

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

**MENOPOZAL İNSAN OVER YÜZEY EPİTELİNDEKİ EMBRİYONİK KÖK  
HÜCRELERİN OOSİT BENZERİ VE BLASTOSİST BENZERİ HÜCRELERE  
FARKLILAŞMASINDA  
PTEN-PI3K-AKT-FOXO3 SİNYAL YOLAĞININ ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tuna ÖNAL**

DANIŞMAN

**Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN**

**MANİSA-2013**

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez projemi destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Tezimin ortaya çıkmasında ve gerçekleşmesinde yardımını esirgemeyen, bana her zaman yol gösteren, her daim sabır ve anlayışla destek olan, manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen çok değerli Danışman Hocam Prof Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her daim, bilgi ve deneyimlerini en verimli şekilde aktaran ve her konuda yardımcı olan, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Hocam Prof. Dr. Sevinç İNAN'a,

Bilimsel desteğini ve yardımını her zaman yanımda hissettiğim, Sayın Hocam Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman manevi desteğini yanımda hissettiğim, Enstitü Müdürümüz Sayın Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yardımını benden esirgeyeyen Çok Değerli Asistan Arkadaşım Mahmud Mustafa Özkut'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım doktora ve yüksek lisans öğrencisi Asistan Arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgeyeyen canımdan çok sevdiğim ANNEM'e, BABAM'a, ABLAM'a ve Eniştem ÖZGÜR ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör.  
Tuna ÖNAL

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada Postmenopozal kadınlarından alınan overlerin over yüzey epitelinden embriyonik benzeri kök hücrelerin elde edilmesi ve oosit benzeri hücrelere farklılaştırılması planlandı ve üç haftada farklılaşması beklenen hücrelerin birinci hafta, ikinci hafta ve üçüncü hafta sonlarında alınan örneklerden kök hücre belirteçleri ve bu dönemde PTEN-PI3K-AKT-FOXO3A sinyal yolağında oluşan değişikliklerin incelenmesi amaçlandı.

**Materyal ve Metod:** Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü ile Merkez Efendi Devlet Hastanesi Doğumevi Kliniğine çeşitli jinekolojik hastalıklar nedeni başvuran ve opere olan, etik onam formunu imzalayan, postmenopozal kadın hastalardan toplanan over doku örnekleri ve over doku örneklerinden elde edilen OYE hücre kültürleri birinci hafta, ikinci hafta ve üçüncü hafta örnekler alınarak rutin histokimyasal ve anti- OCT-4, anti-SSEA-4, anti-C-KİT, anti-VASA, anti- anti-ZP-4, anti-CK-18, anti-PTEN, anti-PI3K, anti-pAKT1/2/3, anti-FOXO3 primer antikoları kullanılarak avidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile indirekt immünohistokimyasal boyamalar uygulandı.

**Bulgular:** Over doku örneklerinin, Hematoksilen- Eozin ile boyanmış preparatlarında, postmenopozal kadınlardan alınmış olması nedeni ile primordial veya gelişmekte olan folliküller yapılar gözlenmedi. Tek katlı kübik epitel olarak over yüzey epiteli gözlemlendi. İmmünohistokimyasal incelemelerde doku örneklerindeki OYE hücreleri arasında bulunan OCT-4, SSEA-4, C-KİT, eksprese eden kök hücrelerin olduğu gözlemlendi ve kortikal bölgede OCT-4 ve SSEA-4'te boyanma gözlenmezken, C-KİT, PTEN, PI3K, AKT, FOXO3A'da gözlemlendi. CK-18'de epitelde boyanma gözlemlendi. ZP-4, kök hücrelerin ve epitel hücrelerinin eksprese ettiği gözlemlendi. VASA'da tüm dokularda yaygın olarak eksprese edildiği gözlemlendi. Hücre kültürü örneklerinde OCT-4, SSEA-4 ikinci gün ve birinci hafta örneklerinde boyanırken, VASA ve C-KİT ikinci haftada, ZP-4 üçüncü haftada ve CK-18'in tüm haftalarda boyandığı gözlemlendi.

**Sonuç:** Alınan yüzey epitel hücreleri üçüncü haftada “oosit benzeri” ve “blastosist benzeri” hücrelere dönüştükleri tespit edildi. Postmenopozlu kadınların overlerinde folliküller yapılar bulunmamasına rağmen yüzey epitel hücreleri arasında kök hücrelerin varlığı ilginç bulundu. Bu hücrelerden oosit benzeri hücrelerin gelişebileceği gösterildi. OYE hücreleri arasında bulunan kök hücrelerin, oosit ve/veya blastosist benzeri hücreye dönüşmesindeki sırasında PTEN-PI3K-AKT-FOXO3A yolağının aktif fonksiyon gösterdiği tespit edildi. OYE içerisinde bulunan kök hücrelerin varlığı ve oositlere dönüşebilme yeteneği, bu hücrelerin over yetmezliği vakalarında kullanılmasına olanak sağlayabileceği ve ayrıca OYE’den elde edilen kök hücrelerin veya embriyoların değişiklik dokulara farklılaştırılmasının, rejeneratif tıpta da yeni ufuklar açabileceği düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Over yüzey epiteli, menopoz, OCT-4 , SSEA-4, C-KİT, VASA, CK-18, ZP4, PTEN, PI3K, AKT, Foxo3A

