaktadır. OHSS'nin ciddi boyutlara ulaşmasıyla tromboemboli, renal yetmezlik, erişkin solunum yetmezliği ve nadiren de olsa ölüm gibi komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır. Yan etkilerin ortaya çıkmasının uzun sürmesi ve bu duruma bağlı belirsizliklerin olması, uzun süren tedavi süreci ve maliyeti in vitro matürasyon yönteminin düşünülmesi gereken bir tedavi seçeneği olduğunu göstermiştir (Delilbaşı, 2008).

Ovaryumlardan immatür oositlerin toplanması ve bunlardan in vitro maturasyon sonrası elde edilen ebriyoların transfer edilmesi infertilitenin tedavisinde yeni bir yaklaşımdır. Polikistik overli (Polycystic ovary PCO) ve polikistik over sendromlu (Polycystic ovary syndrome, PCOS) hastalarda, infertilite tedavisinde in vitro olarak matüre edilen oositlerin fertilizasyon, embriyo gelişimi ve gebelik oranlarının kabul edilebilir düzeylerde olduğu bildirilmiştir(Delilbaşı, 2008 ve Çelik,2013).

IVM tedavisi ile immatür oositlerin matüre edilmesiyle ilk gebelik 1983'te gerçekleştirilirken, 1991'de ise overler stimüle edilmeden toplanan oositlerden ilk gebelik elde edilmiştir. PCO'lu hastlardan ise ilk kez 1994'te IVM ile gebelik sağlanmıştır (Delilbaşı, 2008).

Memelilerde antral follikülden alınan primer oositlerin mayoz bölünmeyi spontan olarak tamamladıklarının gösterilmesi, insanlarda infertilite tedavisinde oositlerin in vitro maturasyonundan sonra gelişen embriyoların transferiyle gebelik elde edilebileceğini gündeme getirmiştir.

Folliküllerden elde edilen oositlerin mayoz bölünmeyi tamamlayabilmesinde etkili olabilecek bir parametre olarak follikül çapı ele alınmıştır ve fare, koyun, maymun ve insanlarda yapılan çalışmalarla follikül çapının artışıyla beraber mayoz bölünmeyi tamamlama kapasitesinin de arttığı gösterilmiştir. Follikül çapı oositin mayoz bölünme kapasitesini arttırdığı gibi erken bölünme evresinden blastokiste ulaşana kadar olan gelişmeleri de etkilemektedir. Örneğin fare ve koyunlarda küçük folliküllerden elde edilen oositlerin in vitro maturasyonundan sonra 2-8 hücreli evreden ileriye gidemedikleri, büyüklerden toplananların ise blastokiste ulaşma oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. İnsan da daha sonra yapılan çalışmalar in vitro maturasyon ile embriyo elde edilebilmesi için en uygun oosit toplama gününün 12. gün ve follikül çapının 10 mm olduğunu göstermiştir. Bu durum insan oositlerinin geç folliküler evredeyken aspire edilip in vitro olarak matüre edilmesinin sonrasında da in vitro fertilizasyon ile gelişimini tamamlayarak blastokist evresine kadar ulaşabileceğini göstermiştir (Delilbaşı, 2008).

İn vitro maturasyonda önemli olabileceğinin düşünüldüğü bir diğer parametre de oositin follikülden toplanırkenki hücre siklusudur. Oositler üzerinde folliküller veya luteal fazın olası etkileri tam olarak aydınlatılmamakla birlikte folliküler atrezinin etkili olabileceği düşünülmüştür. Maturasyon sırasında fare ve koyun oositlerinin granüloza hücreleri ile metabolik birliktelik oluşturduğu ve mayoz I'den hemen önce bu birlikteliğin bozulması ile maturasyon için gerekli faktörlerin oosite aktarılamadığı ve oositin maturasyonunun gerçekleşmediği düşünülmektedir. Granüloza hücreleri ile oosit beraberliği mayoz bölünmenin tamamlanması için gerekli olan protein ve

fosforilasyondaki değişiklikleri sağlamaktadır. Spesifik proteinlerin fosforilasyonundaki değişiklikler granüloza hücreleri tarafından indüklenir ve bu, MPF olarak adlandırılan ve hücre siklusunu düzenleyen bir faktördür.

İn vitro oosit maturasyonunda rol alan mekanizmaların aydınlatılması in vitro maturasyonda kullanılacak olan vasatların içeriklerinin belirlenip geliştirilmesine rol açmıştır (Delilbaşı, 2008).

#### **4.7.1. İn Vitro Maturasyonda Kullanılan Vasatlar**

IVM uygulamasının küçük antral folliküllerden yapıldığı göz önüne alındığında oosit maturasyonunda kullanılan ortamın daha sonraki embriyo gelişimi açısından büyük önemi vardır. Yapılan bir çalışmada oosit maturasyonu için kültür ortamına granüloza hücreleri transfer edilmiştir. Ancak bunun denüde oositlere karşı bir etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu durum granüloza hücreleri ile oosit ancak direk bir iletişime sahip olduğunda maturasyonda etkili bir role sahip olabileceğini düşündürmüştür. Rhesus maymunları ile yapılan bir çalışmada gonadotropin içeren vasatlara granüloza hücresi eklendiğinde maturasyon ve gelişimi indüklediği görülmüştür. Ancak bu durum insanda aynı etkiyi göstermemiştir. Bir diğer çalışmada ise IVM uygulanan hastada oositler granüloza hücre tabakası üzerinde kültüre edilmişlerdir ancak bunun mayotik performans ya da fertilizasyonu arttırmadığı izlenmiştir (Delilbaşı, 2008).

Oosit in vitro maturasyonunda etkili olduğu düşünülen bir başka komponent de fetal dana serumudur (Fetal calf serum, FCS). Normal koşullarda fertilizasyon esnasında kortikal reaksiyon gerçekleşmekte ve bu da zona pellusidanın sertleşmesine neden olmaktadır. FCS feutin olarak adlandırılan proteini içerir. Bu protein zona pellusidanın sertleşmesini inhibe ederek işlev görmektedir. Bu durum FCS'nin oosit maturasyonu ve fertilizasyonunda önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Ancak ICSI'nin ortaya çıkması ile FCS'nin rolü sorgulanır olmuştur.

IVM amaçlı seçilen vasat, maturasyon sırasında oositin hem sitoplazmik hem de nükleer maturasyonunda etkili olmalıdır. Bunun yanında matür oositin gen ekspresyonunu ve regülasyonunu da düzenleyecek optimal kültür koşullarını da sağlamalıdır.



Kültür ortamlarının tümünün pH değeri oositin ve daha sonra gelişen embriyoner hücrelerin internal pH'sını etkileyeceği için önemlidir. Ancak in vitro matürasyon sürecinde mayoz bölünmenin tamamlanması için internal PH'nın artışı söz konusudur. Oosit toplama sürecindeki pH değişimleri oositlerin daha sonraki gelişimleri üzerinde etkili olmaktadır.

IVM ile ilgili yapılan çalışmalar sonunda oositlerde spontan matürasyonu sağlayacak çeşitli vasatlar üretilmiştir. Serum, gonadotropin (FSH ve LH) ve östradiol bulunduram doku kültür ortamı olarak TCN-199, Ham's F10, HEPES veya bikarbonat tamponlu Chang's vasatı.

Glukoz, pirüvat ve laktat somatik hücreler ve oositler için esas enerji kaynağı olmakla beraber kültür ortamına değişik miktarlarda eklenilerek kullanılırlar. Oosit ihtiyaçlarından biri olan pirüvat kumulus hücreleri tarafından glukozun ve laktatın pirüvata çevrilmesiyle büyük ölçüde elde edilmektedir. Bu durum maturasyon sırasında oosit çevresindeki yapıların önemini göstermektedir. Denüde edilmiş oositlerin kültür vasatına pirüvat eklendiğinde durumlarını korudukları ancak kümülüs hücreleri ile kültüre edildiklerinde mayozda bir duraklama olmadığı izlenmiştir.

Kültür vasatında bulunması gerektiği düşünülen bir başka molekül ise aminoasitlerdir. Aminoasitler proteinlerin yapı taşı olmakla beraber tampon görevi görürler ve enerji kaynağıdır. Embriyo gelişimi sırasında ortamların serum içerip içermedikleri göz önünde bulundurularak gelişim evresine göre farklı oranlarda aminoasit eklenmektedir.

Yapılan hayvan çalışmalarında vitaminlerin maturasyon üzerindeki etkisi konusunda yetersiz bilgi bulunmakla beraber maturasyon sırasında nükleer ve sitoplazmik maturasyonu uyardığı yönünde bilgiler vardır (Delilbaşı, 2008).

Bu çalışmada plasentadan elde edilecek trofoblastik kök hücrelerin kültürü sonrasında elde edilecek ürünlerin oosit kültüründe kullanılması ve oosit matürasyonuna olası etkilerinin araştırılması **amaçlanmıştır**. Bu amaç doğrultusunda proje sonunda, trofoblastik hücre ürünlerinin elde edilip edilemeyeceği, oosit

kültüründe kullanılıp kullanılmayacağı, eğer kullanılabilir ise yeni kültürü sistemlerinin geliştirilip geliştirilemeyeceğinin ortaya konması **hedeflenmektedir.**

Oosit matürasyonu için trofoblastik kök hücre ürünleri ile kültürü proje ile ilk defa yapılacak olup, projenin **özgün kısmını oluşturmaktadır.**



## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

Proje Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 12/11/2014 tarih ve 77.637.435-4 sayılı onayı ile Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi 2014/170 nolu proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.

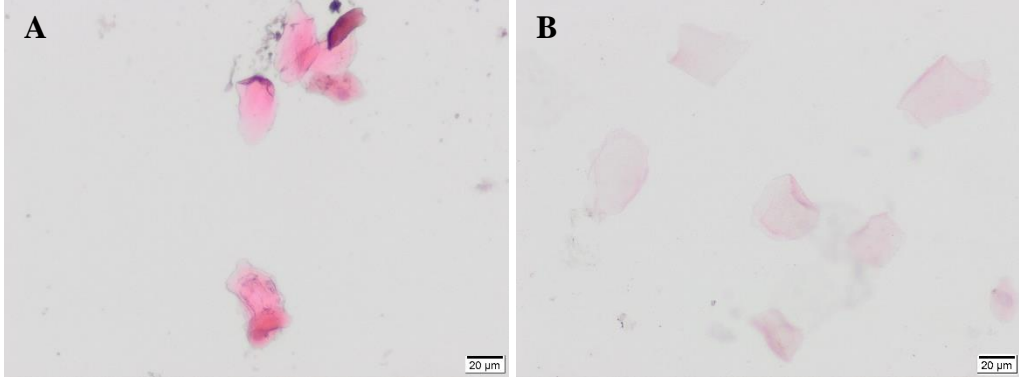
### 5.1 DENEY HAYVANI

Çalışmada 20 adet 10-20 haftalık Bulb/C fare kullanıldı. Farelerin bakım ve izlenimi Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Fareler uygun kafeslerde oda sıcaklığı  $24\pm 1$  °C' de, 12 saat aydınlık/karanlık siklusu içinde ve günde bir kez temizlenen kafeslerde standart laboratuvar diyetiyle beslendi, su alımları serbest bırakıldı. Çalışmada herhangi bir karantina koşulu uygulanmadı.

Deneklerden 5 tanesi trofoblast kök hücre eldesi, geri kalan fareler ise oosit eldesi için kullanıldı.

### 5.2. TROFOBLAST KÖK HÜCRE ELDESİ

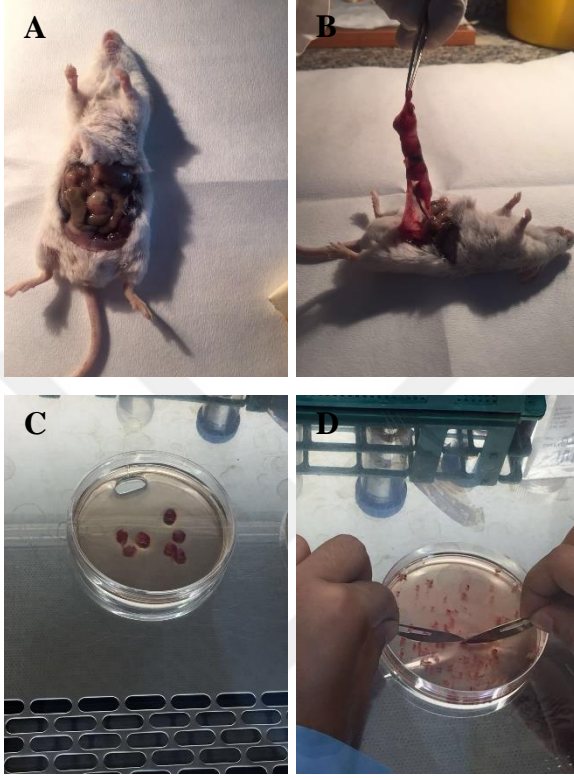
Trofoblast kök hücre eldesi için deneklerden alınan vajinal sürüntü örneği lam üzerine yayıldı ve % 60'luk alkolde 1 dk bekletildi. Daha sonra 3 dk akar su altında yıkanan örnekler hemotoksilende (Haematoxylin harris, RRSP67/E) 1 dk bekletildi ve 3 dk akar suda yıkandı. Daha sonra 1 dk eosin (Surgipath, Unno1989, 01601E) ile boyanan örnekler 3 dk akar suda yıkandı. Boyama sonrasında çekirdek boyaması gözlemlenmeyen örnekler östrus döneminde kabul edildi ve iki dişi bir erkek olacak şekilde fareler çiftleşmeye bırakıldı (Resim 1-A,B). Ertesi gün sabah vajinal tıkaç varlığı tespit edilen dişi fareler, fertilizasyon pozitif olarak kabul edildi ve ayrı bir kafese alındı. Fertilizasyondan sonraki 14. günde denekler plasenta eldesi için servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifikasyondan sonra deneklerin batin bölgesi steril pens ve makas yardımıyla açıldı (Resim 2-A,B). Her bir denekten 6-8 adet embriyo plasentaları ile birlikte çıkarıldı ve 3 embriyo plasentaları ile birlikte, 3 plasentada embriyolarından ayrı olarak %10 formalin solüsyonuna alınarak embriyonik gün tayininin teyidi, histokimyasal ve immunohistokimyasal analizler için parafin takip için tespit edildi.



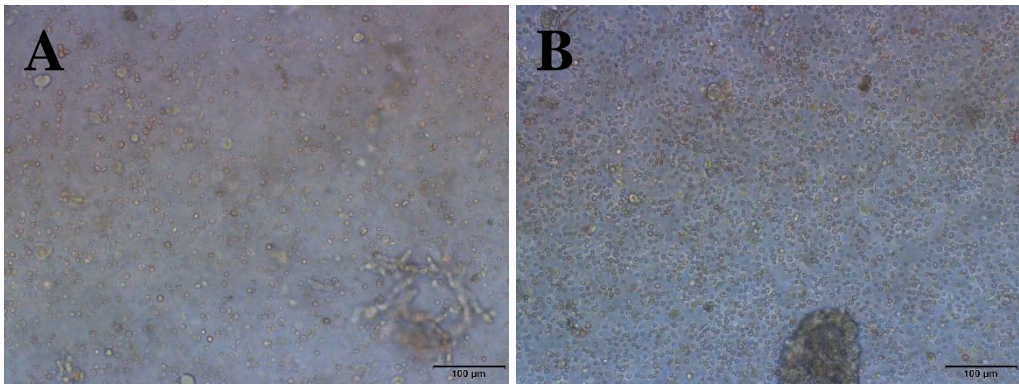
Resim 1: Fare den smear örneği. Hematoksilen-Eozin boyaması. Ölçek: 20µm.

Trofoblastik kök hücre eldesi için ise geride kalan tüm plasentalar embriyolardan ayrılarak 25 cm<sup>2</sup> petri içine % 1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B) içeren steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) (Lonza Biowhittaker, BE17-516F) içerisine alındı (Resim 2-C). Plasentalar hava akış kabini (ESCO Class II BSC) içerisine alınarak maternal kısımları steril bistüri yardımı ile ayrıldı ve kalan kısımlar yeni %1 penisilin-streptomisin içeren steril PBS içerisine transfer edildi. Yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra plasentalar bistüri yardımı ile mekanik disseksiyon yapılarak küçük parçalara ayrıldı ve % 0,1 gr/ml kollajenaz tip I (Sigma, C0130), % 0,01 gr/ml hiyaluridaz (Sigma, H3506-100MG), % 1 sığır serum albümin (BSA) (Sigma, A7906) % 1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B), % 1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B), % 1 gentamisin (Biochrom, A 2712) % 0,2 amfoterisin B (Capricorn Scientific, AMP-B) ve % 10 fütal sığır serumu (Capricorn Scientific, FBS-12B) içeren DMEM-HAMS F12 (Capricorn Scientific, DMEM-12-A) kültür vasatı içine alındı ve 1 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı (ESCO, CCL-170B-8) (Resim 2-D). İnkübasyonun ardından örnekler 50 ml'lik falkon tüplerine alınarak 5 dk 1000 rpm'de santrifüj yapıldı. Üstte kalan sıvı kısım ve büyük parçalar atılarak pellet her plasentaya 0,5 ml kültür vasatı olacak şekilde % 1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin, %1 gentamisin, % 0,2 amfoterisin B ve %15 fütal sığır serumu içeren DMEM HAMS- F12 kültür vasatı ile homojenize edildi. Bu işlem den sonra yaklaşık 1 dk beklenerek çözünmemiş parçaların dibe çökmesi sağlandı. Üstte kalan hücreli kısım 24 gözlü kültür kaplarına 2x10<sup>4</sup> hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı ve kültüre edildi (Resim 3). Trofoblast kök hücresi elde edildikten sonra hücrelerin yeterli konfluensiye ulaşması için 2 günde bir kültür vasatı değiştirilerek

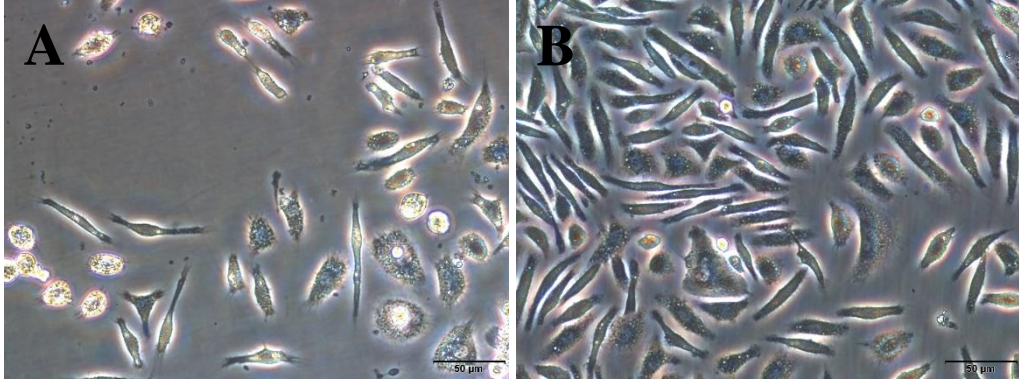
37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 2 hafta kültüre edildi (Resim 4). Yeterli konfluensiye ulaşıldığında hücrelerin bir kısmı trofoblast kök hücre karakterizasyonu için % 4 paraformaldehit (Merck, TP704404) ile 30 dk oda sıcaklığında tespit edildi. Geriye kalan hücreler çalışmada kullanıldı.



Resim 2: Trofoblast Eldesi. A-B: 14 günlük embriyo ve plasenta eldesi, C: Plasentanın PBS içerisinde yıkanması, D: Plasentanın mekanik diseksiyonu.



Resim 3: Enzimatik reaksiyon sonrası plasentadan elde edilen trofoblast hücreleri. Ölçek: 100 µm .

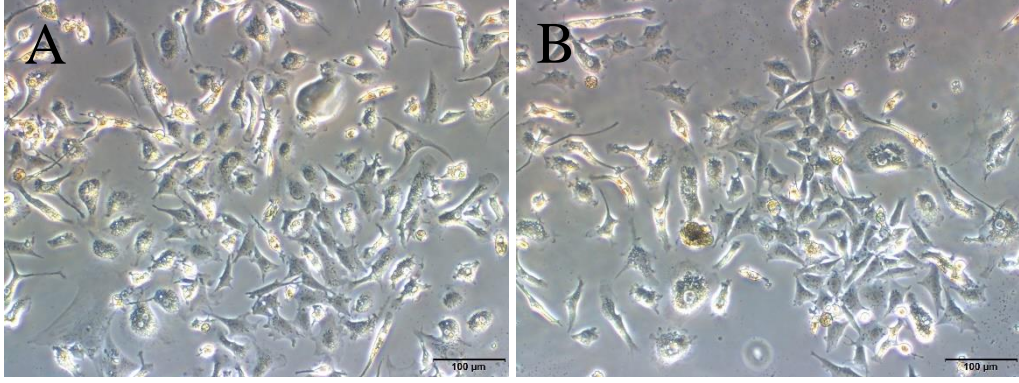


Resim 4: Trofoblast kök hücre kültürünün 5. (A) ve 11. (B) gün. Ölçek: 50 µm.

### 5.3. TROFOBLAST KÖK HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU

Trofoblast kök hücrelerinin karakterizasyon için fiksasyon işleminden sonra 3x10 dk PBS ile yıkandı. Ardından hücreler % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, K31355100 303) ile 15 dk inkübe edildi. Tekrar 3x5 dk PBS ile yıkanan hücreler 10 dk % 0.1 Triton-X100 (Appllichem, Mt 646, 85g/mol) ile permeabilizasyonu buz üstünde sağlandı ve 3x5 dk PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra bloklama (Invitrogen, 859043) solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, 1/50 oranında PBS ile hazırlanan, trofoblast kök hücre belirteci anti-sitokeratin-7 (Santa Cruz Biotechnology, sc23876) ile hücreler 1 gece +4°C de inkübe edildi. Hücreler PBS ile 3x5 dk yıkandıktan sonra biotin-streptavidin peroksidaz sekonder antikorları (Invitrogen, 859043) ile her bir basamak 30 dk olacak şekilde boyandı. İnkübasyonun ardından diaminobenzidine kromojeni (DAB) (ScyTek, ACC125) ile 15 dk boyama yapıldı. Önce PBS ardından distile su ile yıkama işleminden sonra örnekler 3 dk Mayer's hematoksilen (05-06002/L) ile boyama yapıldıktan sonra immunohistokimya kapatma medium (Spring bioscience, DMM-125) ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelendi.