## SUMMARY

**Aim:** In this study, it was aimed to obtain embryonic-like stem cells from the ovarian surface epithelium (OSE) which was taken from the postmenopausal women and planned to differentiate into oocyte-like cells and - from the samples taken at the end of the first, second and third week, stem cell markers and during this period, the changes comprised in the PTEN-PI3K-AKT-FOXO3A signal pathway were intended to be analysed.

**Material and Method:** The study, ovary tissue samples harvested from the postmenopausal women who signed the ethic consent form and applied to the Celal Bayar University Department of Obstetrics and Gynaecology and Merkez Efendi State Hospital Maternity Clinic due to some gynaecologic diseases also operated and OSE cell cultures obtained from the over tissue cells by getting samples in the first week, second week and third week and by applying indirect immunohistochemistry staining and the method of biotin peroxidase method using the routin histochemistry and anti-OCT-4, anti-SSEA-4, anti-C-KIT, anti-VASA, anti- anti-ZP-4, anti-CK-18, anti-PTEN, anti-PI3K, anti-pAKT, anti-FOXO3 were stained.

**Results:** In the stained preparates of over tissue samples stained by Hematoxilen- Eosin, primordial or developing follicular structures weren't observed due to taken by postmenopausal women. OSE was observed as a simple cuboidal epithelium. In the immunohistochemistry observations, it was observed that OCT-4, SSEA-4, C-KIT found between OSE cells in the tissue samples, stem cells which were exhaled and while in the cortical area in the OCT-4 and SSEA-4, staining wasn't observed, it was observed in C-KIT, PTEN, PI3K, AKT, FOXO3A. In CK-18, it was observed in the epithelium. The expression of ZP-4 stem cells and epithelium cells was observed. In VASA, in all tissues, the expression was widely observed and it was evaluated by artefact. In the cell culture samples, while OCT-4, SSEA-4 stained in the second day and in the first week sample, VASA and C-KIT were in the second week, ZP-4 was in the third week and CK-18 was stained during all weeks.

**Conclusion:** It was identified that in the third week, the gotten OSE cells turned into oocyte-like and blastocyst-like cells. Although the follicular structures weren't found in the ovaries of postmenopausal women, the existence of stem cells between OSE cells found interesting. From these cells, the possibility of development of oocyte-like cells has been showed. It was identified that while the stem cells between the OSE cells were changing into oocyte and /or blastocyst-like cells, the PTEN-PI3K-AKT-FOXO3A pathway showed active function. The existence of stem cells in the OSE and the ability to transform into oocyte. These cells can be used in the cases of ovary deficiency and also the differentiation of the stem cells got from OSE or embryos into different tissues can expand the horizon in the regenerative medicine.

**Keywords:** Ovarian surface epithelium, menopause, OCT-4, SSEA-4, C-KIT, VASA, CK-18, ZP4, PTEN, PI3K, AKT, FOXO3A

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
ÖZET .....	ii
İNGİLİZCE ÖZET .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
RESİMLER DİZİNİ .....	xiii
ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Overin Genel Yapısı .....	5
2.2. Gonad Gelişimi .....	7
2.3. Over Gelişimi ve Embriyolojisi Overin Genel Yapısı .....	8
2.4. Over'in Histolojisi .....	9
2.5. Germ Hücrelerinin Kökeni .....	10
2.6. Tunika Albuginea, Yüzey Epiteli ve İnsan Over Korteksinden Elde Edilen Epitel Yapısı .....	12
2.7. İn Vitro Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm .....	13
2.8. Over Yüzey Epiteli Tarihçesi .....	13
2.9. Over Yüzey Epitelinin Embriyonik Gelişimi .....	15
2.10. Over Yüzey Epiteli .....	17
2.11. Over Yüzey Epitelindeki Germ Hücrelerinin Tespit Edilmesi .....	19
2.12. Germinal Epitelin Rejeneratif Bir Tabakası Olarak Over Yüzey Epiteli .....	19
2.13. Erişkin Over Yüzey Epiteli .....	20
2.13.1. Yapısı .....	20

2.13.2. Fonksiyonu .....	22
2.14. Postmenopozal Kadınlarda Over Yüzey Epiteli ve Kök Hücre .....	24
2.15. Over Yüzey Epiteli Kök Hücresi .....	25
2.15.1. Erişkin ve Fetal İnsan Overlerindeki Over Yüzey Epiteli Kök Hücreleri... ..	25
2.15.2. Putativ Kök Hücre .....	26
2.15.3. Çok Küçük Embriyonik Benzeri Kök Hücreler (ÇKEBKH) .....	27
2.15.3.1. Memeli Gonadlarında ÇKEBKH'lerin Lokalizasyonu .....	29
2.15.3.2. Erişkin Over Dokusundaki ÇKEBKH'ler .....	30
2.15.3.3. Gametogenez Sırasında ÇKEBKH'lerin Rolü .....	30
2.15.3.4. Postnatal Oogenez .....	31
2.16. Over Yüzey Epitelinden Eksprese Olan ve Farklılaşmada Rol Alan Belirteçler33	
2.16.1. OCT-4.....	33
2.16.2. SSEA-4.....	34
2.16.3. VASA .....	35
2.16.4. C-KİT .....	35
2.16.5. CK-18 .....	37
2.16.6. ZP-4 .....	38
2.16.7. PTEN .....	38
2.16.8. PI3K.....	40
2.16.9. AKT .....	42
2.16.10. FOXO3A .....	43
<b>3. MATERYAL METOD .....</b>	<b>44</b>
3.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi .....	44
3.2. Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü .....	46
3.3. İndirekt İmmünohistokimya Protokolü .....	47



3.4. Over Yüzey Epitelinin Kazınması.....	49
3.5. Hücre Örneklerinin Alınması ve Fiksasyonu .....	49
3.6. Hücreler için İndirekt İmmunohistokimya Protokolü .....	50
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>52</b>
4.1. Histokimyasal Bulgular .....	52
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular .....	52
<b>5. RESİMLER</b> .....	<b>58</b>
<b>6. TARTIŞMA</b> .....	<b>71</b>
<b>7.SONUÇLAR</b> .....	<b>75</b>
<b>8.KAYNAKLAR</b> .....	<b>90</b>