Hücrelerin karakterizasyonuna eş zamanlı olarak trofoblast kök hücreleri, oositle ko-kültür işlemi için 20µg/ml mitomisin-C (Sigma, M0440-5MG) ile 1,5 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edilerek inaktive edildi. Süre sonunda mitomisin-C içeren vasat alındı ve yerine trofoblast kök hücre vasatı ile 2 defa yıkama yapılarak taze vasat konuldu (Resim 5).



Resim 5: Oosit ko-kültür işlemi için mitomisin C işlemi ile inaktive edilmiş trofoblast kök hücreleri. Ölçek 100 µm.

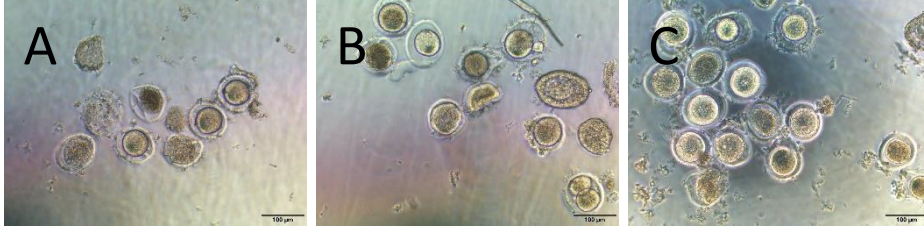
#### 5.4. OOSİT ELDESİ VE KÜLTÜRÜ

Oosit eldesi için östrus dönemindeki 15 dişi 5IU gonadotropin mares serum (Sigma, G4877, USA) % 0.9 sodyum klor ile dilüe edildikten sonra intramuskular uygulandı ve enjeksiyondan sonraki 24., 36. ve 48. saatlerde denekler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve ovaryum dokuları çıkarıldı (Resim 6).



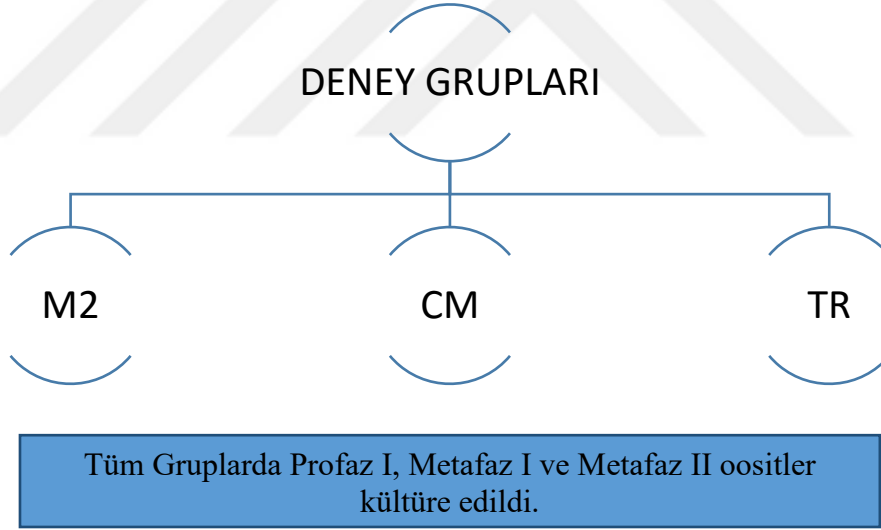
Resim 6: Sakrifiye işleminden sonra sırasıyla 24 (A), 36 (B) ve 48 (C) saat gonadotropin uygulanmış fare ovaryumları. X40

Tüm ovaryumlar % 1 penisilin-streptomisin bulunan steril PBS içerisine alındı. Yıkama işleminden sonra ovaryumlar M2 (Sigma, M7167, USA) vasat içerisine transfer edildi ve 37°C de ısıtmalı tabla üzerinde disseksiyon mikroskobu (Olympus mikroskop, SZX7) altında insulin enjektörü yardımıyla mekanik diseksiyon yapılarak oositlerin follüküllerden dışarı çıkartılması sağlandı. 24 saat gonadotropin uygulanmış fareye ait oositler profaz I evresinde, 36 saat gonadotropin uygulanmış fareye ait oositler metafaz I evresinde ve 48 saat gonadotropin uygulanmış fareye ait oositler ise metafaz II oosit olarak kabul edilerek çalışma grupları oluşturuldu (Resim 7).



Resim 7: 24 (A), 36 (B) ve 48 (C) saat gonadotropin uygulanmış farelerden elde edilen oositler. Ölçek 100 µm

Oositler 24, 36. ve 48. saatlerde toplandıktan sonra her bir gruptan elde edilen oositler 3 gruba ayrıldı. İlk grup oositler M2 kültür vasatı içine alındı. İkinci grup oositler mitomisin C ile muamemele edilmiş trofoblastlardan toplanan kültür vasatına (CM) transfer edildi. Son grup oositler mitomisin C ile muamele edilmiş trofoblast kök hücrelerinin bulunduğu 24 gözlü kültür kaplarına transfer edildi (TR) (Şekil 24) .



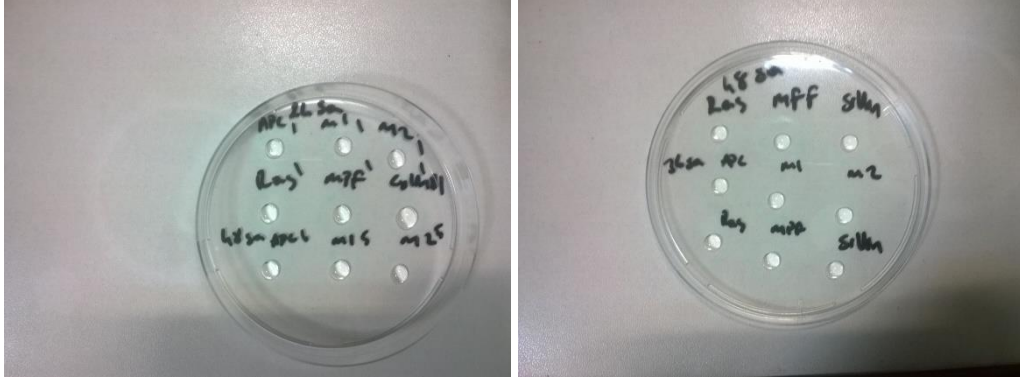
Şekil 24: Çalışmada yer alan deney grupları. Sırasıyla 24, 36 ve 48 saat Hcg uygulamış farelerden elde edilen Profaz I, Metafaz I ve Metafaz II oositler M2 kültür vasatı, Trofoblast kök hücre kültür vasatı (CM) ve Trofoblast kök hücreleriyle ko-kültür yapılmıştır.



Direkt trofoblastlar ile kültüre edilen oositler trofoblast kültür vasatı içerisinde kültüre edildi. İkinci ve son gruptaki oositler kültür vasatı veya M2 mediumu ile 30 µl damlalar oluşturulup, üzeri mineral yağ ile kapatıldıktan sonra transfer edildi. Tüm grupta bulunan oositlerin 48 saat 37<sup>0</sup>C, % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültür işlemi gerçekleştirildi.

### **5.5. OOSİTLERİN İMMUNOFLORESAN BOYAMASI**

Oositler, 48 saat kültürün ardından % 4 paraformaldehit ile 30 dk tespit edildi ve 3x10 dk %1 gr/ml BSA (Sigma, A7906,USA) içeren PBS ile yıkandı. Zona pellusidanın oositten ayrılması için distile su içerisinde 140 mM NaCl (Merck, 106404), 3mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Sigma aldrich, C3881), 5mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Fluka, 63063), %0,1 (w/v) glukoz (Sigma aldrich, G8270), ve % 0,4 (w/v) polyvinylpyrrolidone (Sigma, PVP-360) bulunan asit tyroid solusyonunda 10 dk tutuldu. Zona pellusida ayrılması inverted (Olympus, TH4-200) mikroskop altında kontrol edildikten sonra oositler % 0.1 Triton X-100 içeren PBS ile 15 dk inkübe edildi. Ardından % 10 oranında % 1gr/ml BSA içeren PBS ile hazırlanmış normal kuzu serumu (Santa cruz, sc-2488) ile oositler 1 gece +4 °C'de bekletildi. Ertesi sabah oositler 1/50 oranında hazırlanmış anti-APC (biorbyt, orb5703), anti-MAD1 (biorbyt, orb49050), anti-MAD2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-28261), anti-H-RASS (Santa Cruz Biotechnology, sc29), anti-MPF (USbiological life sciences, 141430) ve anti-siklinB1 (Santa Cruz Biotechnology, sc245) antikorları ile 30-36 saat +4 °C'de bekletildi (Resim 8). Sonraki gün % 1 gr/ml BSA içeren PBS ile 3x10 dk yıkama yapıldıktan sonra 1/500 oranında % 1 gr/ml BSA içeren PBS ile primer antikorlara uygun şekilde anti-mouse FITC (Millipore, AP308F) veya goat anti-rabbit Rhodamine (Santa Cruz Biotechnology, sc-2091) sekonder antikorunu karanlık ortamda bir gece +4°C'de bekletildi. Anti-APC, anti-Mad1 ve anti-MAD2 için rhodamine, anti-H-RAS, anti-MPF ve anti-Siklin B1 için ise FITC kullanıldı. Ertesi gün oositler % 1 gr/ml BSA içeren PBS ile 3x10 dk yıkama yapıldıktan sonra 1/10 oranında DAPI (Cell signaling technology, 4083S) içeren kapatma vasatı (Calbiochem, JA1750) içerisinde alındı ve fleurosana ataçmanlı inverted mikroskop altında incelendi.



Resim 8: Antikorlar ile + 4°C’de 30-36 saat inkübe edilmiş oositler.

## 5.6. EMBRİYO VE PLASENTA IŞIK MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ

Formalin (Sigma Aldrich, UN 1198) solusyonunda 24 saat fiksasyon işlemi yapılan örnekler 1 gece % 30 sükröz (AnalaR, pmod 10274) içeren PBS solusyonunda bekletildi. Ertesi gün 3x30 dk PBS ile yıkandı ve rutin parafin takip işlemi için % 60, % 70, % 80 ve % 100 alkol (Alkomed Kimya Kozmetik ve Dış Tic. San. Ltd. Şti, CAS 64-17-5) serilerinde birer saat bekletildi. Örnekler ksilen (TEKKİM, TK.090270.05000-2) -alkolde 15 dakika bekletildikten sonra, şeffaflaştırma işlemi için embriyolar 2 değişim ksilende 5'er dk, plasentalar ise 10'ar dakika bekletildi. Bu işlemin ardından ksilen-parafinde (TEKKİM, TK.200661.05004) 15 dk tutulan örnekler 2 değişim parafinde birer saat bekletildi ve daha sonra blok kabına aktarıldı.

## 5.7. DOKU HİSTOKİMYASAL BOYAMASI

Embriyo ve plasenta örneklerinden alınan 5 mikron kesitler 60°C’de bir gece bekletildi. Ertesi gün ksilende 1 saat bekletildikten sonra 5 dk akarsuda yıkama işlemi yapıp % 96, % 80, % 70 ve % 60 alkol serilerinde 2’şer dakika bekletildi. Tekrar 5 dk akarsuda yıkanan kesitler hematoksilende (Haematoxylin harris, RRSP67/E) 3 dk bekletildi. Ardından 5 dk akarsuda yıkama yapıldı ve %1 lik asit-alkol solusyonuna batırılıp çıkarıldı. Yeniden akarsuda 5 dk yıkama yapıldı ve 1 dk eosin (Surgipath, Unno1989, 01601E) ile boyandı. Akarsuda 5 dk yıkanan kesitler % 80 ve % 96 alkol serilerinde 1 dk bekletildi ve kesitler kurutulduktan sonra ksilende 1 saat bekletildi (Tablo 2). Tüm boyalı preparatlar entellan (Spring bioscience, DMM-125) ile kapatılarak ışık mikroskobu (Olympus, BX43) altında incelendi.

Tablo 2: Hematoksilen- Eozin boyaması

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	3 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	1 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

## 5.8. DOKU İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMASI

Örneklerden alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95' ten % 60' a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Immunohistokimya kalemi ile (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan örnekler % 0,5' lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutuldu. Kesitlerin 3x5 dk PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk % 3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. Kesitler 3 defa 5' er dk PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika bloklama solüsyonu (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile muamele edildi. Bloklama

solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra kesitler 1/50 dilüsyon ile hazırlanmış anti-sitokeratin 7 (Santa Cruz Biotechnology, sc-23876) antikoru ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043, Invitrogen) ile her bir boyama basamağı 30' ar dakika olacak şekilde boyandı. Basamaklar arasında 3 defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğüne saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, 71897, 71898, Milipore) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile 2 dk bekletilerek artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma vasatı (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3: İmmunoperoksidaz boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	PBS	10 dakika
Bloklama	Tripsin	15 dk (37 <sup>0</sup> C)
Yıkama	PBS	3X5 dk
	%3 Hidrojen Peroksit	5 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Birincil	Antikor Anti-sitokeratin 7	1 gece, 4°C de
Uygulaması		
Yıkama	PBS	3x5 dakika
İkincil	antikor Biotinlenmiş antimouse	30 dk
Uygulaması	veya anti-rabbit	
Yıkama	PBS	3x5 dakika

İkincil	antikor	Streptavidin-peroksidaz	30 dk
Uygulaması		uygulaması	
Kromojen		DAB	5 dk.
Yıkama		Distile su	3x5 dk.
Zıt Boyama		Mayer hematoksilen	5 dakika
Yıkama		Distile su	10 dk
Dehidratasyon		Alkol (%80, %90, %100)	2 şer dk
Şeffaflaştırma		Ksilen	10 dk
Kapatma		Entellan	

## 5.9. DNA METİLASYONU ANALİZİ

DNA metilasyon için her bir gruptan ortalama 30 tane oosit 200 µl steril PBS içerisine alınarak yıkandı ve DNA izolasyonu için hazırlandı. DNA izolasyonu için K1820-01 katalog numaralı invitrogen pureLink genomic DNA mini kit kullanılmıştır.

### 5.9.1. DNA İzolasyonu

Oositler yıkama işleminin ardından 20 ul proteinaz K içerisine aktarıldı ve steril PBS ile bir defa yıkama işlemi gerçekleştirildi. Oositler 200 ul PBS içerisine transfer edilerek üzerine 20 ul proteinaz K ve 20 ul RNase A ilave edilerek vorteksleme yapıldı ve 2 dk oda sıcaklığında beklendi. Üzerine 200 ul genomik lysis/binding buffer ilave edildi ve bu esnada hücre zarının daha iyi parçalanması için 8-10 adet boncuk ependorf içine konuldu. Bunun yanında nükleik asit kaybı olmaması için aynı anda glikojen (GeneMark, GM14) ilavesi de gerçekleştirildi. Örnekler 55 °C’de 10 dk bekletildikten sonra 200 ul %100 alkol ile vorteksledi ve spin columna aktarılan örnekler 10000 g’de 1 dk santrifüj edildi. Burada spin columnun alt tüpü atıldı ve üstte kalan kısım yeni bir tüp üzerine aktarıldı. Üzerine 500 ul yıkama solüsyonu konularak 10000 g’de 1 dk santrifüj edildi. Alt tüp tekrar atıldı ve yıkama solüsyonu 2 ilavesi 500 ul olarak yapıldı. Örnekler 3 dk maksimum hızda santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Alt tüp atıldı ve yerine yenisi konuldu. Bir kez de boş döndürülüp alt tüp tekrar atıldı. Spin kolumn kapaklı bir ependrofa aktarıldı ve üzerine 25-200 ul elution buffer ilavesi DNA’yı alttaki tüpe indirmek için yapıldı.

DNA miktarı ölçümü nanodrop ile yapıldı. Öncelikle nanodrop su ile temizlendi. Kör grup için saf su kullanıldı. Herbir örnek ölçümünden sonra tekrar su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Örneklerin DNA miktar ölçümü yapıldıktan sonra örneklerin bulunduğu ependrofların ağzı parafilm ile sarılarak -20 °C'ye kaldırıldı.

### **5.9.2. DNA Metilasyonu**

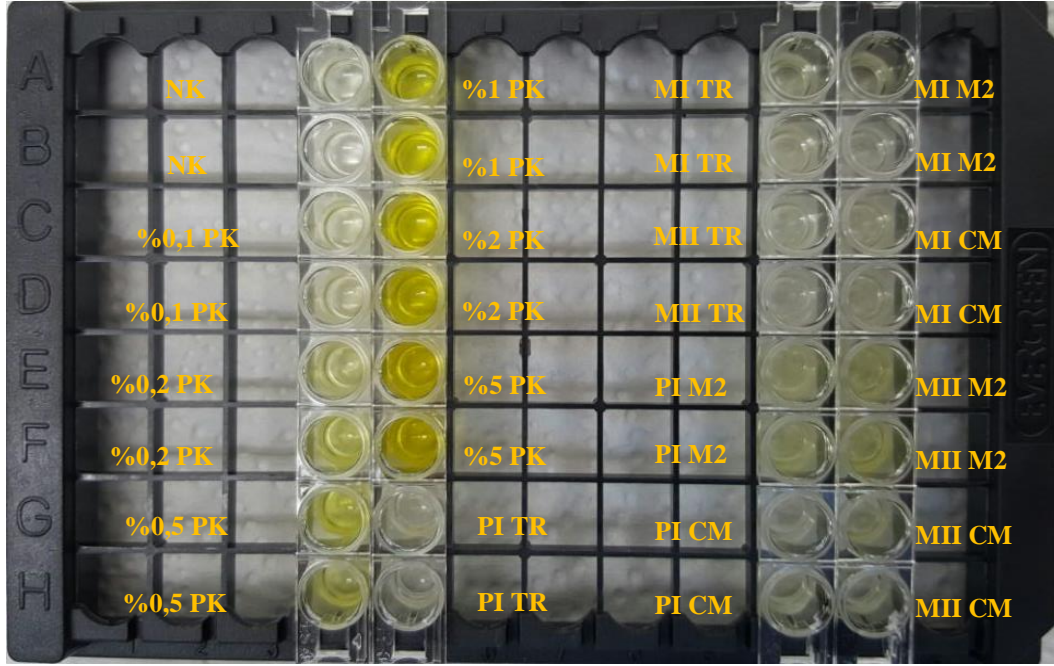
DNA metilasyon analizi için MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) Elisa Easy Kit (Colorimetric) (Epigentek, P-1030) kullanıldı.

DNA Metilasyonu için yıkama solüsyonu, negatif ve pozitif kontroller için örnekler klavuza göre hazırlandı. Toplamda 32 reaksiyon olacak şekilde örnekler dizayn edildi ( Tablo 4). Negatif kontrol % 2 dilüe, pozitif kontrol ise % 0.1, % 0.2, % 0.5, % 1, % 2 ve % 5 dilüe oranlarda kullanıldı. Çalışma örnekleri için her bir göze 100 µl oranında binding solüsyonu ve 20 ng (2-4 µl) DNA eklendi ve 37 °C'de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm örnekler 3x1 dk yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra tüm örnekler üzerine 1 µl 5-mC antikoru içeren kompleks solüsyon ilave edildi. İnkübasyon için 50 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüm örnekler 5x1 dk yıkama solüsyonu ile yıkandı. Ardından her bir göze 50 µl developer solüsyon kondu ve örnek renklerinin 3-4 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonunda mavi renge dönmesi beklendi. Pozitif kontrol grubundan %5'lik gözün koyu maviye dönmesi ile tüm gözlere 100 µl stop solüsyonu eklenerek enzim reaksiyonu durduruldu. Birkaç dakika beklenilerek renk değişiminin tamamen durması beklendi ve sarı renge dönüşümü izlendi (Resim 9). Analiz absorbans ölçümü ..... makinesinde 450 nm de 2-15 dk içinde ölçüldü.

Tablo 4: DNA metilasyonu yapılan gruplar.

1. Şerit	2. Şerit	3. Şerit	4. Şerit
NK	% 1 PK	Metafaz I TR	Metafaz I M2
NK	% 1 PK	Metafaz I TR	Metafaz I M2
% 0,1 PK	% 2 PK	Metafaz II TR	Metafaz I CM
% 0,1 PK	% 2 PK	Metafaz II TR	Metafaz I CM
% 0,2 PK	% 5 PK	Profaz I M2	Metafaz II M2
% 0,2 PK	% 5 PK	Profaz I M2	Metafaz II M2
% 0,5 PK	Profaz I TR	Profaz I CM	Metafaz II CM
% 0,5 PK	Profaz I TR	Profaz I CM	Metafaz II CM

NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, TR: Trofoblast kök hücreleri ile ko-kültür yapılan gruplar, M2: M2 vasat ile kültüre edilmiş gruplar, CM: Trofoblast kök hücresi kültür vasatı ile kültüre edilmiş grupları ifade etmektedir.