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

**OYE** Over Yüzey Epiteli (Ovarian Surface Epithelium)

**PKH** Putativ Kök Hücre (Putative Stem Cell)

**KKH** Kırmızı Kan Hücresi (Red Blood Cell)

**DGKH** Dişi Germline Kök Hücre (Female Germline Stem Cell)

**ÇKEBKH** (Çok Küçük Embriyonik Benzeri Kök Hücre) (Very Small Embryonic Like Cell)

**OCT-4** Oktomer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktör-4 (Octamer-Binding Transcription Factor-4)

**SSEA-4** Evreye Özgü Embriyonik Antijen-4 (Stage Specific Embryonic Antigen-4)

**VASA** DEAD Protein Gen Homoluğu (DEAD Protein Gene Homologous)

**ZP-4** Zona Pellusida Proteini-4 (Zona Pellucida Protein-4)

**CK 18** Sitokeratin 18 (Cytokeratin 18)

**PTEN** Fosfataz ve Tensin Homoluğu ( Phosphatase and Tensin Homolg)

**PI3K** Fosfotidilinositol 3 kinaz ( Phosphoinositol 3- Kinase)

**AKT** (Protein Kinaz B) (Protein Kinase B)

**FOXO3A** Fork Head Kutusu Sınıf O3 (Fork Head Box Class O3)

**GVBD** Germinal Vezikülün Yıkılması (Germinal Vesicul Break Down)

**CDK1** Siklin Bağımlı Kinaz1 (Cyclin Dependent Kinase1)

**mTORC1** Memelilerde Rapamisinin Hedef Kompleks Proteini1 (Mammalian target of rapamycin complex 1)

**SRY** Seks Belirleyici Bölge Y (Sex Determining Region Y)

**TDF** Testis Belirleyici Faktör (Testis Determining Factor)

**TGF- $\beta$**  Dönüştürücü Büyüme Faktörü- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ )

**BMP-4** Kemik Morfogenik Proteini-4 (Bone Morphogenic Protein-4)

**TA** Tunika Albuginea (Tunica Albuginea)

**CK** Sitokeratin (Cytokeratin)

**GKH** Germline Kök Hücre (Germline Stem Cell)

**LH** Luteinizan Hormon

**hCG** insan Koryonik Gonadotropin (human Chorionic Gonadotrophin)

**HLA-DR** MHC Sınıf II Hücre Yüzey Reseptörü ( MHC class II cell surface receptor)

**MPF** Mitoz Başlatıcı Faktör (Mitosis Promoting Factor)

**ER1 $\alpha$**  Östrojen Reseptör- $\alpha$  (Oestrogen receptor- $\alpha$ )

**MIS**

**PDK1** Fosfoinositid bağımlı kinaz-1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1)

**POF** Erken Over Yetmezliği (Premature Ovarian Failure)

**TSC1** Tüberoz Skleröz 1(Tuberous sclerosis 1)

**TSC2** Tüberoz Skleröz 2(Tuberous sclerosis 2)

**RPTK** Reseptör protein tirozin kinaz

**KL** Kit Ligand

**IgM** İmmunglobulin M

**ZP** Zona Pellusida (Zona Pellucida)

**ZP-3** Zona Pellusida Proteini-3 (Zona Pellucida Protein-3)

**ZP-2** Zona Pellusida Proteini-2 (Zona Pellucida Protein-2)

**ZP-1** Zona Pellusida Proteini-1 (Zona Pellucida Protein-1)

**CL** Corpora Lutea

**FACs** Fluorescence-activated cell sorting

**MACs** Magnetic-activated cell sorting

**H.E** Hematoksilen eozin

**DIC** Diferansiyel interferens kontrast

**PCOS** Polikistik Over Sendromu (Polycystic Ovarian Syndrome)

**CD** Farklılaşma Kümeleri (Cell Differentiation)

**HKH** Hematopoetik Kök Hücre (Hematopoietic Stem Cell)

**MPP** Multipotent Projenitör (Multipotent Progenitor)

**YMP** Yaygın Myeloid Projenitör ( Common Myeloid Progenitor)

**YLP** Yaygın Lenfoid Projenitör (Common Lymphoid Progenitor)

**CA125** Kanser Antijen 125 (Cancer Antigen 125)

**KS** Kaposi Sarkom

**RT-PCR** Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**IVF** İn vitro Fertilizasyon

**H.E** Hematoksilen-Eozin

**IHC** İmmunohistokimya

**DOKH** Doku Oluşturan Kök Hücre (Tissue Committed Stem Cell)

**BrdU** 5-bromo2-deoksiüridin (5-bromo-2-deoxyuridine)

## **LVEF Sol Ventiküler Ejeksiyon Fraksiyonu (Left Ventricle Ejection Fraction)**



## RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin, Hematoksilen- Eozin ile boyamasına ait görüntüler.
- Resim 2.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, İmmunohistokimya-negatif kontrol boyamasına ait görüntüler.
- Resim 3.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, OCT-4 immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 4.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, SSEA-4 immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 5.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, VASA immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 6.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, C-KİT immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 7.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, CK-18 immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 8.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, ZP-4 immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 9.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, PTEN immunoreaktivitesine ait görüntüler.

**Resim 10.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, PI3K immunoreaktivitesine ait görüntüler.

**Resim 11.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, AKT immunoreaktivitesine ait görüntüler.

**Resim 12.** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin ve kazınan over yüzey epiteli hücre örneklerinin, FOXO3A immunoreaktivitesine ait görüntüler.

**Resim 13.** Blastosist benzeri yapıların hücre kültürüne ait görüntüleri.

## **ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ**

**Şekil 2.1.1.** Overin genel görünümü

**Şekil 2.1.2.** Overin Şematik görünümü

**Şekil 2.3.1.** Overin embriyonik gelişimi

**Şekil 2.4.1.** Over dokusunun hematoksilen-eozin ile boyanmış kesiti

**Şekil 2.9.1.** Over embriyonik gelişimin Şematik görüntüsü

**Şekil 2.15.3.1.1.** Memeli gonadlarında ŐKEBKH'ler ve OKH'lerinin fonksiyonu

**Şekil 2.15.3.3.1.** Memeli gonadlarındaki kök hücrelerin varlığının Şematik sunumu

**Tablo 3.1.1.** Parafin Doku Takip Protokolü

**Tablo 3.2.1.** Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü

**Tablo 3.3.1.** İndirekt İmmunohistokimya Protokolü

**Tablo 3.6.1.** Hücreler için İndirekt İmmunohistokimya Protokolü



## 1. GİRİŞ

Over yüzey epiteli (OYE), peritoneal mezotelyal hücrelerden köken almaktadır (1,2). OYE, literatürde over mezotelyumu veya normal over epiteli olarak bilinir ve erişkin kadınlarda tek katlı prizmatikten kübik doğru giden bir epitel olup, over yüzeyini kaplar ve peritonun devamıdır (3,4). OYE, bazal membran ve bazal membranın altında yoğun kollajenöz sıkı bağ doku tabakası olan tunika albuginea ile over stromasından ayrılmaktadır (5). OYE az farklılaşmıştır, normal epitelten farklı olarak, hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçler ekspres eder. Sadece ovulasyon sırasında sürekli yırtılan fonksiyonel overin yüzeyi Bu tip epitel ile örtülü olup, anovulatuvar siklus PCOS menopo ve sklerotik over yüzeyi ise normal epitel ile örtülüdür.