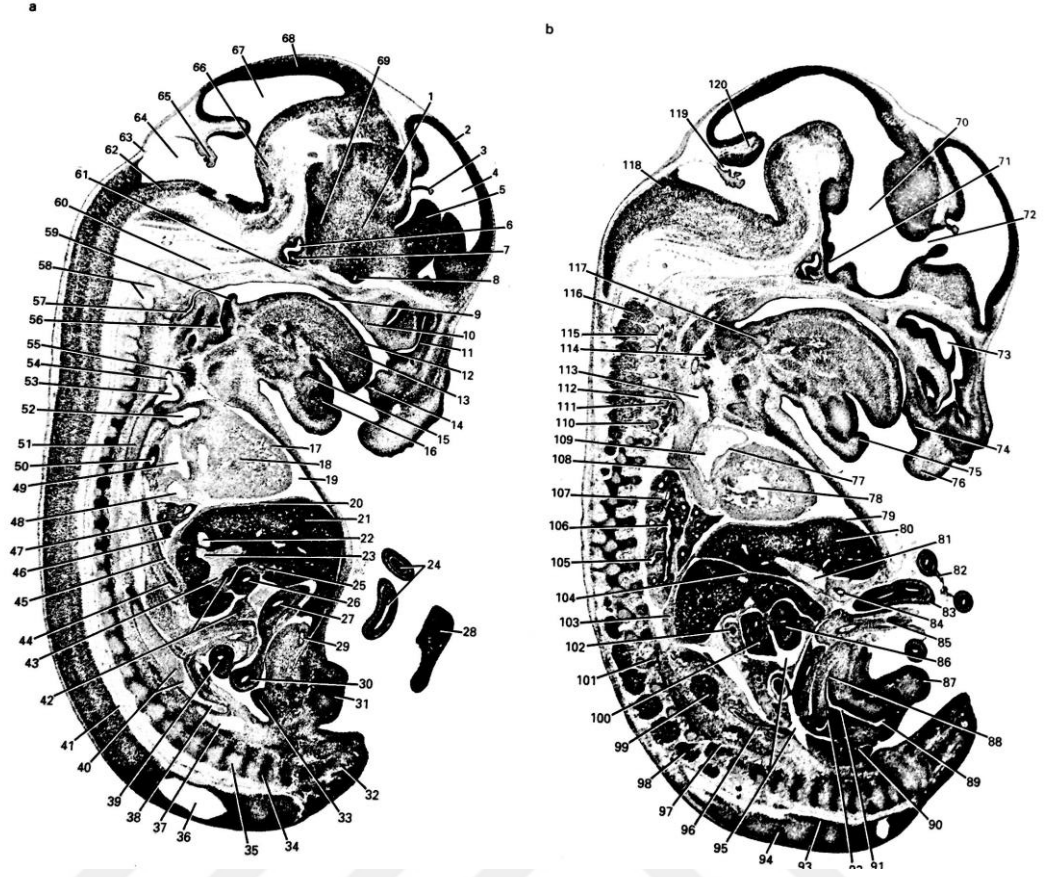
Resim 9: Elisa metodu ile global DNA metilasyon ölçümü sırasında stop solusyonu sonrası örneklerde meydana gelen renk değişimi.

## **6.BULGULAR**

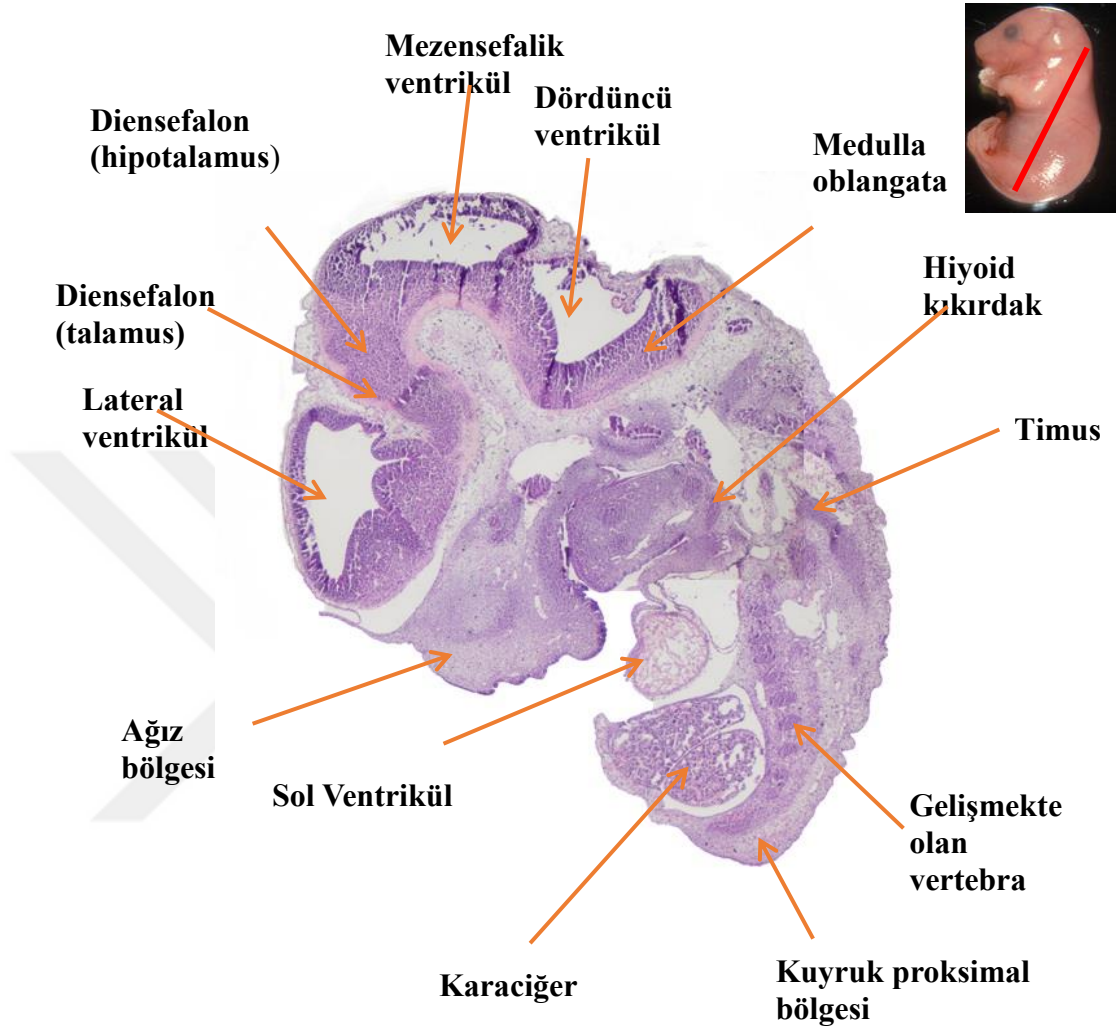
### **6.1. TROFOBLAST ELDESİ VE KÜLTÜRÜ**

Trofoblast eldesi için denekler fertilizasyondan sonraki 14. Günde embryo ile birlikte plasentalar çıkartıldı. Embryo gün tayini için embryo ile birlikte ışık mikroskopik takibe alınan örneklerin histokimyasal analizinde neuroektoderm ve primer beyin vezikkülleri seçilmekte idi (Şekil 25). Primer veziküller ile birlikte 3. Ventrikül ve koroid pleksus gelişimi olduğu izlendi. Ayrıca üst ve alt ekstremitelere ait plaklar embriyo gövdesinin her iki yanında gözlemlendi. Embryonun dorsal kısmında somite ait yapılar seçildi. Toraks içerisinde kalp ve akciğer dokularına ait yapılar saptandı. Batına uyan bölgede gastrointestinal sisteme ait (özafagus, mide, ince ve kalın bağırsaklar) dokular ile birlikte karaciğer dokusuna ait kesitler gözlemlendi. Genitoüriner sisteme ait yapılar anatomic pozisyona uygun şekilde ayırt edildi. Bu veriler doğrultusunda embriyonun 13.5-14.5 güne ait embriyo olduğu teyit edilmiş oldu (Resim 10 ve Resim 11).

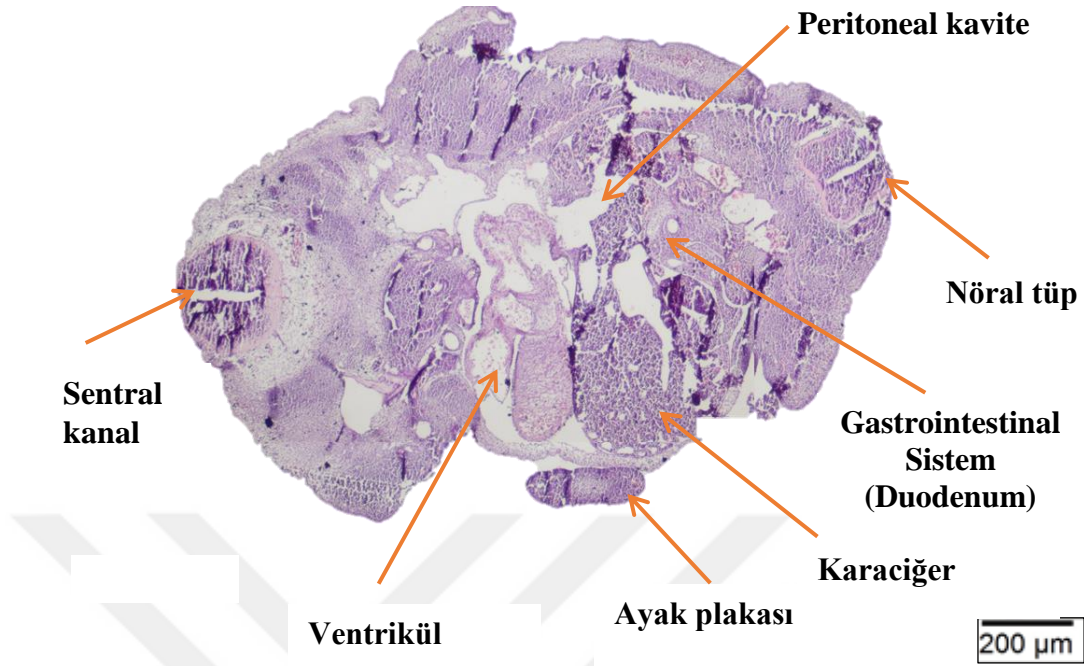




Şekil 25: Yaklaşık 60 somit bulunduran 13,5 günlük embriyo görüntüsü (Kaufman, 1994).

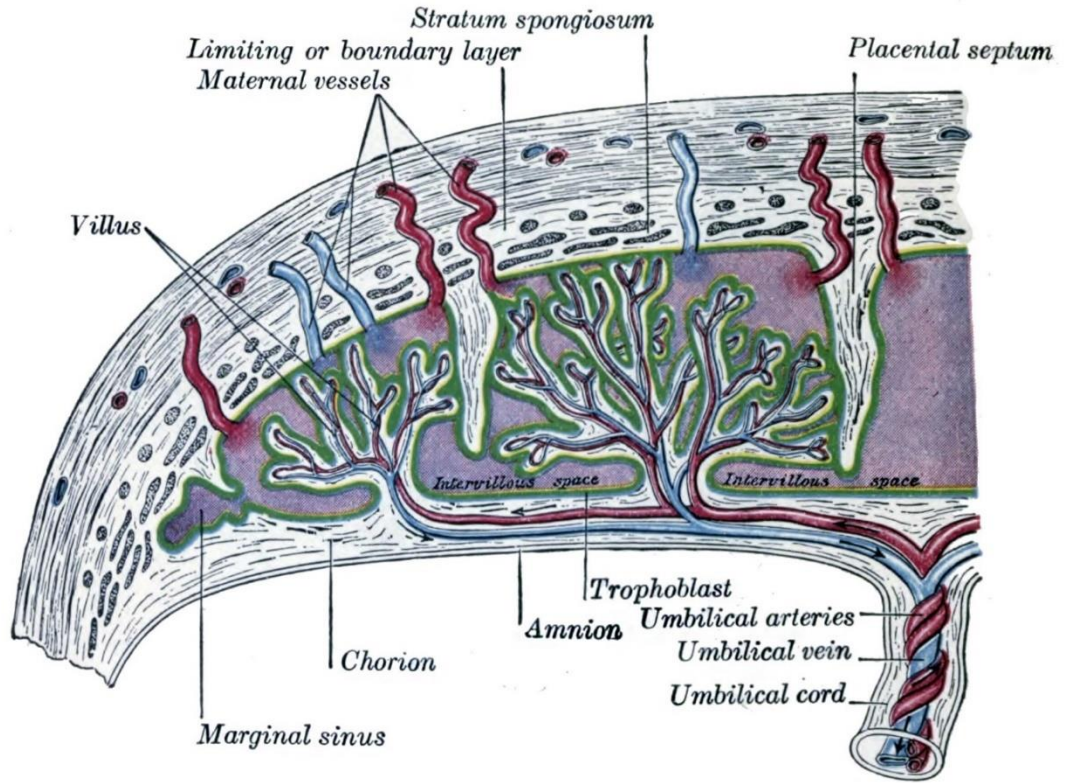


Resim 10: 14 günlük embriyoya ait görüntü. H-E boyaması (Sagital kesit). Ölçek: 200

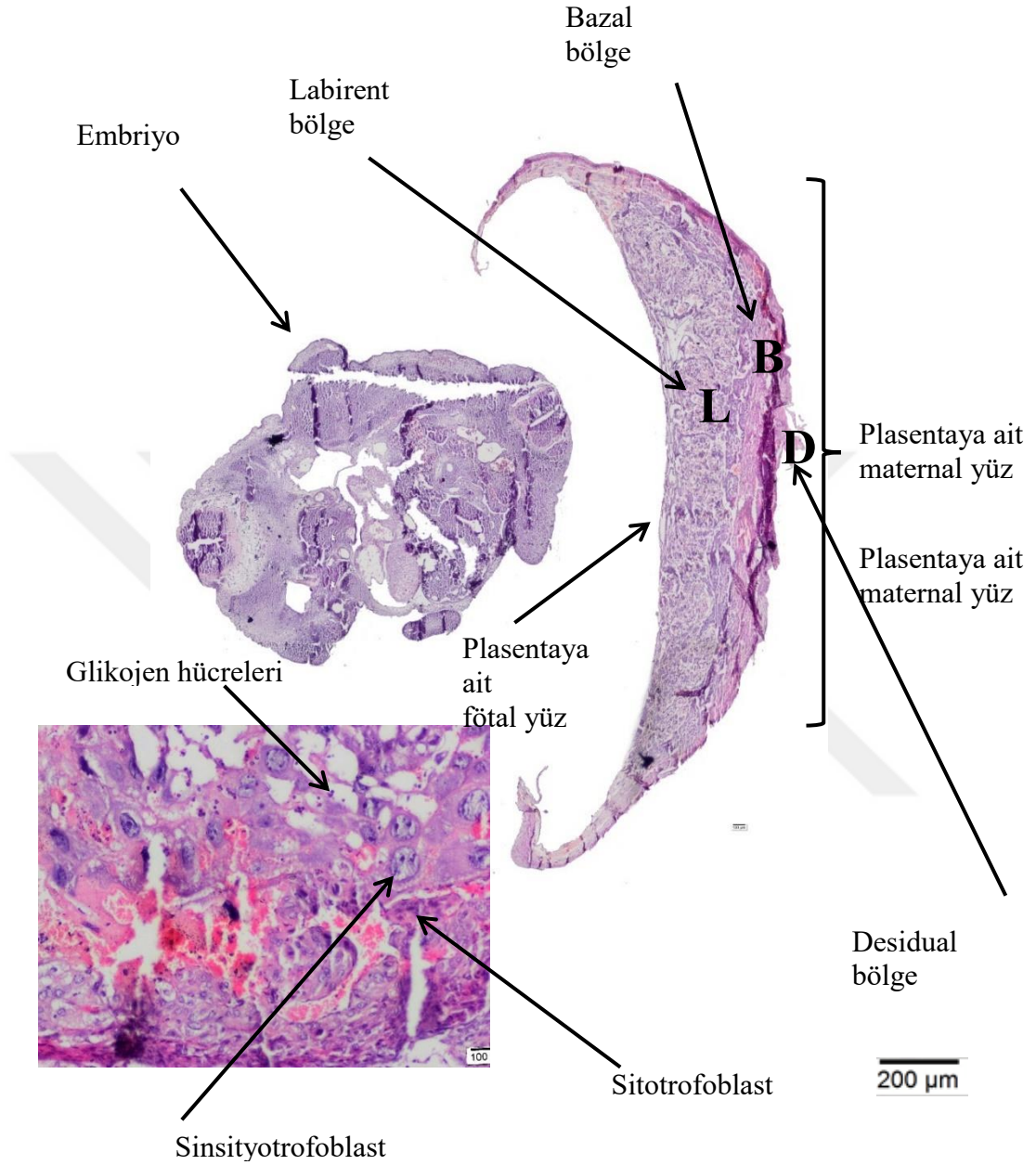


Resim 11: 14 günlük embriyoya ait görüntü (Transvers kesit). H-E boyaması. Ölçek: 200 µm.

Aynı kesitte plasentanın histokimyasal analizi sonrasında fetal yüzde, Maternal yüz desidual hücrelerden oluşmakta idi. Desidual hücreler soluk sitoplazmalı, içerisinde glikojen birikimi olan büyük hücreler olarak ayırt edildi. Fetal yüz ise amniyon hücreleri ile sınırlı, koryon frondozum hücrelerinden oluşmuş olup, sito ve sinsityotroblast hücrelerinin yer aldığı tabaka olarak gözlendi. Intervillöz alanda sito ve sinsityotroblast hücrelerle birlikte mezenkimal hücrelerin varlığı izlendi. Mezenkimal hücreler fusiform yapıda sitoplazmik uzantıları olan hücreler olarak ayırt edildi. Placenta kesitlerinin interstisyel alanında büyük geniş sitoplazmalı Hofbauer hücreleri de yer yer gözlendi. Intervillöz alanda fetal kapillerler villuslar izlendi. Desidual bazalisten koryon plağına uzanan desidual bölgede izlendi (Şekil 26, Resim 12).

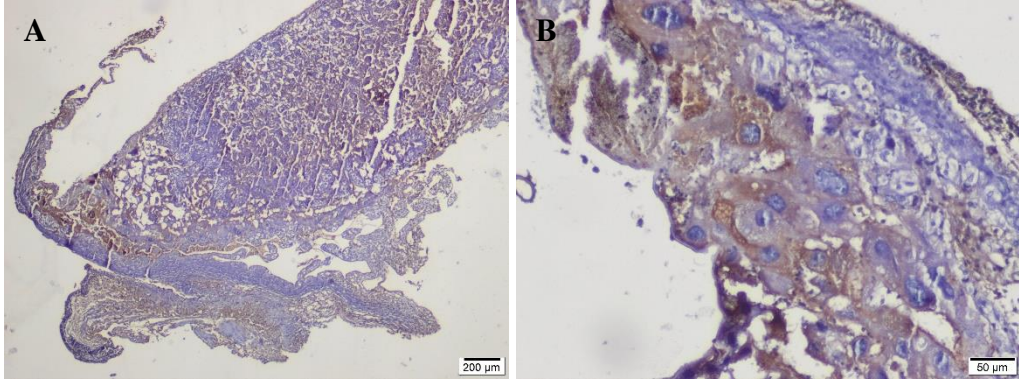


Şekil 26: Plasentaya ait yapılar.  
[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Placenta\\_Development](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Placenta_Development),  
erişim tarihi: 29.07.2016.



Resim 12: 13,5 günlük embriyo ve plasentaya ait H-E boyaması

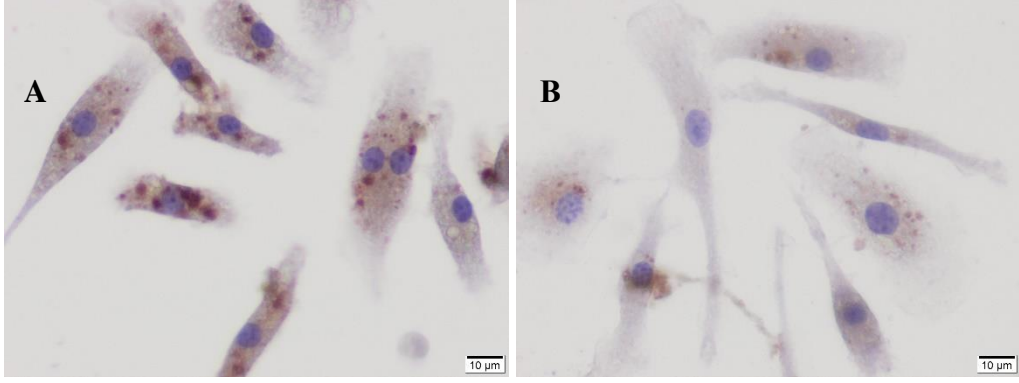
Trofoblast kök hücrelerinin plasenta içerisindeki lokalizasyonu ve varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan sitokeratin-7 immunohistokimyasal analizi sonrasında pozitif hücrelerin özellikle fetal yüzde daha fazla olmak üzere varlığı tespit edildi (Resim 13).



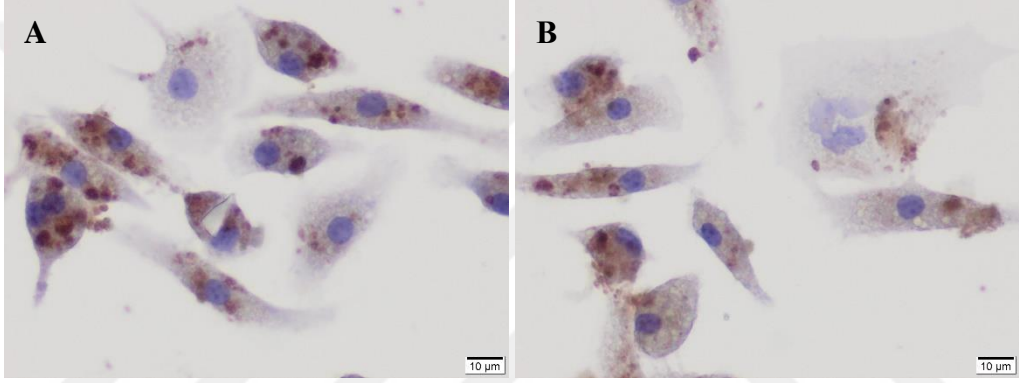
Resim 13: Sitokeratin 7 ile immunohistokimyasal boyanmış 14. Gün embriyo plasentası. Ölçek A-200 µm, B-50 µm.