Parthe yaptığı çalışmada over yüzeyinden kazınarak elde edilen epitel hücreleri putativ kök hücre (PKH) ve kırmızı kan hücrelerinin (KKH'lerinin) kültüre edilmesi ile oosit benzeri, parthenot benzeri hücrelere, nöron tip hücrelere ve alkaline fosfataz pozitif hücrelere ve hatta embriyonik bodilere dönüşebildiğini rapor etmiştir (5). Epitelyal hücrelerin petri tabanına tutunduğu ve KKH'lerinin zamanla kaybolduğu, PKH'lerin spontan differansiasyona uğradığı gösterilmiştir (5). Bu differansiye olan hücrelerin germ hücre belirteçleri (C-KİT, DAZL, GDF-9, VASA, ZP-4 ve OCT-4) taşıdıkları bildirilmiştir (5). Zou ve arkadaşları yaptıkları çalışmada overde bulunan hücrelere dişi germline kök hücreler (DGKH'ler) adını vererek bu hücrelerin sadece immature oositlere farklılaşmadıklarını, aynı zamanda fertilize olabilen in vivo gelişen oositler üretebildiklerini göstermişlerdir (6).

Over kök hücrelerinin kaynağı halen tartışmalıdır. Bu hücrelerin periferik kan kökenli olduğu ileri süren çalışmalar varlığına rağmen (5,7) daha önce yapılan çalışmalar bu hücrelerin OYE'nde yerleşik hücreler olduğunu bildiren çalışmalarda bulunmaktadır. (5,6,8). Virant-Klun ve arkadaşları bu hücrelerin kandan köken olmadığını, over yüzey epitelinin yapısal bir parçası olduğunu bildirmiştir (9). Bu hücrelerin yoğun kromatin yapısı nedeni ile çekirdek boyanmasının gerçekleşmediğini ileri sürmüşlerdir. İmmuohistokimyasal boyama sonucunda bu hücrelerin bir

pluripotensi belirteci olan SOX2 ile boyandığı gösterilmiş bu hücrelerin PKH'ler olduğu sonucuna varılmıştır. Ratajczak ve arkadaşları bu hücrelere çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler (ÇKEBKH'ler) adını vermiş ve erişkin insan dokularında da bulunduğunu bildirmiştir (10). Shin ve arkadaşları bu hücrelerin epiblastan göç eden hücreler olduklarını erişkin dokularda da imprintig genlerin sessiz olarak bulunduğunu böylece teratomlardan koruduğunu rapor etmiştir (11). OCT-4, SSEA-4, VASA, C-KİT, CK-18, ZP-4, PTEN, PI3K, AKT FOXO3A OYE'nden eksprese olan ve farklılaşmada rol alan belirteçlerdir.

OCT-4 hem testis, hem de overde bulunan hücreler tarafından eksprese edilen pluripotensiyi gösteren bir protein olup, putativ germ "kök hücre" belirteci olarak isimlendirilmektedir (12). Bununla birlikte overlerde OCT-4 ekspresyonunun geçici olduğu ve proteinin miktarının gelişimin ileri dönemlerinde azaldığı ve bu hücrelerin primordial folliküllere dönüştüğü bildirilmiştir (12).

Bir germ hücre belirteci olan SSEA-4'ün pluripotensi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Over korteksinde SSEA-4 pozitif hücrelerin varlığı gösterilmiş ve fetal overlerin yüzey epitelinde bulunan primitif oositlere benzetilmiştir. Over yüzey epitel hücreleri arasında az sayıda SSEA-4 eksprese eden hücrelerin varlığı bilinmektedir. Bu hücrelerin over dokusu gibi her menstrual siklusta yaralanma ve tamir olaylarının gerçekleştiği organda iyileşmenin hızlanmasında fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir.

Dişi germ hücrelerinin gelişiminde esansiyel rol oynayan VASA, DEAD box gen ailesinin bir üyesidir. VASA premayotik safhada gametogenez süresi boyunca eksprese olmakta, primordial germ hücrelerinde ise bulunmaktadır. VASA germ hücre diferansiasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir. VASA gonositlerden ve birinci trimestr oogonyalardan eksprese olmazken, ikinci trimestr gonadların germ hücrelerinde eksprese edilmektedir.

C-KİT'in bir protein tirozin kinaz reseptörü olup hücrel proliferasyon, sağkalım, adhezyon, sekresyon ve diferansiasyonda rol oynadığı bilinmektedir C-KİT'in OYE hücreleri arasında bulunduğu ve normal OYE fonksiyonu için gereklidir C-KİT'in oosit büyümesi ve folliküler gelişimde esansiyel rol oynadığını, buna karşılık

C-KİT bloke edildiğinde farelerde postnatal follikül gelişimin bozulduğu gözlenmiştir. (13-15).

Sitokeratin (CK) dokuların ektoderm veya endodermden köken ayrımında kullanılmaktadır Over yüzey epitel hücreleri hem epitelyal, hemde mezenşimal belirteçler taşımaktadır. CK pozitifliğinin primordial, primer folliküllerin, hem folliküler hem granüloza hücrelerinde varlığını gösterilmiştir.

Zona pellusida (ZP) proteinlerinden biri olan ZP-4, tek başına sperm bağlama yeteneğine sahiptir. ZP-4 ayrıca oositlerin gelişimde rol oynayan germ hücrelerin belirteci olduğuda ileri sürülmektedir. Primordial ve primer folliküllerdeki oositlerin ZP-4 eksprese ettiği de ileri sürülmektedir.

PTEN, PI3K'ın negatif düzenleyicisi olduğu ve primordiyal follikül aktivasyonunu baskılama fonksiyon gösterdiği bilinmektedir. PTEN inhibitörlerinin kullanılmasını ile primordiyal follikülleri aktive edilebileceği ileri sürülmektedir, PTEN'in, primordial folliküllerdeki oositlerde ortadan kaldırıldığında primordial folliküllerin aktive olduğu, primer ve sekonder folliküllerin aşırı gelişimi dolayısı ile primordial folliküllerin erken depleksiyonuna neden olduğu da rapor edilmiştir. Bununla beraber PTEN'in OYE hücreleri ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

PI3K primordial follikül gelişiminde rol oynadığı, oositlerin yaşamını, kaybını ve primordial folliküllerin aktivasyonunu kontrol ettiği, ekstrasellüler yolaklar ile primordial folliküllerin yaşamını devam etmesinde önemli rol oynamaktadır. PI3K'nın pre-granüloza hücrelerinin follikül gelişimi ve aktivasyonu için önemli olduğu bundan dolayı oosit büyümesi ve folliküler gelişimin devamı için düzenleyici olduğu da ileri sürülmektedir (16). Primordial folliküllerdeki oositin *Pdk1* geni ortadan kaldırılırsa hücreler bekleme döneminde direkt olarak ölmektedir (17). Bununla beraber OYE hücrelerinden oosit elde edilmesi sırasında PI3K rolü tam olarak bilinmemektedir.

AKT, protein kinaz B (PKB) olarakta bilinir insan fizyolojisinin önemli düzenleyicisidir ve büyüme, hayatta kalma, proliferasyon ve metabolizmanın

düzenlenmesini içeren çeşitli hücrel fonksiyonları kontrol etmektedir (18). AKT aktivasyonu oosit çekirdeğinin germinal vezikül yıkılması(GVBD) olarak isimlendirilen olayının gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. AKT CDK1-siklin B kompleksini aktive ederek mitotik faza girmesini sağlamaktadır. Ayrıca, AKT/PKB normal hücre sağ kalımını sağlamasında ve fertilize fare oositlerinde ilk mitotik bölünmede anahtar rol oynadığı da ileri sürülmektedir.

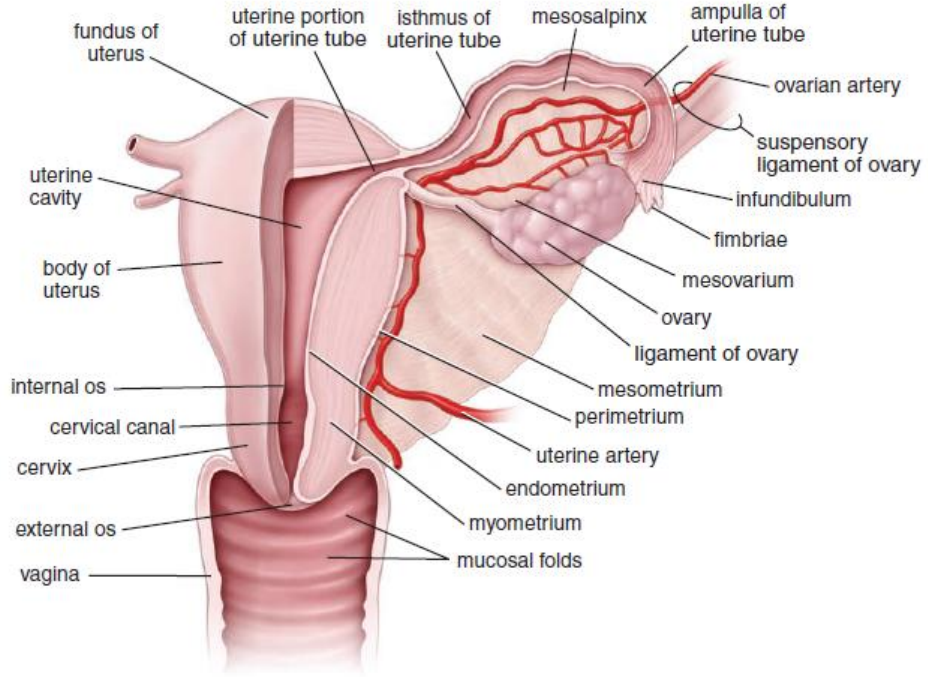
FOXO3A dişi üreme sistemi içinde gonadal fonksiyonların kontrolü, embriyogenez ve follikülogenezde önemli rol oynamaktadır (19). FOXO3A memeli overinde folliküler aktivasyon ve erken gelişim dönemini kontrol ettiği ileri sürülmektedir. Oositlerdeki yüksek PI3K-AKT sinyal yolağının aktivitesi oositlerdeki FOXO3A'yı inhibe ederek primordial folliküllerin aktivasyonunda inhibitör rol oynamaktadır. Aşırı FOXO3A ekspresyonunun da follikül gelişiminin bozarak dişi infertilitesine de neden olduğu bildirilmiştir (18).