## 6.2. TROFOBLAST KÜLTÜRÜ VE KARAKTERİZASYONU

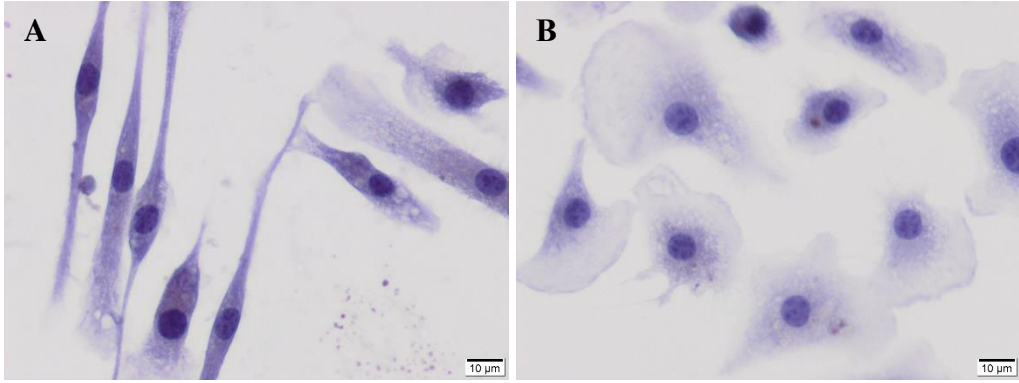
Plasentadan elde edilen trofoblast kök hücreleri kollajenaz sonrasında elde edilerek kültüre edildi (Resim 2). Kültürün ilk gününde hücrelerin yer yer yapışmaya başladıkları gözlemlendi (Resim 3). Kültüre devam edildiğinde hücrelerin fusiform yapıda oldukları, fakat büyümelerinin yavaş olduğu saptandı (Resim 4). O nedenle kültüre 14 gün devam edilerek yeterli sayıda trofoblast kök hücre eldesi gerçekleştirildi. Trofoblast hücrelerinde pasaj yapılarak devam edilen hücrelerin pasaj sonrası kültür kabına yapışma ve çoğalmada problemler yaşanmasından dolayı trofoblast kök hücre kültürü oositler ile birlikte ko-kültür yapılacak olan 24 gözlü kültür kaplarında ilk günden itibaren ekimleri yapılarak, hiç pasaj yapılmadan kullanıldı. Trofoblast kök hücrelerin karakterizasyonu için bir grup hücre tespit işleminden sonra sitokeratin-7 ile boyandı. Boyama sonrasında 14. Gündeki tüm hücrelerin sitokertain-7 pozitifliklerinin gözlenmesi üzerine (Resim 14) bu hücreler ile çalışmaya devam edildi. Oositler ile birlikte ko-kültür yapılması amacıyla kullanılacak olan trofoblast kök hücrelerin ko-kültür sırasında çoğalmalarının inhibe edilmesi için hücreler mitomisin-C ile inkübe edildi ve bu hücrelerin stokeratin-7 ile immunohistokimyasal analiz sonrasında bu hücrelerin hala sitokeratin-7 eksprese ettikleri gözlenmesi üzerine bu hücrelerin mitomisin-C uygulaması sonrasında da trofoblast kök hücre karakterini koruduğu sonucuna varıldı (Resim 15).



Resim 14: 14,5 günlük fare plasentasından elde edilen trophoblast kök hücre karakterizasyonu için sitokeratin-7 immunoreaktivitesinin mitomisin C uygulaması öncesi belirlenmesi. A, B- 10 µm



Resim 15: 14,5 günlük fare plasentasından elde edilen trophoblast kök hücre karakterizasyonu için sitokeratin-7 immunoreaktivitesinin mitomisin C uygulaması sonrası belirlenmesi. A, B- 10 µm.

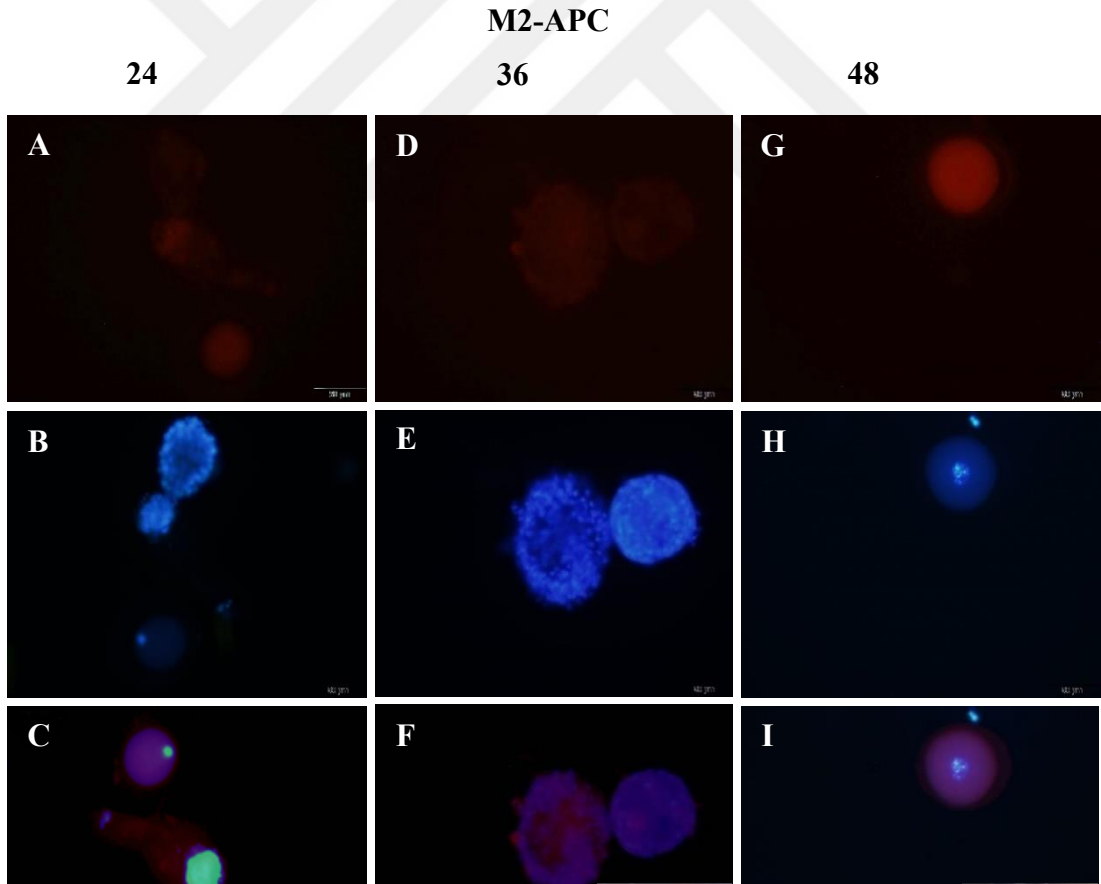


Resim 16: 14,5 günlük fare plasentasından elde edilen trophoblast kök hücre karakterizasyonu için yapılan indirekt-histokimyasal boyamada kontrol grubu. A, B- 10 µm.

### 6.3. ANTİKOR İMMUNOREAKTİVİTELERİ

#### 6.3.1. APC İmmunoreaktivitesi

M2 kültür vasatı içerisinde profaz I ve metafaz I oositlerde APC immunoreaktivitesinin zayıf şiddette (+) olduğu gözlenirken, metafaz II oositlerde APC immunoreaktivitesinin orta şiddette (++) olduğu izlendi (Resim 17). Trofoblast kök hücre kültür vasatı içerisinde kültüre edilen profaz I, metafaz I ve metafaz II oositlerde APC immunoreaktivitesinin benzer olup zayıf şiddette (+) olduğu tespit edildi (Resim 18). Trofoblast kök hücreleri ile yapılan ko-kültür sonucunda ise, APC immunoreaktivitesinin profaz I oositlerde kuvvetli (+++) şiddette, metafaz I oositlerde orta şiddette (++) ve metafaz II oositlerde zayıf şiddette (+) olduğu görüldü (Resim 19).



Resim 17: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında APC immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

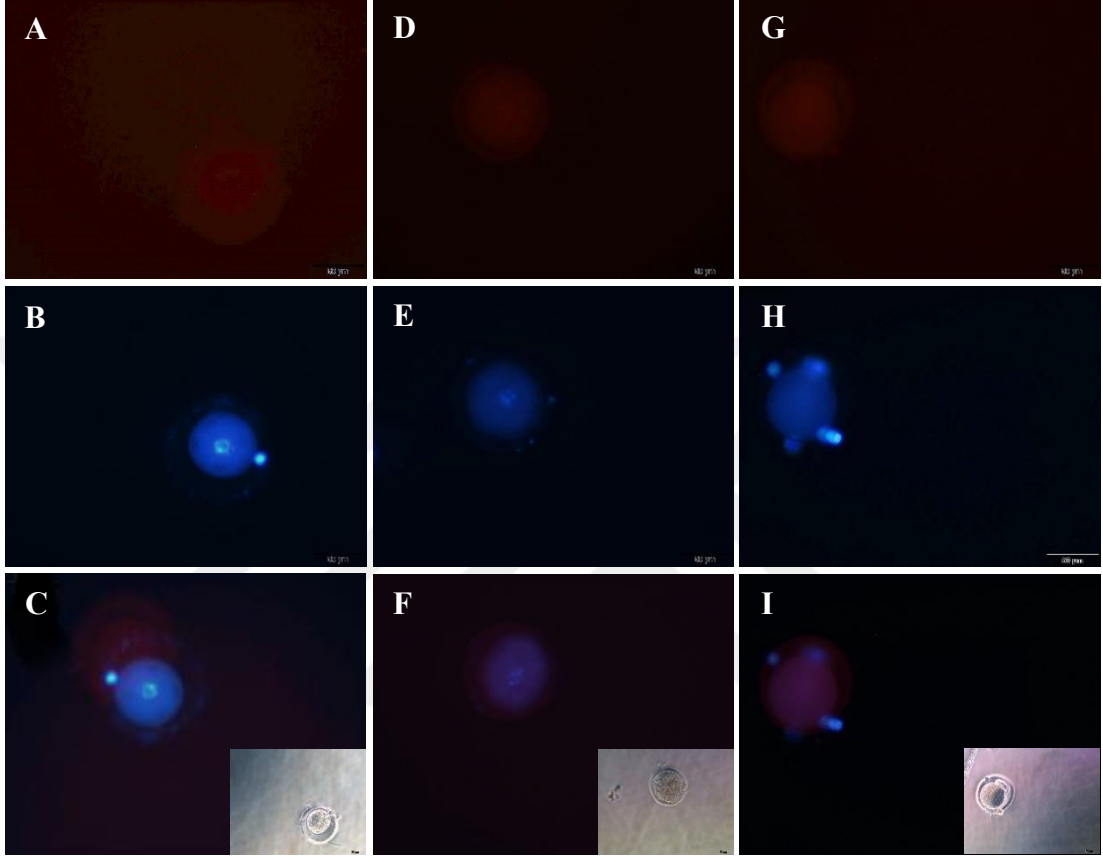


CM-APC

24

36

48



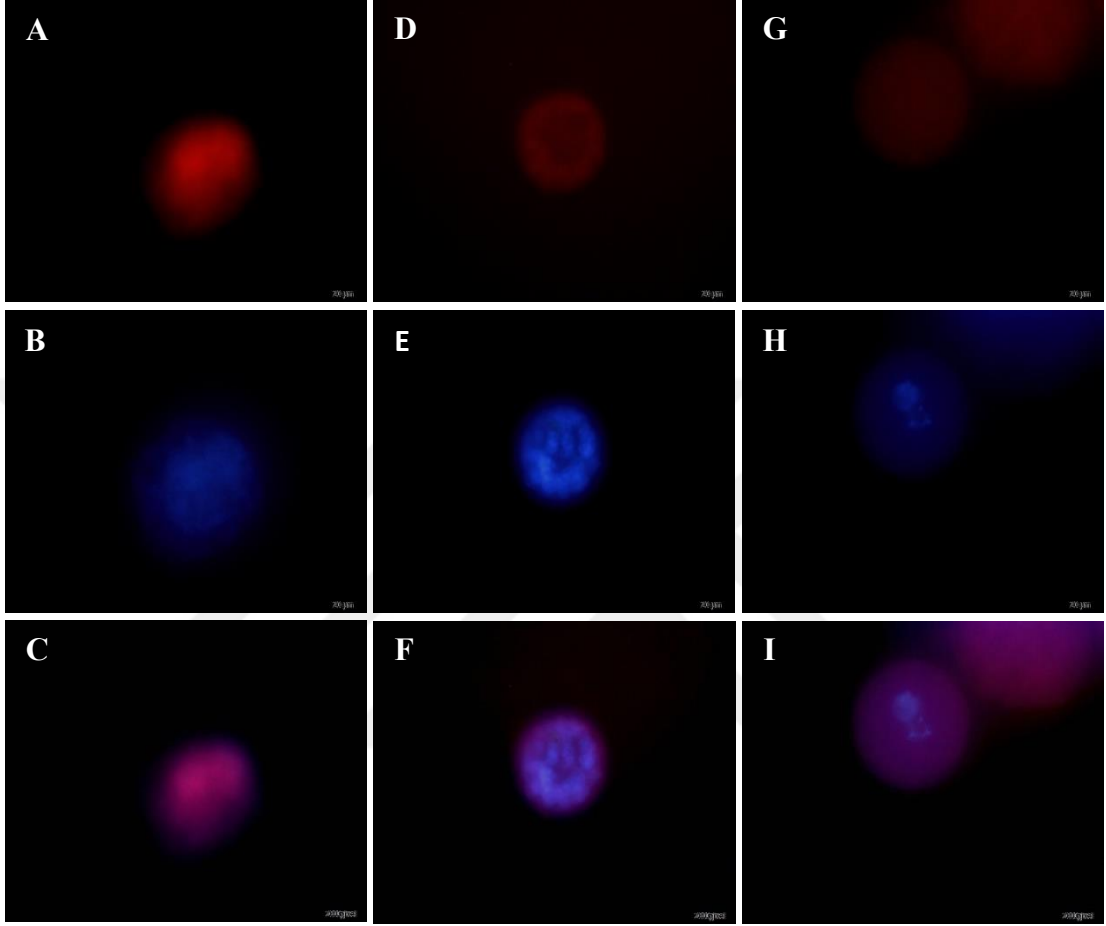
Resim 18: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında APC immunoreaktivitesi. Ölçek: 200  $\mu$ m.

## TR-APC

24

36

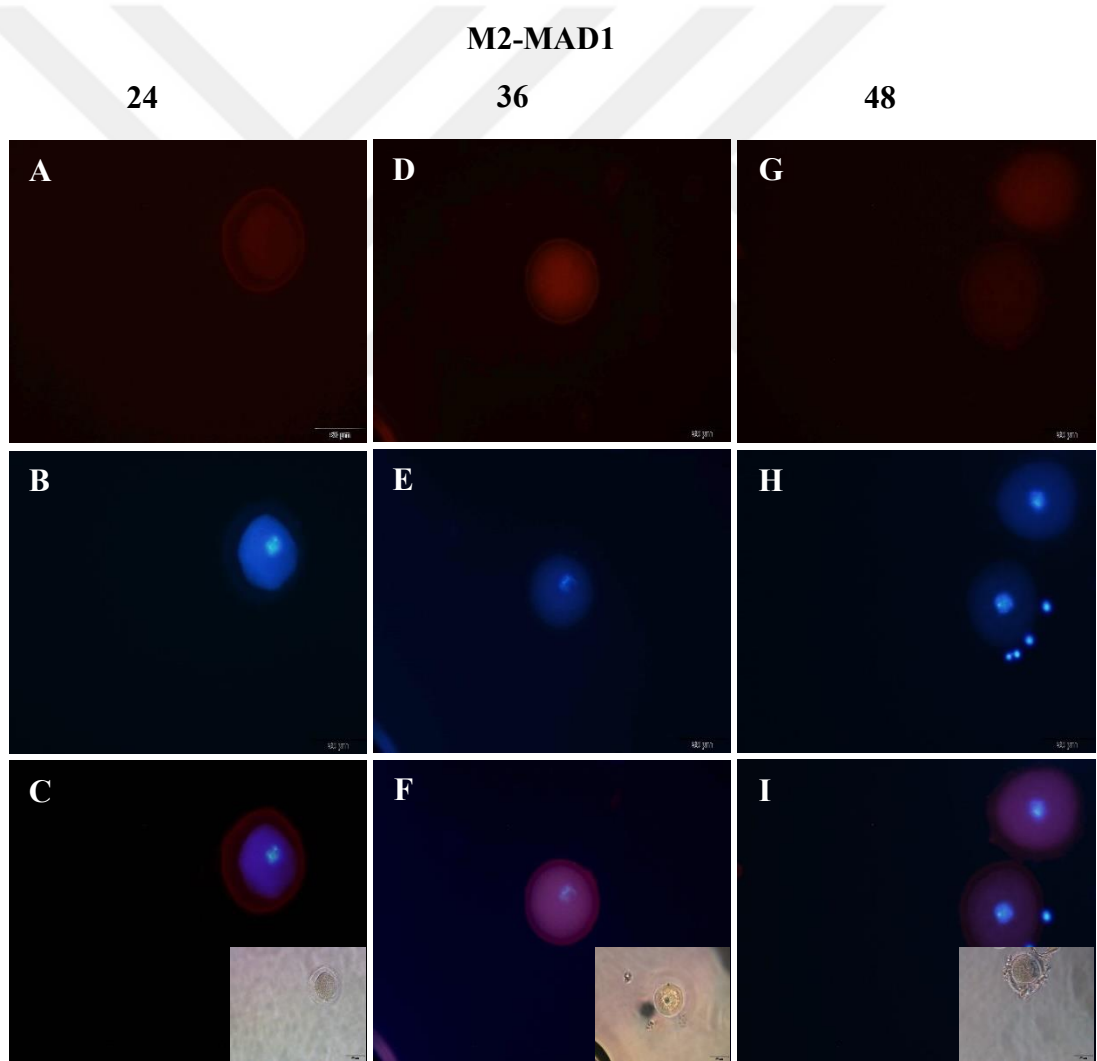
48



Resim 19: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında APC immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

### 6.3.2. MAD1 İmmunoreaktivitesi

M2 vasatı ile kültür edilen grupta profaz I ve metafaz II oositlerde zayıf (+) şiddette, metafaz II oositlerde ise orta (++) şiddette MAD1 immunoreaktivitesi izlendi (Resim 20). Trofoblast kök hücresi kültür vasatı ile yapılan kültür sonucunda profaz I, metafaz I ve metafaz II oositlerde benzer MAD1 immuoreaktivitesi gözlemlendi ve immunoreaktivite zayıf (+) şiddette olarak tespit edildi (Resim 21). Trofoblast kök hücreleri ile yapılan ko-kültür sonucunda ise profaz I ve metafaz I oositlerinde MAD1 immunoreaktivitesi zayıf (+) şiddette iken, metafaz II oositlerinde orta şiddette (++) pozitif idi (Resim 22).