Bu çalışmada menopozlu kadınlardan alınan over örneklerinden elde edilen yüzey epitel hücrelerinin immunohistokimyasal teknikle OCT-4 ve SSEA-4 antikoları ile pluripotent hücrelerin; C-KİT ve VASA antikoları ile germ hücrelerin, -ZP-4 antikoları ile oosit benzeri hücrelerin; CK-18 ile epitelyum hücrelerinin varlığının ve bu farklılaşma işlemleri sırasında PTEN-PI3K-AKT-FOXO3A sinyal yolağının rolünün araştırması amaçlanmıştır.

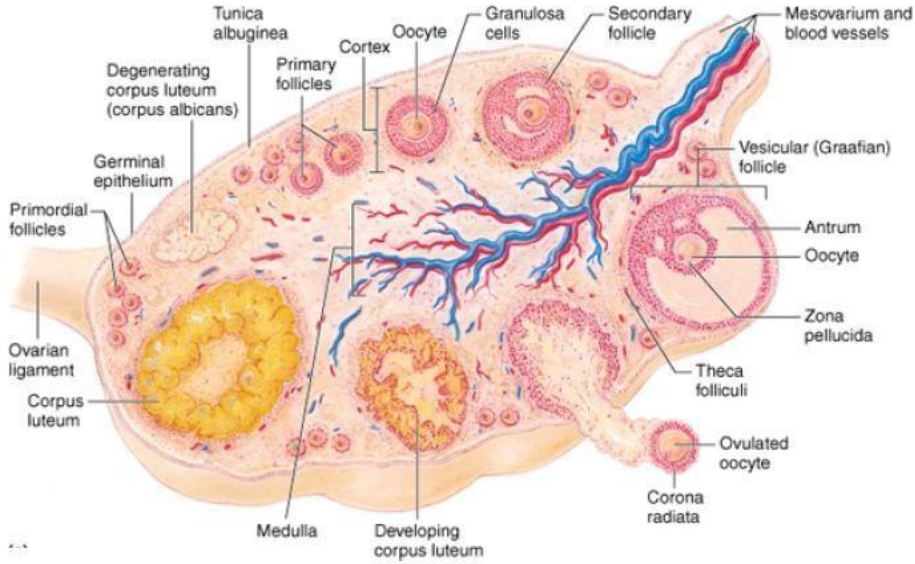
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Overin Genel Yapısı

Overler, doğum yapmamış kadınlarda badem şeklinde, sağ ve sol lateral pelvik duvarlara yakın yerleşimli pembe beyaz yapılar olarak gözlenen, uzunluğu 3 cm, genişliği 1.5 cm, kalınlığında 1 cm olan bir çift dişi üreme sistemi organıdır (20,21). Ağırlıkları yaklaşık 5 gram kadardır (22). Overler pelvisin yan duvarlarında fossa ovarica adı verilen çukurluklara yer alır. Overlerin ön kısımlarında, kan damarlarının ve sinirlerin girdiği hilus adı verilen bölge bulunur. Mezovaryum (posterior), kan damarlarını overlere ileten bir periton kıvrımı olup, overi uterusun yan kenarlarından uzanan broad ligamentine bağlar. Overin üst kutbu suspansör ligamentle pelvik duvara, alt kutbu ise ovarian ligament ile uterusu tutunur (**Şekil 2.1.1**). (20). Overin kanlanması aorta abdominalisten çıkan arteriyor ovarica'lar sağlar. Bu arter, suspansör ligament içerisinde seyrederek. Overin süperior kutbu pelvik duvarına over damarlarını ve sinirlerini getiren süspansör ligament ile pelvik duvara bağlanır. Venleri arterleri takip ederek hilum ovarii'den çıkar. Önce plexus pampiniformis adı verilen bir venöz ağı, ardından da vena ovarica'yı oluşturur. Vena ovarica, sol tarafta vena renalis'e sağ tarafta ise doğrudan vena cava inferiora dökülür. Lenf damarları ise nodi lymphatici preortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'e açılır. Ligamenti ile uterusu bağlanır. Bu ligament embriyonik fibröz kord pelvisin tabanına gelişen gonadlara tutunan gubernakulumun bir kalıntısıdır. Puberte öncesi, overin yüzeyi düzdür ancak üreme çağı boyunca tekrarlayan ovulasyonlardan dolayı devamlı olarak skardır ve irregülerdir. Postmenopozal kadınlarda overler üreme döneminde gözlenen boyutların dörtte biri kadardır (20,22) (**Şekil 2.1.2**).