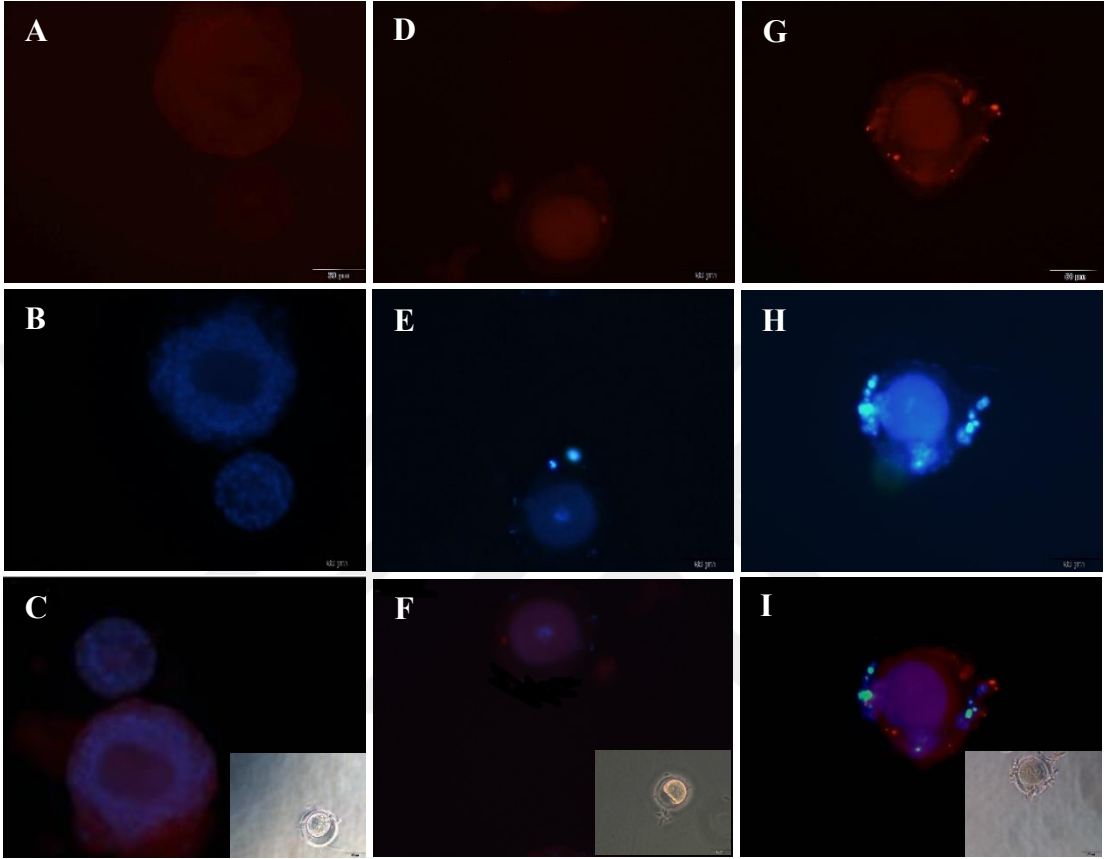
Resim 20: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında MAD1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

## CM-MAD1

24

36

48



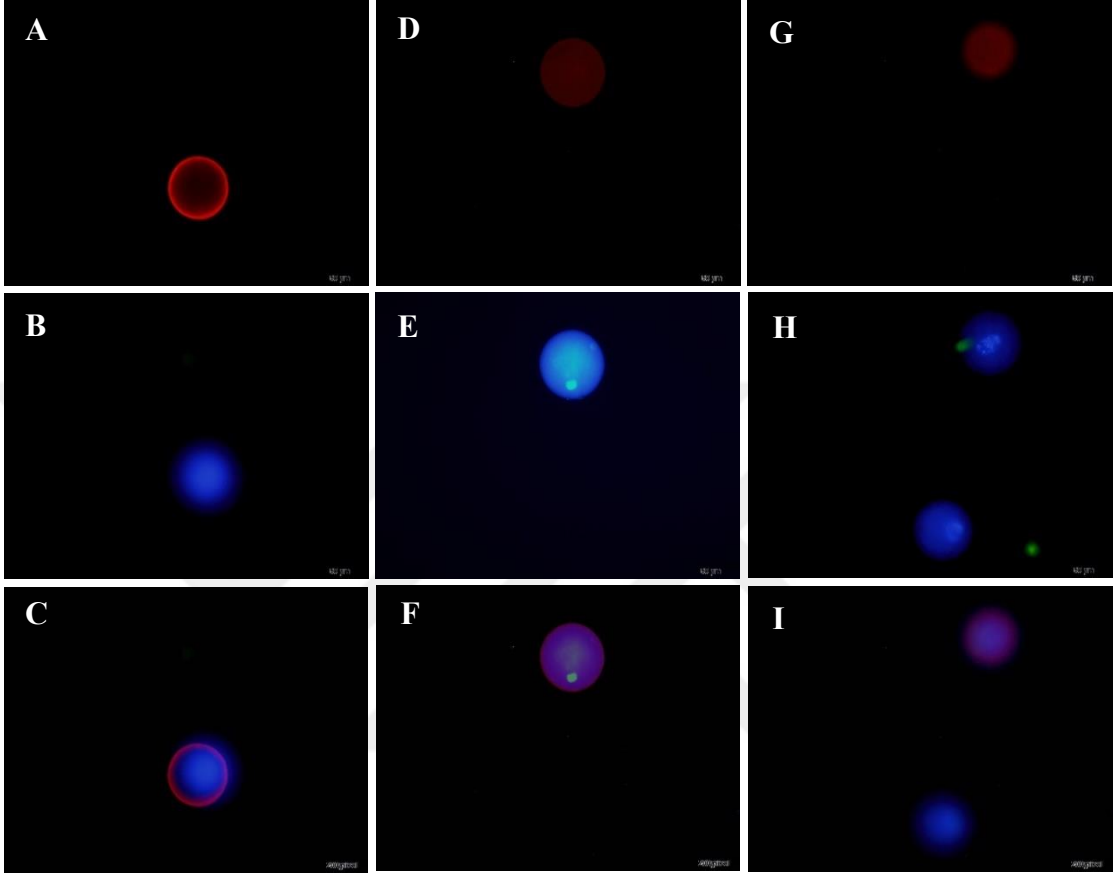
Resim 21: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında MAD1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

## TR-MAD1

24

36

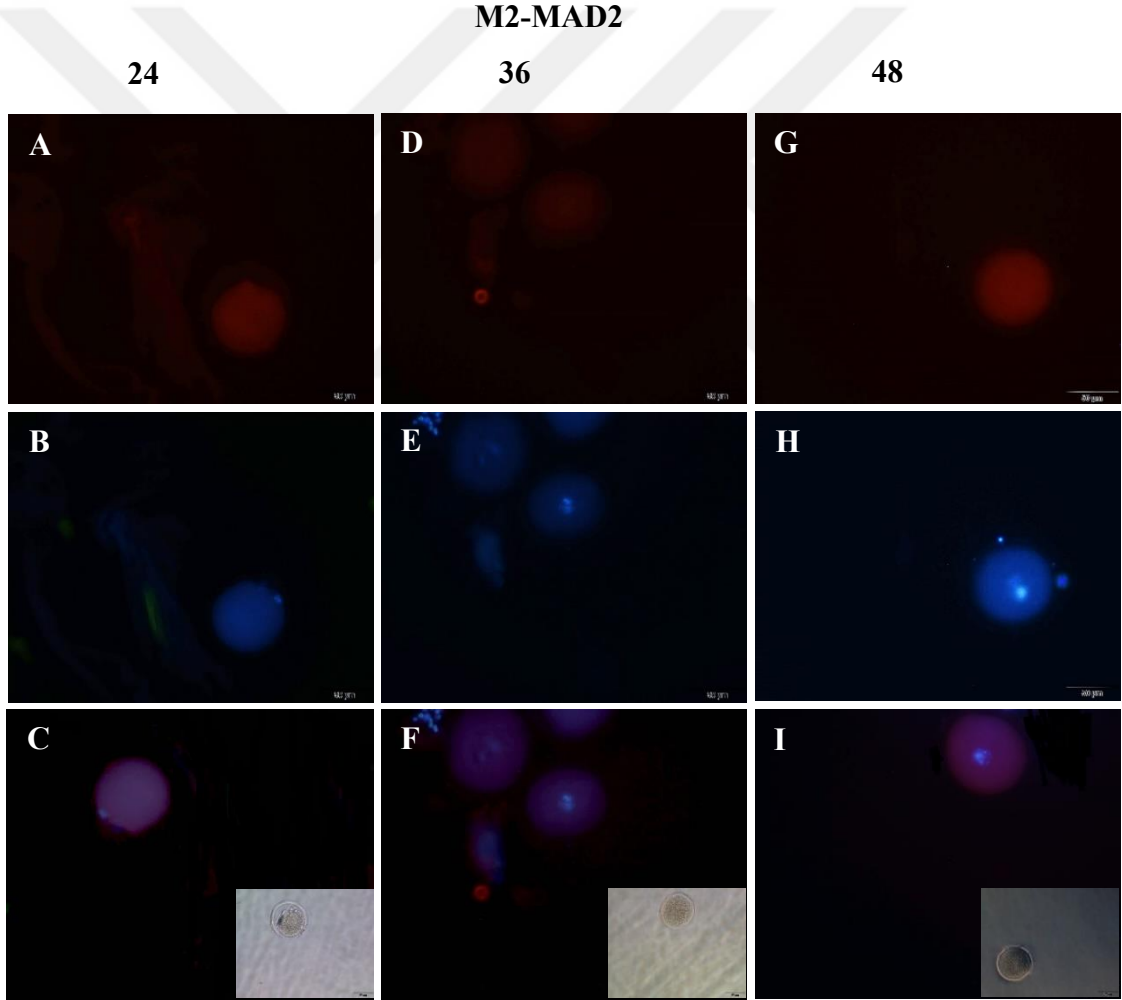
48



Resim 22: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında MAD1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

### 6.3.3. MAD2 İmmunoreaktivitesi

M2 vasatı ile kültür edilen gruplarda MAD2 immunoreaktivitesi profaz I ve metafaz II oositlerde orta (++) şiddette izlenir iken, metafaz I oositlerde zayıf (+) şiddette idi (Resim 23). Trofoblast kültür vasatı ile yapılan kültür sonucunda ise tüm gruplardaki oositlerde MAD2 immunoreaktivitesinin benzer olarak orta (++) şiddette olduğu saptandı (Resim 24). Trofoblast kök hücreleri ile kültür sonucunda profaz I oositlerde MAD2 immunoreaktivitesinin orta (++) şiddette, metafaz I ve metafaz II oositlerde ise benzer olarak zayıf (+) şiddette pozitiflikte bir immunoreaktivite olduğu belirlendi (Resim 25).



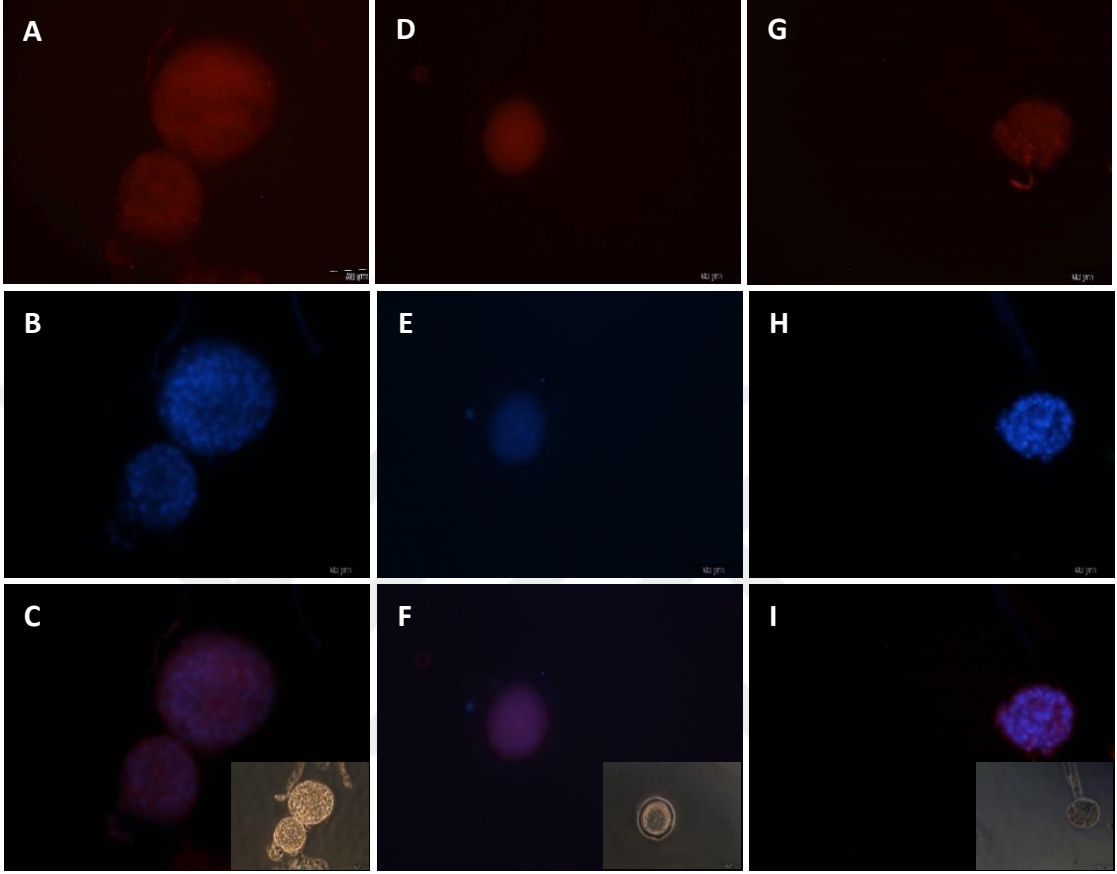
Resim 23: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında MAD2 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

## CM-MAD2

24

36

48



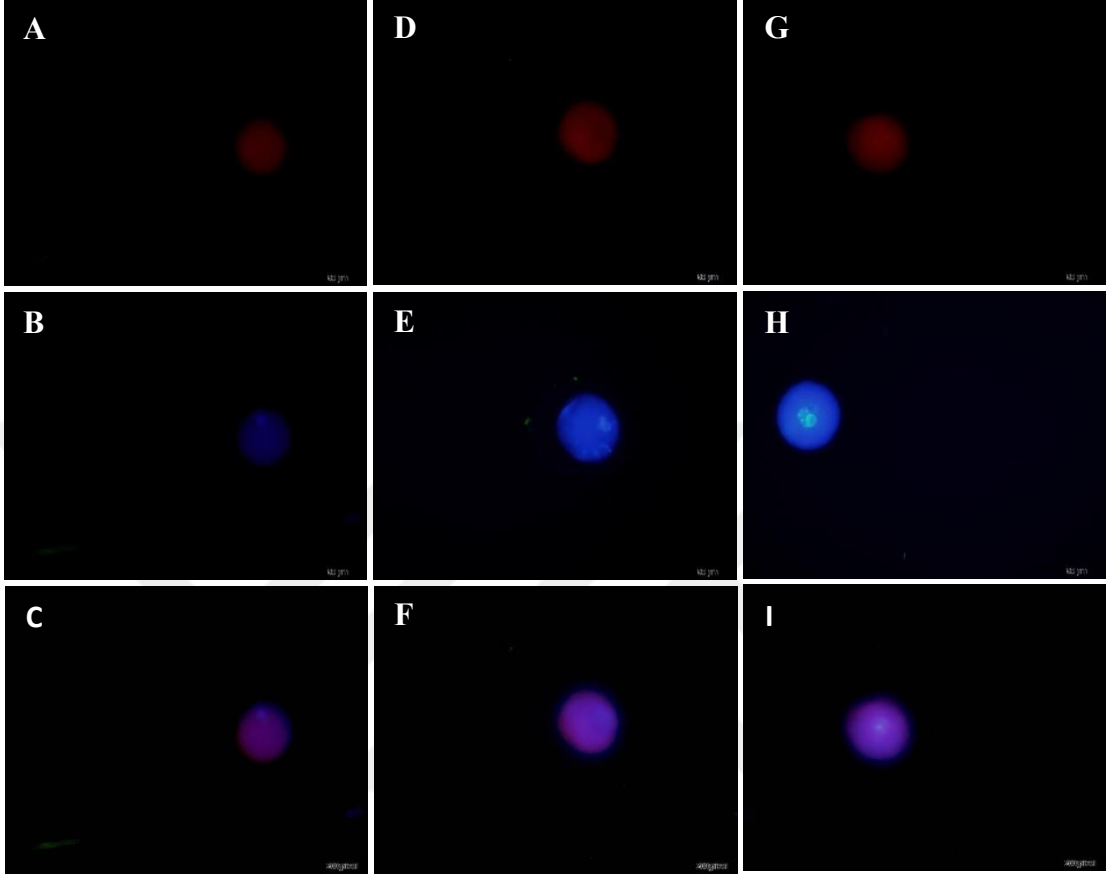
Resim 24: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında MAD2 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

## TR-MAD2

24

36

48

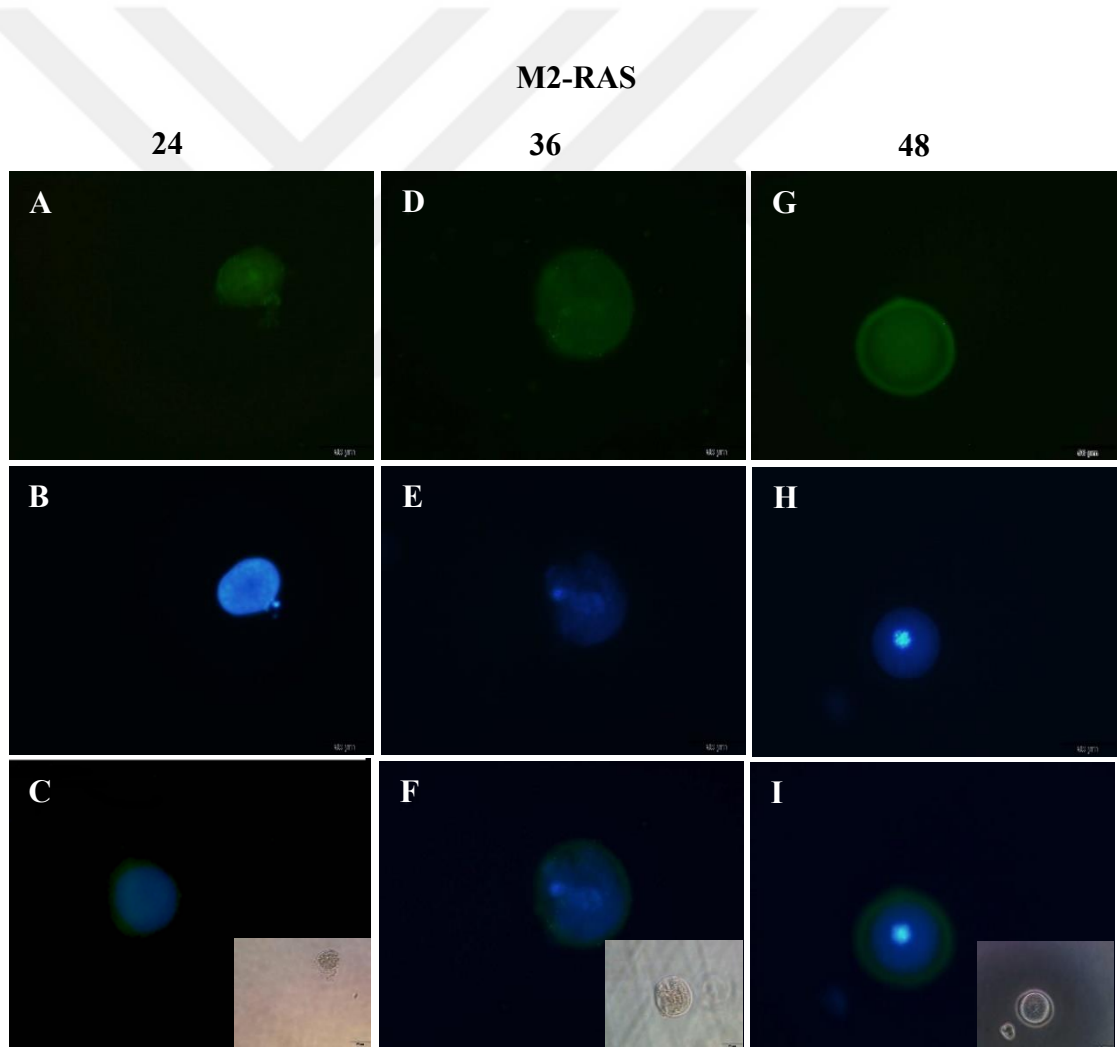


Resim 25: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında APC immunoreaktivitesi. Ölçek: 200  $\mu\text{m}$ .



#### 6.3.4. RAS İmmunoreaktivitesi

M2 vasatı ile kültürü yapılan profaz I, metafaz I ve metafaz II oositlerde benzer şekilde RAS immunoreaktivitesi olduğu ve orta (++) şiddette pozitiflik gösterdiği bulundu (Resim 26). Trofoblast kök hücre vasatı ile yapılan kültür sonucunda ise RAS immunoreaktivitesinin profaz I oositlerde kuvvetli (+++) şiddette, metafaz I oositlerde orta (++) şiddette ve metafaz II oositlerde zayıf (+) şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 27). Trofoblast kök hücreleri ile yapılan ko-kültür sonucunda ise profaz I oositlerde zayıf (+) şiddette pozitifliğin, metafaz I ve metafaz II oositlerde yer yer zayıf (+/-) şiddette olduğu bulgusuna ulaşıldı (Resim 28).



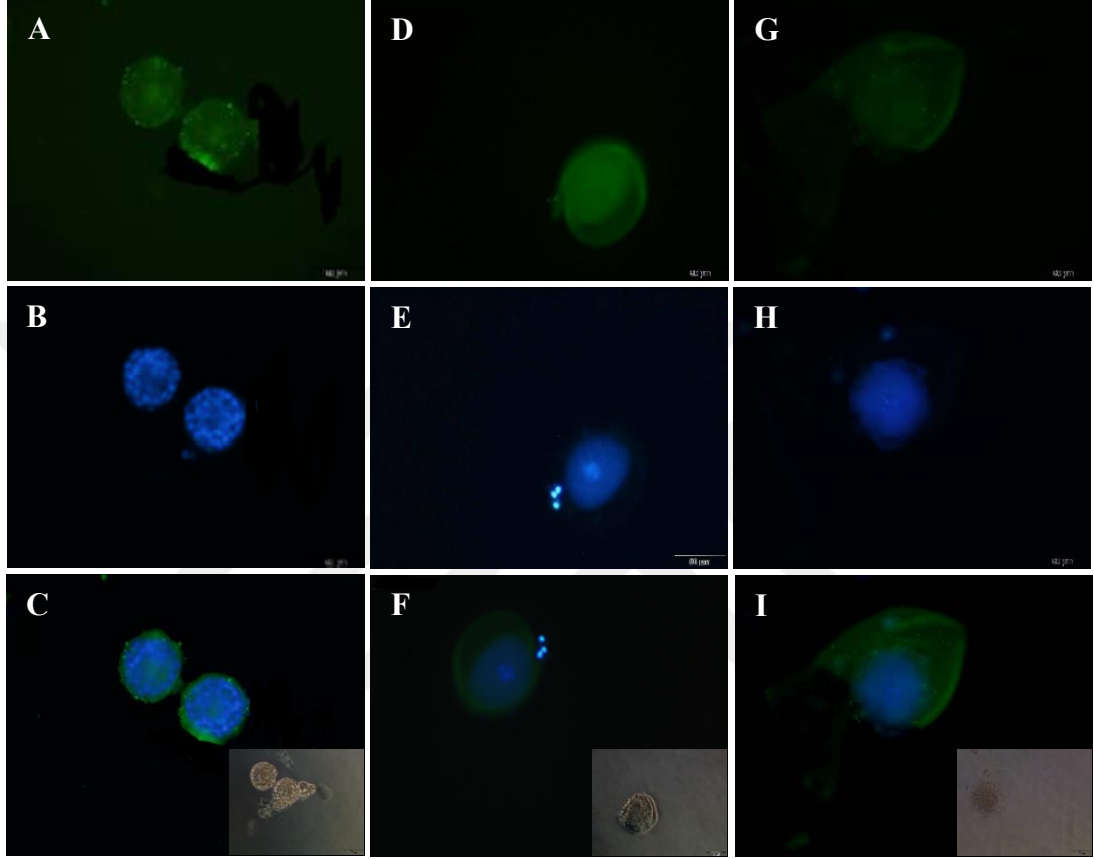
Resim 26: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında RAS immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

## CM-RAS

24

36

48



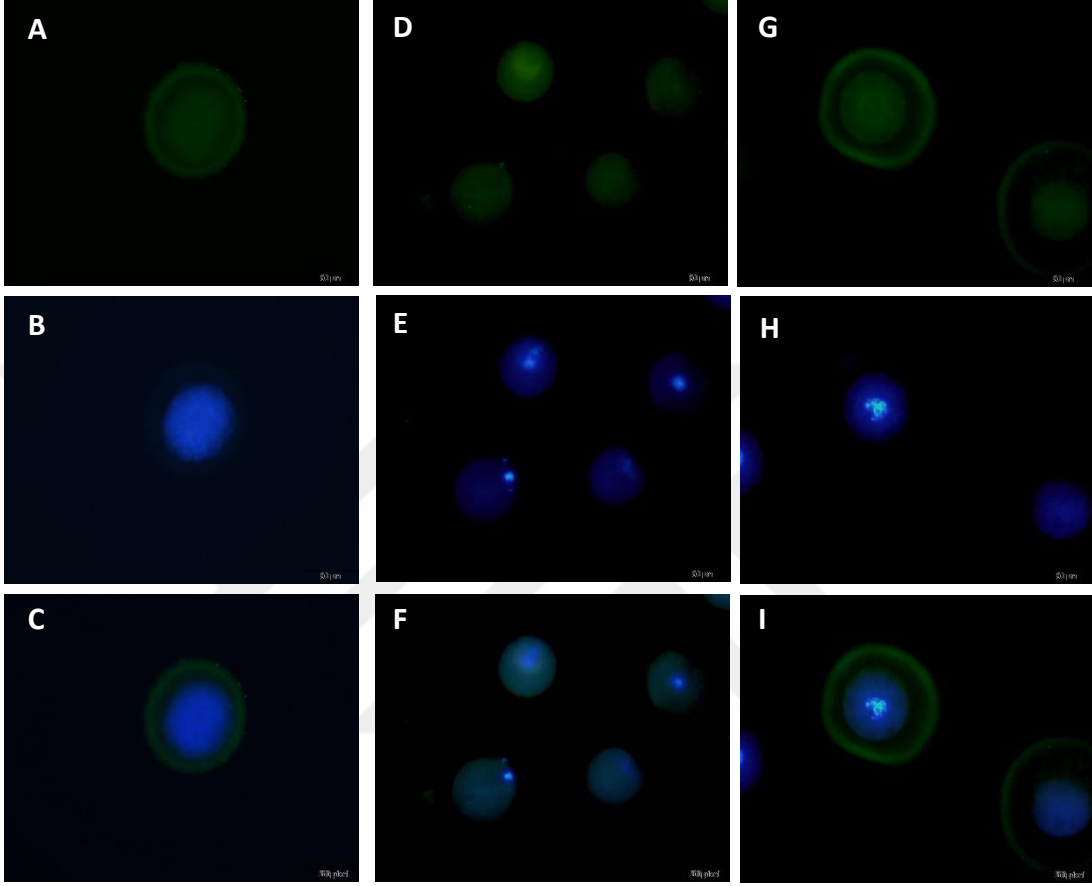
Resim 27: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında RAS immunoreaktivitesi. Ölçek: 200  $\mu$ m.

## TR-RAS

24

36

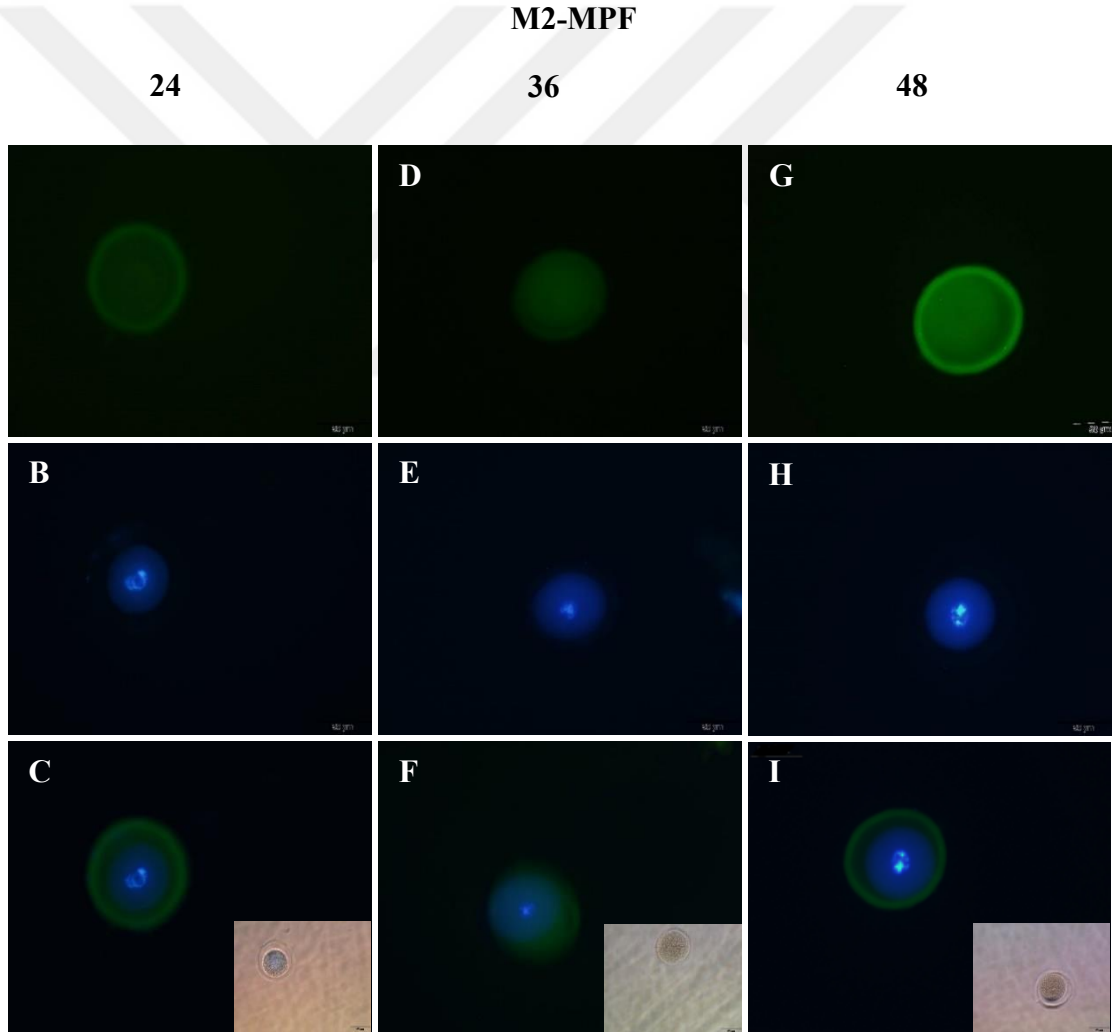
48



Resim 28: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında RAS immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

### 6.3.5.MPF İmmunoreaktivitesi

M2 vasatı ile kültür edilen profaz I ve metafaz I oositlerde MPF immunoreaktivitesi zayıf (+) şiddette pozitif iken, metafaz II oositlerde MPF immunoreaktivitesinde artış olup, kuvvetli (+++) şiddette olduğu belirlendi (Resim 29). Trofoblast kültür vasatı ile yapılan kültür sonucunda ise profaz I ve metafaz I oositlerde orta (++) şiddette immunoreaktivite gösterir iken, metafaz II oositlerde immunoreaktivitenin kuvvetli (+++) pozitif olduğu tespit edildi (Resim 30). Trofoblast kök hücreleri ile ko-kültür sonucunda ise MPF immunoreaktivitesinin profaz I oositlerde orta şiddette (++) pozitif olduğu, metafaz I oositlerde zayıf (+), metafaz II oositlerde ise yer yer zayıf (+/-) şiddette olduğu görüldü (Resim 31).



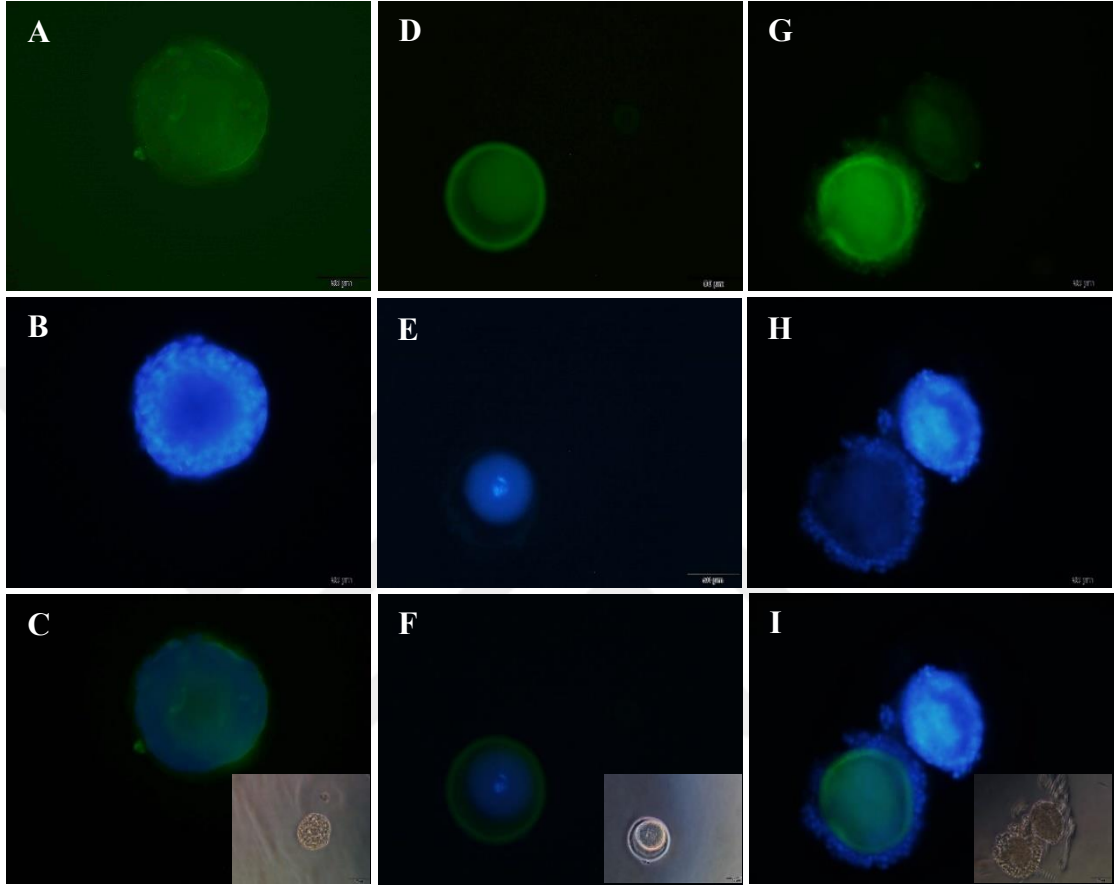
Resim 29: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında MPF immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm

CM-MPF

24

36

48



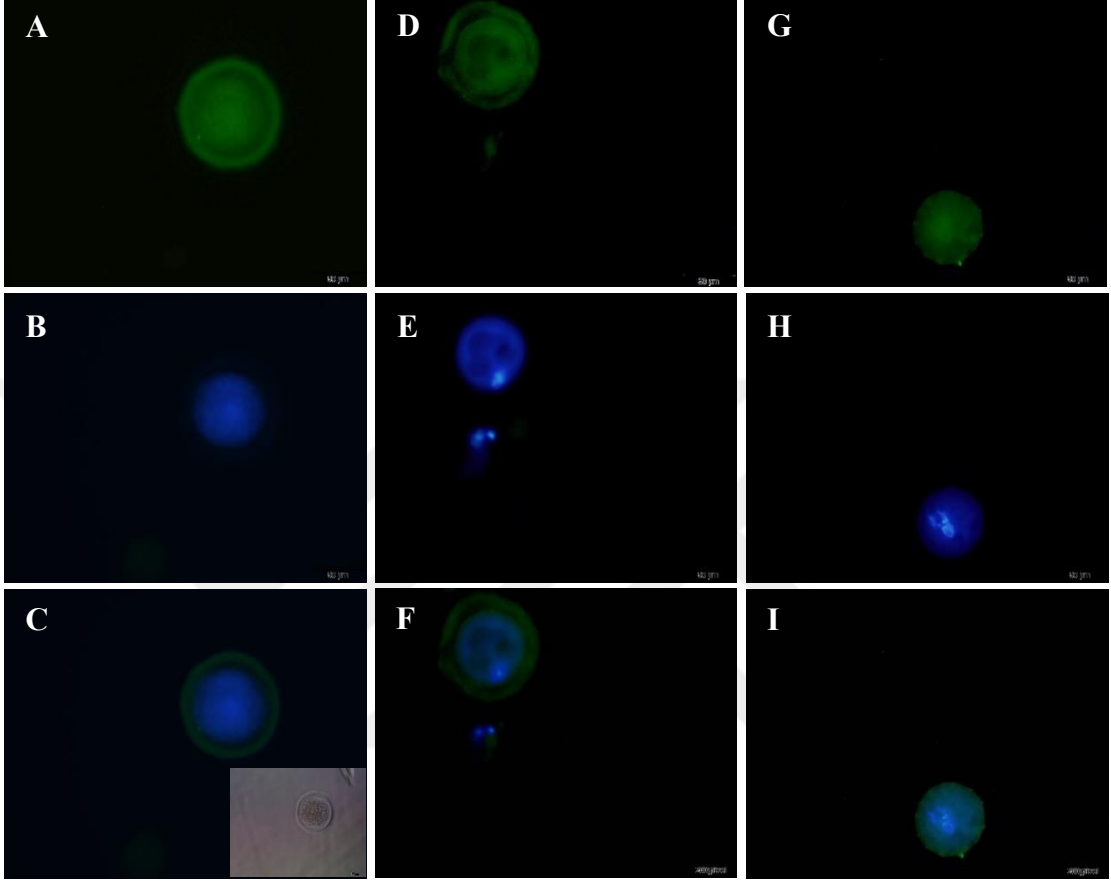
Resim 30: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında MPF immunoreaktivitesi. Ölçek: 200  $\mu$ m.

## TR-MPF

24

36

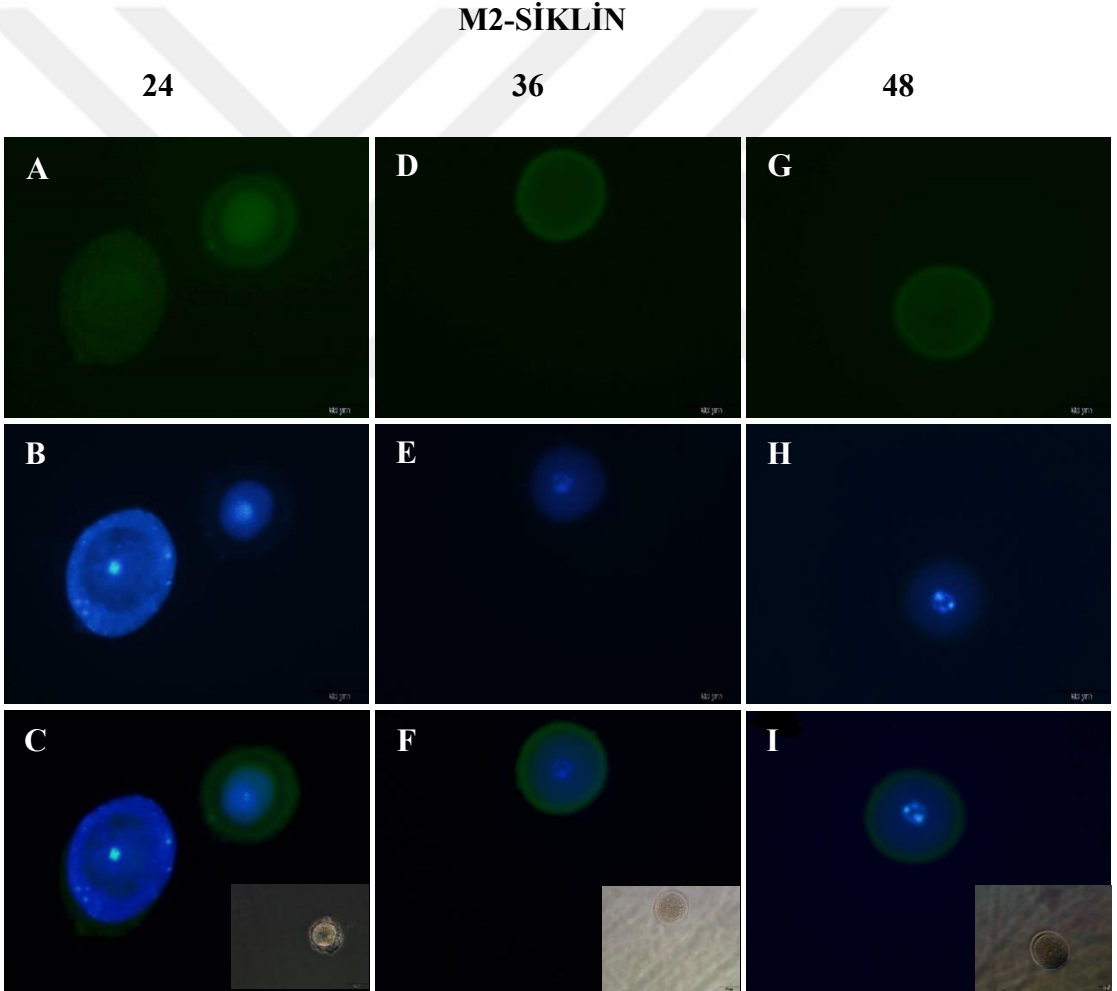
48



Resim 31: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında MPF immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

### 6.3.6. SiklinB-1 İmmünoreaktivitesi

M2 kültür vasatı ile kültür edilen profaz I, metafaz I ve metafaz II oositlerde siklin B-1 immunoreaktivitesinin zayıf (+) şiddette olduğu saptandı (Resim 32). Trofoblast kültür vasatı ile kültüre edilen profaz I ve metafaz II oositlerde zayıf (+) şiddette benzer siklin B-1 immunoreaktivitesine sahip oldukları gözlenir iken, metafaz I oositlerde siklin B-1 immunoreaktivitesinin orta (++) şiddette olduğu izlendi (Resim 33). Trofoblast kök hücreleri ile ko-kültür sonucunda ise profaz I ve metafaz II oositlerde siklin B-1 immunoreaktivitesinin çok zayıf (+/-) şiddette olduğu, metafaz I oositlerde ise zayıf (+) şiddette pozitifliği belirlendi (Resim 34).



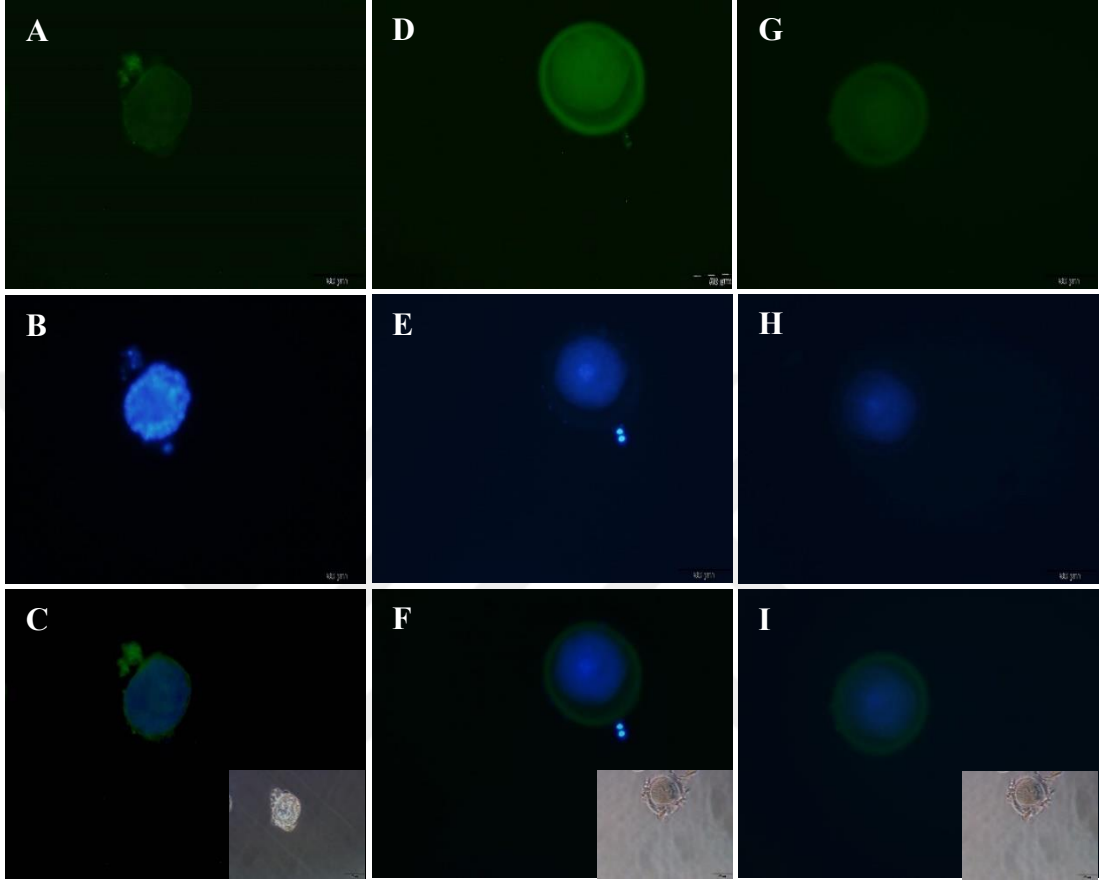
Resim 32: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin M2 kültür vasatı sonrasında Siklin B1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.

## CM-SİKLİN

24

36

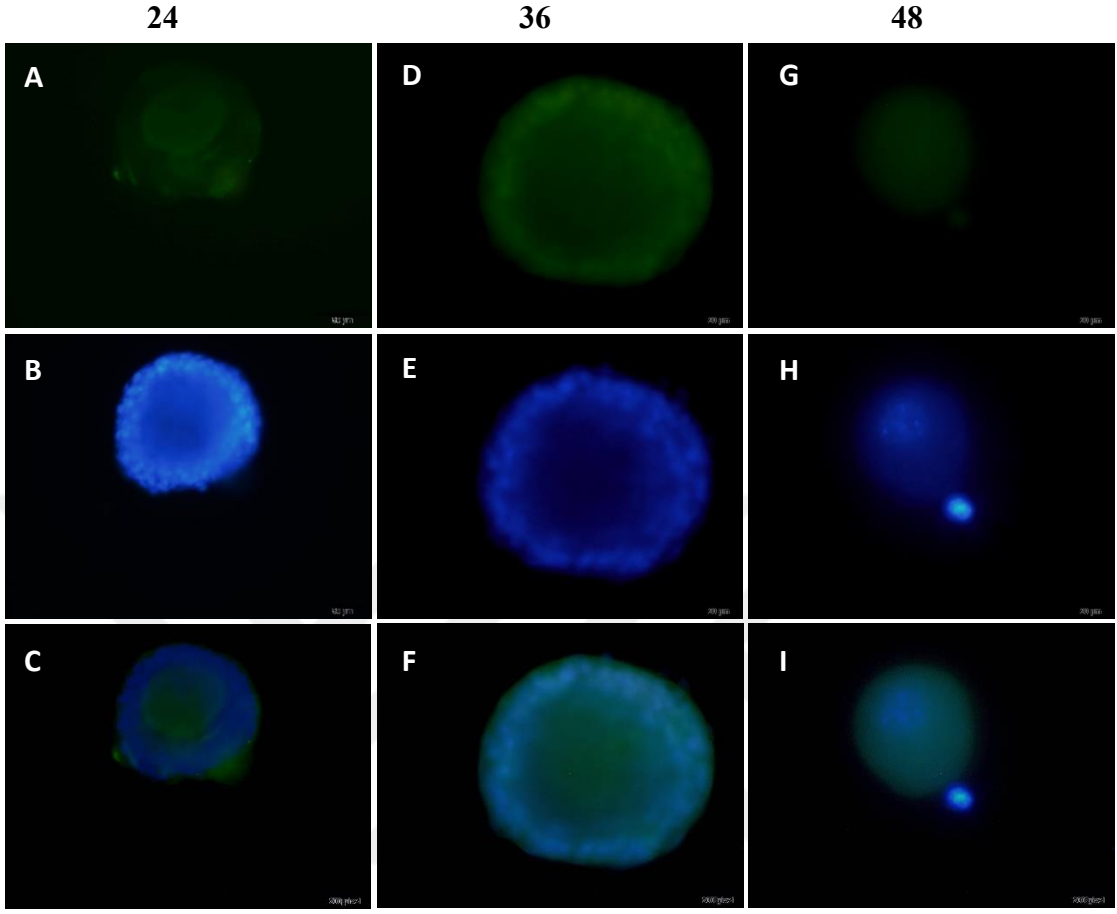
48



Resim 33: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin CM kültür vasatı sonrasında Siklin B1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200 µm.



## TR-SİKLİN



Resim 34: Profaz I (A, B, C), metafaz I (D, E, F) ve metafaz II (G, H, I) oositlerin TR kültür vasatı sonrasında Siklin B1 immunoreaktivitesi. Ölçek: 200  $\mu$ m.

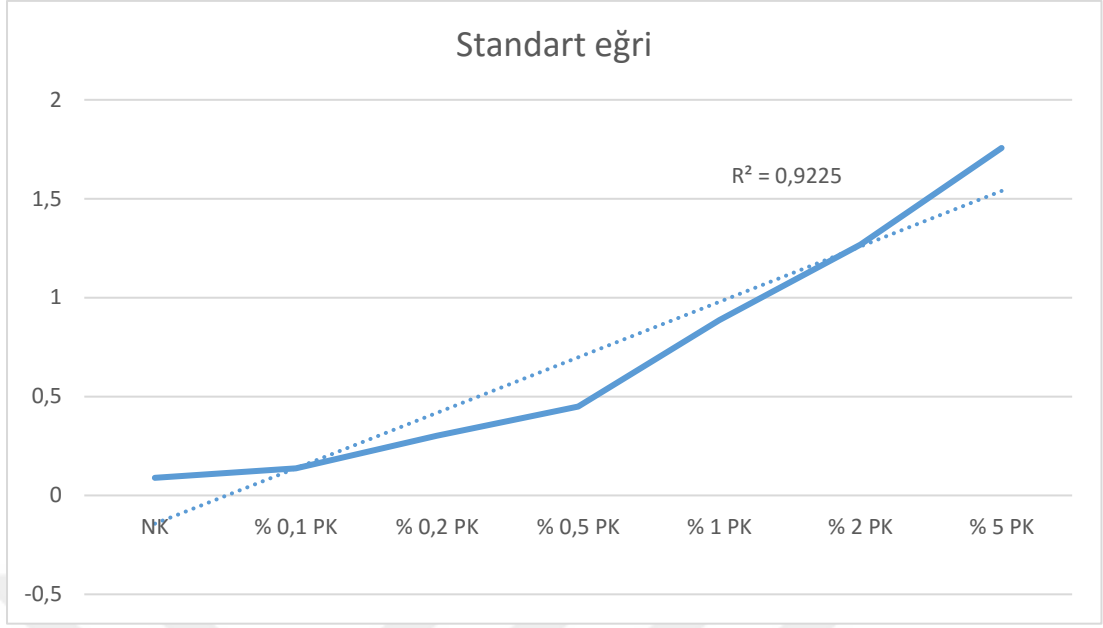
Tablo 5: Deney gruplarına ait immunoreaktivite değerlendirilmesi

	M2			CM			TR		
	24	36	48	24	36	48	24	36	48
APC	+	+	++	+	+	+	+++	++	+
MAD1	+	++	+	+	+	+	+	+	++
MAD2	++	+	++	++	++	++	++	+	+
RAS	++	++	++	+++	++	+	+	+/-	+/-
MPF	+	+	+++	++	++	+++	++	+	+/-
Siklin B1	+	+	+	+	++	+	+/-	+	+/-

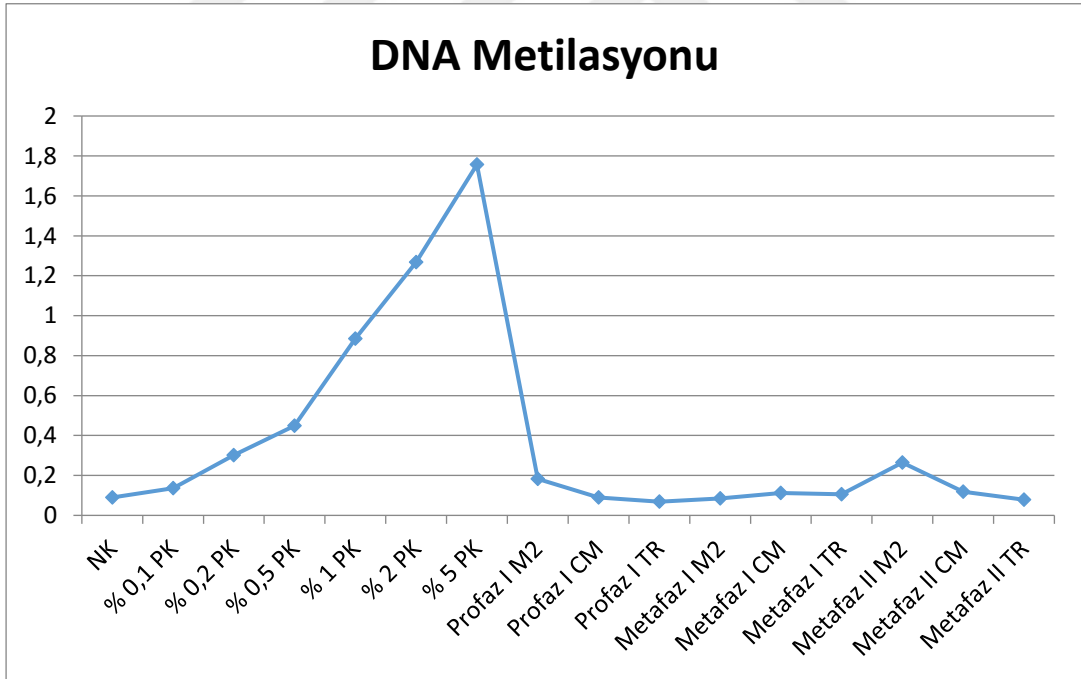
#### 6.4. DNA Metilasyon Analiz Sonuçları

Dna metilasyonu metil grubunun sitozin 5-karbon atomuna DNA metiltransferaz aracılığı ile kovalent bağla bağlanması sonucunda 5-metilsitosin oluşumu ile sonuçlanır. Çalışmada kullanılan kit 5-metilsitozin miktarını kolorimetrik analiz yöntemi ile ortaya koymaktadır.

Çalışmadaki analiz sonucunda negatif kontrol grubunda değer 0 iken, pozitif kontrol grubunda konsantrasyonlara doğru orantılı olarak artış gösterdiği ve en fazla değer % 5 lik grupta olduğu saptandı. Bunun için elde edilen verilerin eğimi hesaplandı ve buna göre grafik oluşturuldu (Şekil 27 ve Şekil 28). Çalışma gruplarında DNA metilasyon değerinin Metafaz II oosit içeren M2, CM ve TR gruplarında olduğu gözlenir iken, profaz I de tüm gruplarda sifıra yakın iken, metafaz I M2 de negatifliğin devam ettiği, metafaz I CM ve TR fruplarında çok az bir artışın olduğu tespit edildi (şekil). Metafaz II M2 grubunda DNA metilasyon oranı tüm diğer gruplara göre en fazla olduğu görüldü (şekil). Metafaz II CM grubundaki DNA metilasyon değeri Metafaz II TR grubuna oranla daha fazla idi (şekil).



Şekil 27: DNA metilasyonunda yer alan negative ve pozitif kontrol değerleri eğim grafiği.



Şekil 28: Deney gruplarında DNA metilasyon değerleri.

## 7. TARTIŞMA

Oosit matürasyonu infertilite kliniklerinde oosit eldesi sonrasında önemli olmanın yanı sıra, PCOS, ovarian yetmezlik gibi in vivo oosit matürasyonunu etkileyen klinik olgular için de önemlidir. İn vitro şartlarda oosit matürasyonu yapılırken kültür vasatlarına rekombinant FSH ve hCG ilavesi gerekmektedir. Bunun yanında hastanın inaktive edilmiş serumu, folliküler sıvıda bulunan büyüme faktörleri, lipidler, glikoproteinler, steroidler ve sitokinler oosit maturasyonunda rol alabilecek olup, sentetik serum ve insan albumin eklenmesine göre daha iyi olabileceği bildirilmiştir. (Çelik, 2013). Bununla beraber hali hazırda farklı kültür vasatları ile oosit matürasyonu için kültürler yapılabilse de henüz kabul edilmiş protokol bulunmamaktadır.

Oosit matürasyonun in vivo şartlara benzerliği açısından tubal faktörlerin bulunduğu kültür ortamları denenmiş ve bir miktar oosit matürasyonu sağlanabilmiştir (Yeşil ve Vatansever, 2013). Kök hücrenin tanımlanmasından sonra klinik kullanım potansiyelleri farklı klinik ve deneysel çalışmalarda denenmektedir. Embriyonik dokudan elde edilen kök hücreler farklılaşma potansiyelleri diğer kök hücre kaynaklarına göre daha fazladır. Plasentada yer alan kök hücrelerin, villöz stromadan köken alan pluripotent kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, hofbauer hücrelerini oluşturduğu düşünülen hematopoetik kök hücreler ve trofoblastik kök hücrelerin (Genbacev O, 2016) in vitro kullanım alanları henüz yeni konulardandır. Trofoblastik hücrelerden köken alan bu kök hücreler intertisyel trofoblastlar, endovasküler trofoblastlar, sitotrofoblastlar ve sinsityotrofoblastlardır. Çalışmada 14 günlük fare embriyo günü Kaufmann'ın fare atlası ile teyit edildikten sonra (Şekil 25) plasenta örneklerinde bu hücrelerin maternal alanda buldukları ve sitokeratin-7 pozitif oldukları saptanması üzerine, bu dönemde elde edilen plasentadan bu hücrelerin tanımı ve eldesi yapılabileceği görüldü. Plasentalar elde edildikten sonra maternal yüzün mekanik ve enzimatik diseksiyonunu takiben trofoblastik kök hücreler elde edilerek kültüre edildi. Kültürün ilk günlerde bu hücrelerin daha az sayıda olduğu, 10-14 günlük kültür sonunda kök hücrelerin konfluent oldukları gözlemlendi. Kültür ortamına FGF4 ilave edilmesi hücrelerin proliferasyonu ve canlılığına olumlu yönde etkiledi.

Trofoblastik kök hücreler konfluent olduktan sonra tripsin-EDTA kullanılarak pasajlama işlemide yapıldı, pasajlama sonrasında hücrelerin canlılıklarına devam ettikleri, fakat kültür kaplarına yapışmadıkları ve çoğalmadıkları gözlemlendi. Pasajlama işleminin birkaç kez tekrarlanması sonucunda hücrelerin hala yapışmadığı gözlenmesi üzerine trofoblastik kök hücrelerin eldesinden sonra konfluent olarak direkt çalışmada kullanılması uygun görüldü. Motomura ve ark, 2016 yaptıkları çalışmada trofoblastik kök hücrelerin pasaj sonrasında yuvarlak olarak kaldıklarını bildirmişlerdir. Konfluent olan hücreler karakterizasyon için literatüre uygun olarak sitokeratin-7 dağılımı bakılmış (Genbacev O, 2016 ve Shahbazi ve ark, 2016) ve oosit ile kültüre başlamadan önce yapılan boyanmalarda tüm hücrelerde pozitif olduğu görülmüştür. Trofoblast hücrelerin pasajlama aşamasındaki sorundan dolayı, proje kapsamında trofoblast hücrelerin konfluent olarak canlılıklarına devam etmeleri ve proliferasyonlarının inhibe edilmeleri amacıyla mitomisin-c kullanılmıştır. (Vatansever ve Uluer, 2013). Mitomisin-c kullanımı sonrasında da trofoblast kök hücrelerinin sitokeratin-7 immunoreaktivitesinin pozitifliğinin devam etmesi nedeni ile, oositler trofoblast kök hücreleri ile birlikte ko-kültürde kullanıldı. Proje kapsamında trofoblastik kök hücre ürünlerinin oosit maturasyonuna etkisini amaçladığımızdan dolayı mitomisin c'ye bağlı bu ürünlerde değişiklikler olabileceği göz önünde bulundurularak, mitomisin-C uygulanmadan önce elde edilen trofoblast kök hücre kültür vasatı da toplanarak oosit kültürü yapılması proje kapsamına dahil edildi.

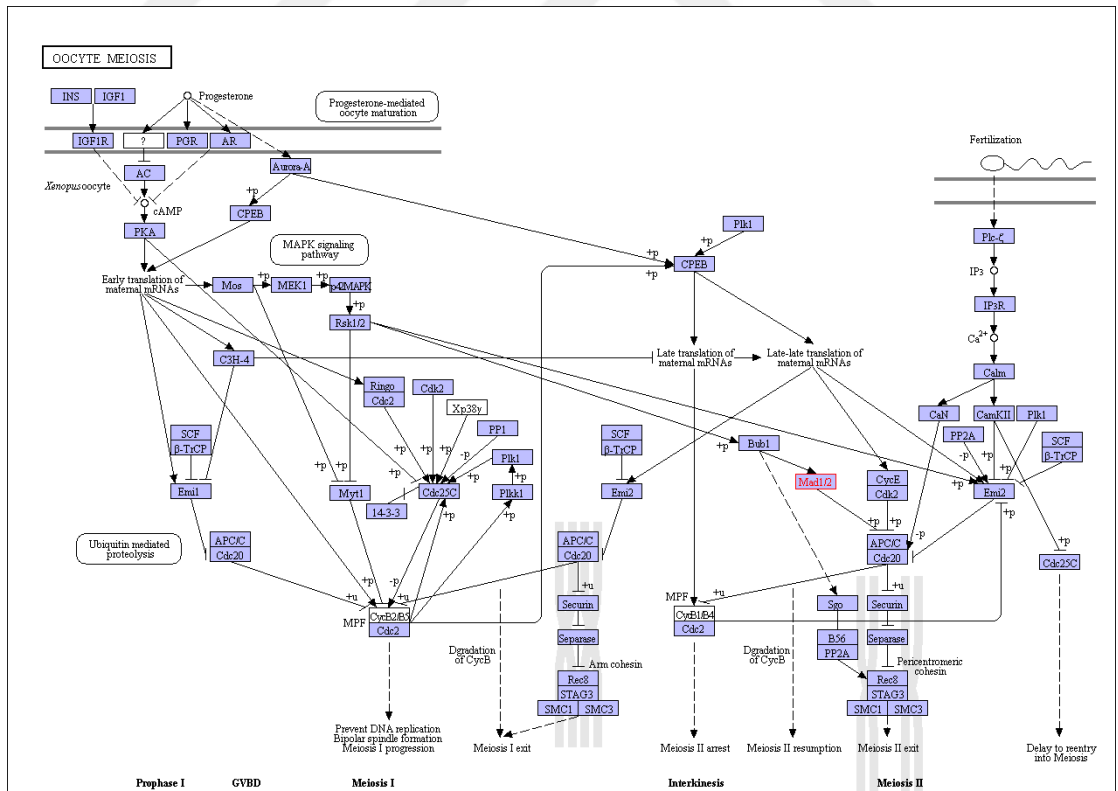
Proje kapsamında hCG uygulaması sonrasındaki 24, 36 ve 48 saatlik dönemlerde ovaryumlar alındı ve 24 saatlik süre sonunda elde edilen oositlerin germinal veziküle sahip olduğu ve birinci polar cisimciğin bulundurmadıkları tespit edildi. Bu özelliklerinden dolayı profaz I oositler oldukları kabul edildi. Aynı şekilde 36 saatlik oositlerde korona radiata ve kumulus hücrelerinde profaz I oositlerine göre daha gevşek olduğu görüldü. Bunun yanında birinci polar cisimcik ve germinal vezikül izlenmemesi üzerine, metafaz I oosit olarak kabul edildi. Son gruptaki 48 saatlik oositlerde birinci polar cisimciğin varlığı tespit edilmekle birlikte germinal vezikül gözlenmedi, zona pellusida kolaylıkla izlendi ve bu grup oositler ise metafaz II olarak kabul edildi.

Oosit maturasyonu intrasitoplazmik ve nükleer olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Nükleer maturasyonun başlaması için; LH tetikleyici bir role sahip olmakla beraber, östrojen ve steroidlere de ihtiyaç vardır. Oosit maturasyonunda ilk gelişen olay germinal vezikül yani hücre çekirdek zarının yıkılmasıdır (GVBD). GVBD, LH'ın uyarıcı etkisi ile başlar ve sonrasında kromozom yoğunlaşması, iğ iplikçikleri oluşumu, homolog kromozomların metafaz plağı üzerine yerleşmesi ile gerçekleşmektedir. Mayoz I'in tamamlanması ile asimetrik sitokinez gerçekleşir ve sekonder oosit ve birinci polar cisimcik oluşur. Mayoz II'nin gerçekleşmesi ile sitoplazmanın az bir bölümünü alan, mitokondriyon, ribozom ve kortikal granüllere sahip ikinci polar cisimcik oluşur (Dinopoulou 2016).

Sitoplazmik maturasyon sırasında ise birinci polar cismin oluşmasıyla perivitellin boşluk genişler, mitokondriyon sayısı artar ve yapısal değişiklikler oluşur. Golgi komplekslerinden kortikal granül salınması ile ooplazma granüller bir hal alır. Oosit gelişimi ile birlikte başlangıçta merkezi bir konumu olan mitokondriyonlar periferde konumlanırlar. Mitokondriyonlar hücre farklılaşması ve proliferasyonunda etkin rol oynamaktadır (Dinopoulou 2016).

Bu süreçte DNA metilasyonunun artışı MPF'nin stabil devamlılığı, Siklin B'nin azalması, kinetokor bölgesindeki MAD1 ve MAD2'nin ekspresyonu ile APC'nin aktivasyonu oositin mayotik süreci fertilizasyon aşamasına kadar tamamlanması sağlandığı gösterilmiştir (Moyle ve ark, 2014) Bu dönemde metafaz I'den fertilizasyon aşamasına kadar ekspresyonu gözlenen Mos MEK üzerinden APC inhibisyonu üzerinden metafaz II arrestini sağlar. MEK aktivasyonunu tetikleyen ise RAS salınımıdır (Balch ve ark, 2006). Bu nedenle oosit maturasyon süreci inhibitor ve aktivatörlerin koordineli çalışması sonucunda gerçekleşir. Bu faktörlerin in vivo koşullar dışında salınımlarının ya da aktivasyonlarının duraksatılması direk oositin maturasyonunu etkiler. Oositin in vitro maturasyonu sırasında hangi mayotik süreçte elde edildiği, ne kadar kültüre edildiği, kültür vasatındaki faktörlerin içeriği ve miktarı maturasyonu ile direkt olarak ilişkilidir. Bu açıdan in vitro maturasyon için kullanılacak faktörlerin önemi ve oositin hangi mayotik süreçte olduğunun tanımlanması ana kriterdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, APC'nin özellikle fare mayotik maturasyonunda önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. APC'nin memeli oosit maturasyonunun G2/profaz arrestinde, G2/M geçişinde, mayoz I ve mayoz II gibi tüm evrelerinde görevlidir. Bu nedenle APC'nin kontrol edilememesi oositte delesyona sebep olmaktadır ve oosit kalitesinde önemli bir belirleyici faktör olup üreme başarısıyla direkt ilişkilidir (Şekil 29) (Homer H, 2013). Çalışmamızda APC immunoreaktivitesinin M2 kültür vasatında en fazla 48 saatte gözleendiği, trofoblast kök hücre kültür vasatı ile yapılan inkübasyonda tüm oositlerde benzer olduğu, fakat en az immnureaktivitenin gözlenmesi üzerine M2 kültür vasatının trofoblastik kök hücre kültür vasatına oranla APC salınımı için daha iyi olduğu sonucuna varıldı. APC immunoreaktivitesinin özellikle Profaz I ve Metafaz I oositlerde diğer kültür ortamlarına oranla artış sağlaması üzerine, erken dönemde APC immunoreaktivitsinin artışı sağlıyor olması, oosit matürasyonu açısından trofoblastik kök hücrelerin kullanılabileceğini düşündürdü.



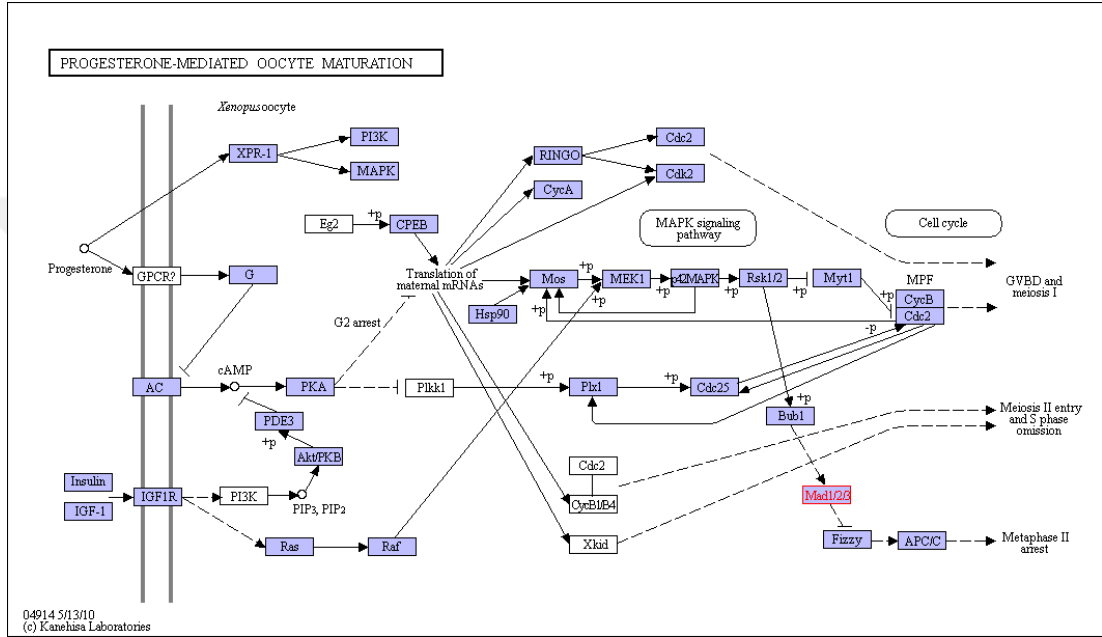
Şekil 29: [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ko04114+K06679](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04114+K06679) erişim tarihi: 20.07.2016.

Fare oositinde mayoz I safhasında doğru kromozom ayrılması için MAD2 gereklidir. Ayrıca MAD2'nin fazla ekspresyonu mayoz I safhasında kromozom ayrılmasını engellemektedir. Aynı zamanda MAD2, APC'yi inaktive eder. Böylelikle metafaz II arresti sağlamış olur (Şekil 29) (Tunquist 2003). Bununla beraber kinetokor bölgesinde MAD1 ile birlikte bulunarak kromozom ayrılmasında da rol oynar. Çalışmamızda MAD1 immünoaktivitesinin özellikle M2 kültür vasatında Metafaz I oositte TR grubunda metafaz II oositte orta şiddette (++) gözlenmiş diğer oositlerde ise zayıf (+) olarak saptanmıştır. Özellikle trofoblast kök hücre ko-kültürü sonrasında MAD1'in geç salındığı sonucuna varılmıştır. MAD2 immünoaktivitesi ise M2 kültür vasatı ve TR vasatı Metafaz I ve Metafaz II oositlerinde zayıf şiddette iken diğer oositlerde orta şiddette immünoaktivitesi gözlenmesi üzerine metafaz II oositte beklenen MAD2 aktivasyonunun M2 ve CM grubunda olduğu saptandı. TR grubunda Metafaz II oositte MAD2 immünoaktivitesinin diğer kültürdeki metafaz II oositlere oranla daha az olmasının sebebi bu kültür ortamında gecikmiş MAD1 ekspresyonu olabileceği düşünüldü. CM kültür vasatında ise MAD2 ekspresyonunun MAD1'e oranla daha iyi olduğu ve bu da oosit maturasyonu için uygun bir ortam olduğunu düşündürdü. MEK sinyal yolağı üzerinden etki eden RAS, APC inhibisyonu ile metafaz II arrestinde desteklik sağlar. RAS immünoaktivitesi sonucunda en az immünoaktivitenin TR grubunda olduğu en fazla immünoaktivitenin ise CM profaz I oositlerde olduğu gözlemlendi. Belirli bir düzeydeki RAS immünoaktivitesinin M2 ve CM grubunda APC immünoaktivitesi ile uyumlu olmasından dolayı M2 ve CM kültür vasatlarının TR kültür vasatına oranla RAS ekspresyonunu destekledikleri düşünüldü (Şekil 30).

MPF tüm mayotik süreçte siklin B ile birlikte en önemli kontrol faktörlerindedir. İmmatür oositte siklin B az miktarda iken metafaz I sonunda en yüksek seviyeye çıkar ve birinci polar cismin atılması için siklin B degradasyonuna ihtiyaç vardır. (Jones, 2004, Marangos, 2004) MPF çekirdeğin dağılmasından kromozomların kondensasyonundan ve iğ iplikçiklerin organizasyonundan sorumludur. GVBD evresindeki oositte itibaren giderek artan miktardaki MPF düzeyi Metafaz I sonunda hızla degrade olarak birinci polar cisimciğin atılımını sağlar. Mayoz II başlangıcından metafaz II'ye kadar stabil seviyede kalarak mayotik arresti kontrol eder. MPF immünoaktivitesi M2 ve CM kültür vasatındaki metafaz II oositlerde en fazla



gözlenir iken TR grubunda MPF immünoreaktivitesinin daha az olduğu tespit edildi. CM grubunda profaz I ve metafaz I oositlerde de orta şiddette MPF gözlenmesine rağmen esas artmış immünoreaktivitenin metafaz II’de gözlenmesi beklenen bir sonuç olarak değerlendirildi. Siklin B1 immünoreaktivitesi ise sadece CM grubunda Metafaz I oositte diğerlerine göre daha fazla olduğu gözlemlendi fakat siklin B1 immünoreaktivitesinin MPF ekspresyonu ile uyumlu olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 30: [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ko04114+K06679](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04114+K06679), erişim tarihi: 20.07.2016.

DNA metilasyonu oosit mayotik sürecinde gelişen follikül ile birlikte orantılı olarak artar. Özellikle puberte dönemindeki hemen hemen tüm evrelerdeki oositlerde DNA metilasyonu en üst seviyededir. Spermatogenezden farklı olarak oogenezde DNA metilasyonunun doğumdan sonra gözlenmesi oogenezin doğumdan sonra devam etmesinden dolayıdır. Çalışmamızda DNA metilasyon değeri M2 ortamında kültüre edilen Metafaz II oositlerde en fazla olduğu metafaz I ve II CM grubunda da DNA metilasyonunun M2 metafaz II oositteki kadar olmasada diğer oositlere nazaran daha fazla olduğu saptandı. DNA metilasyonun ve oosit maturasyonunu kontrol eden faktörlerin en fazla CM grubunda gözlenmesi üzerine oosit maturasyonu için CM kültür ortamının in vitro oosit kültüründe kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Trofoblast kök hücrelerinden transkripsiyon (Tead4, Cdx2, Eomes, Elf5, Sox2, FoxD3, Ets2, Esrrb )faktörleri yanısıra, büyüme faktörlerinden FGF (FGF4, FGFR2 ERK2, FRS2, PTPN11) ve TGF (Nodal) ailesi üyelerinde salgılandığı bilinmektedir (Tablo 1) (Can, 2014). Özellikle FGF ve TGF ailesi üyelerinin hem embriyonik hem de erişkin dönemde birçok moleküler mekanizmayı kontrol ettiği bilinmektedir (Knight ve Glister, 2006). Bunun yanı sıra oosit maturasyonu sırasında parakrin ve otokrin sinyal yolları içerisinde aktivin, FGF ve BMP ailesi üyeleride yer almaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda trofoblastik kültür vasatının oositten bu faktörlerin salınımını tetikleyerek maturasyonu desteklemiş olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak trofoblastik kök hücreleri plasentadan elde edilerek kültür ortamında üretilmeleri protokolü bu çalışma sonucunda oluşturulmuştur. Özellikle bu hücrelerin taze olarak ve pasajlanmadan kullanılma gerekliliği bir dezavantaj olarak görülebilir. Fakat bu hücrelerden salgılanan önemli faktörlerin olmasından dolayı sadece oosit kültürü için değil diğer çalışmalar içinde kullanılabileceği düşünüldü. Bunun yanı sıra hücre varlığından ziyade kültür vasatının kullanıldığı örneklerde oosit maturasyonunu kontrol eden faktörlerin daha fazla ekspresyonlarının gözlenmesi bir avantaj olarak düşünüldü. İster oosit kültüründe olsun ister diğer kültür amaçlı olsun hücre olmadan kültür vasatının kullanımının olması hücre-hücre kontaminasyonunun önlenmesi açısından avantaj olduğu sonucuna varıldı. Oosit maturasyon süreci çalışmada 48 saat inkübasyon sonucunda değerlendirildi. Bu değerlendirme sırasında oositlerin hücresel değişiklikleri sadece inkübasyon başlangıcı ve sonunda değerlendirilebildiğinden oositlerin 48 saat inkübasyon sürecinde ne gibi hücresel değişiklikler gösterdiği tam zamanlı görüntüleme sistemi olmamasından dolayı ayrıntılandırılmamıştır. Ayrıca DNA metilasyonu için elde edilen DNA miktarları oosit eldesi zorluğundan dolayı az miktarda olabilmektedir. Bu analiz için her bir örnek kitle belirtildiği gibi iki defa yapılmış ve ortalama değerleri verilmiştir. DNA miktarının az olmasından dolayı ortaya çıkan değerler az gibi görünsede tüm örneklerden aynı miktarda DNA kullanıldığından dolayı değerlerin karşılaştırılmasının güvenilir olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen oositlerin kültürleri sonrasında M2 ve CM kültür ortamlarının farklı evrelerde toplanan oositlerdeki maturasyonu düzenleyici faktörlerin in vivo

ortamdakine benzer şekilde RAS, MPF ve MAD2 ekspresyonlarındaki artışa, APC ve siklin B1 ekspresyonundaki azalmaya sebep olmasından ve bununda oosit maturasyonunu desteklemesinden dolayı in vitro oosit maturasyonu kültürü açısından CM kültür vasatının yeni bir ortam olabileceği sonucuna varıldı.

Çalışma oosit maturasyonu analizinin hem moleküler hem de DNA metilasyon oranı karşılaştırılarak yapıldığından farklı kültür ortamlarının bu değişkenler üzerine olan etkisini değerlendirmiştir. Özellikle CM kültür vasatının içeriğinin analiz edilerek oosit maturasyonunu destekleyici hangi faktörleri içerdiğinin ayrıntılandırılması, oosit maturasyonu için yeni kültür vasatları geliştirilmesi açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır.



## 8. KAYNAKLAR

Balch E.W, Der J.C ve Hall A. Methods in Enzymology, Regulators and effectors of Small GTPases: Ras Family. Academic Press, sayfa: 224-235, 2006.

Can A, Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. Akademisyen tıp kitabevi, 2014.

Çelik Ö. Yardımcı üreme teknikleri temel klinik ve embriyolojik uygulamalar. İçinde; Kadın iç genital organları Nobel kitabevi,2013

Delilbaşı L. İn vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri, yeni uygulamalar ve güncel yaklaşımlar. Güneş tıp kitapçevleri. 2008, S:

Dinopoulou V. ve ark. Effect of recombinant-LH and hCG in the absence of FSH on in vitro maturation (IVM) fertilization and early embryonic development of mouse germinal vesicle (GV)-stage oocytes. Reproduction biology. 138-46. 2016

Genbacev O, Larocque N, Ona K, Prakobphol A, Gomez-Garrido T, Kapidzic M, Barcena A, Gormley M ve Fisher S.J. Integrin  $\alpha$ 4-positive human trophoblast progenitors: functional characterization and transcriptional regulation. Human reproduction, 2016.

Ghofrani M. Nontumor normal histology, PathologyOutlines.com. 2014.

Gosden R. ve Lee B, Portrait of an oocyte: our obscure origin. The Journal of Clinical Investigation. 2010.

Homer A.H. Mad2 and spindle assembly checkpoint function during meiosis I in mammalian oocytes. Histology and Histopathology. 2006.

[https://www.google.com.tr/search?q=female+reproductive+system+internal+organs&biw=1164&bih=523&source=lnms&tbnm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjkv5iaiZPOAhXiKMAKHfuAD48Q\\_AUIBigB#imgrc=gclJiEvKB4oFCM%3A](https://www.google.com.tr/search?q=female+reproductive+system+internal+organs&biw=1164&bih=523&source=lnms&tbnm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjkv5iaiZPOAhXiKMAKHfuAD48Q_AUIBigB#imgrc=gclJiEvKB4oFCM%3A), erişim tarihi: 27.07.2016.

<https://global.britannica.com/science/fallopian-tube>, erişim tarihi: 24.07.2016.

<http://slideplayer.com/slide/6364127/>, Erişim tarihi: 24.07.2016.

[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Vulvar+Vestibulitis&lang=4](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Vulvar+Vestibulitis&lang=4), erişim tarihi: 24.07.2016.

[https://classconnection.s3.amazonaws.com/179/flashcards/3995179/png/flashcard\\_download-14616F1F2AF65D0A951.png](https://classconnection.s3.amazonaws.com/179/flashcards/3995179/png/flashcard_download-14616F1F2AF65D0A951.png). Erişim tarihi: 10.08.2016.

<https://classconnection.s3.amazonaws.com/245/flashcards/2198245/jpg/oocyte1366496131622.jpg>, erişim tarihi: 10.08.2016

[https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/2011\\_Group\\_2\\_Project](https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/2011_Group_2_Project),  
*Erişim tarihi: 10.08.2016.*

<http://www.dicle.edu.tr/Contents/12069335-f1a7-4ece-8125-41d2885f9944.pdf>,  
erişim tarihi: 01.08.2016.

<https://www.studyblue.com/notes/note/n/block-1/deck/4611742>, Erişim tarihi: 10.08.2016.

[http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202007/chapter\\_22%20Fall%202007.htm](http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202007/chapter_22%20Fall%202007.htm). Erişim tarihi: 16.08.2016.

[https://www.researchgate.net/figure/263760816\\_fig1\\_Fig-1-Schematic-diagram-of-oocyte-maturation-in-Xenopus-The-figure-shows-the-changes](https://www.researchgate.net/figure/263760816_fig1_Fig-1-Schematic-diagram-of-oocyte-maturation-in-Xenopus-The-figure-shows-the-changes). *Erişim tarihi: 14.08.2016*

[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Placenta\\_Development](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Placenta_Development),  
erişim tarihi: 29.07.2016.

<http://docplayer.biz.tr/1505083-Kok-hucrerler-doc-dr-engin-deveci.html>. Erişim tarihi: 15.08.2016.

[http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ko04114+K06679](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04114+K06679) erişim tarihi: 20.07.2016.

[http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ko04114+K06679](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04114+K06679), erişim tarihi: 20.07.2016

[http://www.murattosun.com/faculty/Genel%20Embriyoloji%20\(2013\)%20Total.pdf](http://www.murattosun.com/faculty/Genel%20Embriyoloji%20(2013)%20Total.pdf) , Erişim tarihi: 10.08.2016.

Igura K1, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. Cytotherapy. 2004.

Jones E. R. Ve Lopez H. K. Human reproductive biology, 4. Baskı, Academic press, 2013, s: 23-50.

Jones T. K. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. Molecular human reproduction. 2004.

Jones T. K, Lane R.I.S. Molecular causes of aneuploidy in mammalian eggs. Development. 140: 3719-3730. 2013

Kaufman M.H, The atlas of mouse development, Elsevier Academic Press, 1994.

Kierszenbaum L. A. Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. Çeviren: Ramazan Demir. Palme yayıncılık, Ankara, 2006, s: 565-584.

Knight G.P ve Glister C. TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. Society for Reproduction and Fertility. 2006.

Kornbluth S. ve Fissore R. Vertebrate reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7:a006064

Kretser de D, *Molecular biology of the male reproductive system*. Academic press, 2012, s:158-169.

Marangos P. ve Carroll J. The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Society for reproduction and fertility*, 2004.

Monniaux D., Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog:Lessons from genetic models, *Theriogenology*, Volume 86, Issue 1, 1 July 2016, Pages 41–53

Moyle W.M, Kim T, Hattersley N, Espeut J, Cheerambathur K.D, Oegema K, ve Desai A. A Bub1–Mad1 interaction targets the Mad1–Mad2 complex to unattached kinetochores to initiate the spindle checkpoint. *J. Cell Biol.* Vol. 204, 2014.

Motomura ve ark. Cellular Dynamics of Mouse Trophoblast Stem Cells: Identification of a Persistent Stem Cell Type. *BOR Papers in Press*. 2016

Niault T, Hached K, Sotillo R, Sorger K. P, Maro B, Benezra R ve Wassmann K. Changing MAD2 Levels Affects Chromosome Segregation and Spindle Assembly Checkpoint Control in Female Mouse Meiosis I. *Plos one*. 2007.

Pesin A. J ve Orr-Weaver L.T. Regulation of APC/C Activators in Mitosis and Meiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 475-499, 2008.

Plant M. T, Zeleznik J. A, Albertini F. D, Herbison E. A, McCarthy M. M, Muglia J. L ve Richards S. J. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 4. Baskı, Academic press elsevier, 2015, s: 59-97

Roberts M. R. ve Fisher J. S. Trophoblast Stem Cells. *Biology of reproduction*. 412-421, 2011

Ross H. M. ve Pawlina W. Histoloji konu anlatımı ve atlas ilişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji ile. Çeviren: Barış Baykal. 6. Baskı, Palme yayıncılık, Ankara 2016, s: 830-896.

Sadler T. W. Langman's medikal embriyoloji. 11. Baskı, Palme yayıncılık, 2011, s:33-43.

Shahbazi N.M. ve ark. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. Nature Cell Biology. 2016

Smallwood A. S. ve Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. Trends in genetics. p33–42, January 2012

Thomson J.A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S.S, Waknitz M.A, Swiergiel J.J, Marshall V.S, Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998.

Tunquist J.B, Eyers A.P, Chen G.L, Lewellyn L.A, ve Maller L.J. Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytostatic factor mediated metaphase arrest. The Journal of Cell Biology. 2003.

Vatansever H.S, Uluer T.E, Aydede H. ve Ozbilgin M.K. Analysis of transferred keratinocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells on experimental surgical skin wounds of mouse. Acta Histochemica, 2013.

Yeşil H. Oosit Maturasyonunda ve Arrestinde Tubal Sıvı Kültür Ortamının Yeri, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2013 Manisa (Danışman Prof. Dr. H. Seda Vatnsever).

Zhang J, Li T, Ji W, Yu y ve Tan T. Rho GDIalpha Modulates Rabbit Trophoblast Stem Cell Survival and Migration. The Society for the Study of Reproduction. 2015.



## 9. ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	<b>Hilal</b>	<b>Soyadı</b>	<b>KABADAYI</b>
<b>Doğum Yeri</b>	<b>Alaca-Çorum</b>	<b>Doğum tarihi</b>	<b>23.08.1990</b>
<b>Uyruğu</b>	<b>TC</b>	<b>Tel</b>	<b>05385857594</b>
<b>E-mail</b>	<a href="mailto:kabadavihilal@gmail.com">kabadavihilal@gmail.com</a>		
<b>Eğitim düzeyi</b>			
	<b>Mezun olduğu kurumun adı</b>	<b>Mezuniyet yılı</b>	
<b>Doktora</b>			
<b>Yüksek lisans</b>	<b>Celal Bayar Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı</b>	<b>2016</b>	
<b>Lisans</b>	<b>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi</b>	<b>2012</b>	
<b>Lise</b>	<b>Çorum Eti Anadolu Lisesi</b>	<b>2007</b>	
<b>Yabancı dilleri</b>	<b>Okuduğunu anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
<b>İngilizce</b>	<b>Çok iyi</b>	<b>Çok iyi</b>	<b>Çok iyi</b>
<b>Yabancı dil sınav notu</b>			
<b>YDS : 78</b>			
	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>Ales Puanı</b>	<b>77,95</b>		
<b>Bilgisayar Bilgisi</b>			
<b>Program</b>		<b>Kullanma Becerisi</b>	
<b>MS Office</b>		<b>İyi</b>	