Şekil 2.1.1.: Overin genel görünümü (23)



Şekil 2.1.2.: Overin şematik görünümü (24)

## 2.2. Gonad Gelişimi

Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan daha fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin yedinci haftasına kadar gonadlar erkeğe veya dişiye ait morfolojik özelliklere sahip değildirler (25).

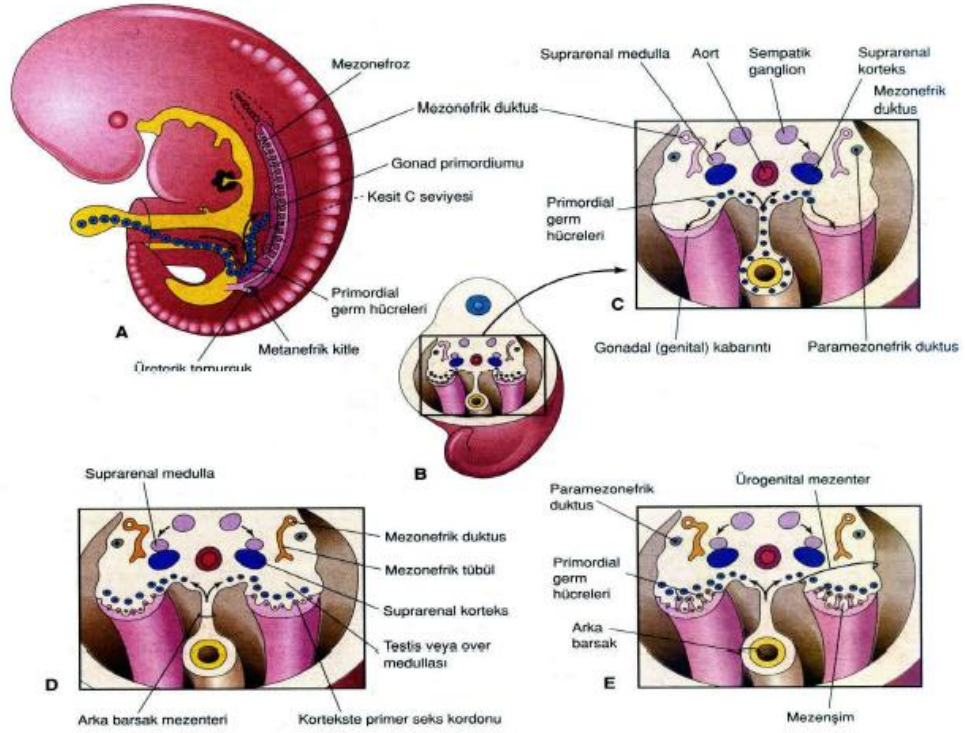
Gonadal gelişimin ilk safhaları beşinci haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık oluşur. Buna **gonadal kabartı** denir (21). Gelişimin altıncı haftasına kadar gonadal kabartılar içinde **germ hücreleri** yoktur (25). Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar (**gonadal kordonlar**) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklılanmamış gonad, dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulla'dan oluşturmaktadır(21). Primordiyal germ hücreleri, epiblasttan köken alır, primitif çizgi boyunca göç eder ve üçüncü haftada yolk kesesinin (umbilikal ya da vitellus kesesi) allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. Dördüncü haftada ameboid hareketlerle sonbağırsağın mezenterinin dorsali boyunca, ilerleyerek beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşır, altıncı haftada genital sırtları işgal ederler. Bu hücreler genital sırtlara ulaşamadıkları takdirde gonadlar gelişemez. Primordiyal germ hücrelerinin gonadların over veya testise farklılaşmaları üzerine indükleyici etkileri vardır (25). Bu hücreler genital sırtlara ulaşamadıkları takdirde gonadlar gelişemez.

### 2.3. Over gelişimi ve Embriyolojisi

Overler, posterior abdominal duvarın mezodermal epiteli, altında yer alan mezenşim dokusu ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken alır (21).

XX cinsiyet kromozomlarına sahip olan embriyolarda, farklanmamış gonadın korteksi overe farklanır ve medullası geriler (21). Farklanmamış gonadın kortikal bölgesi, başlangıçta primer cinsiyet kordonlarını içerir. Bu kordonlar, gelişimin beşinci haftasında sölom epitelinden mezenşim içine uzanır. Y kromozomunun seks belirleyen bölgesinde yerleşik SRY geni tarafından kodlanmış TDF yoktur (26). Onuncu haftaya kadar overler histolojik olarak ayırt edilemezler. Primer cinsiyet kordonları belirgin değildir. Erken fetal dönemde, overin yüzey epitelinden köken alan primer cinsiyet kordonları altta bulunan mezenşim içerisine doğru ilerler. Kortikal kordonların boyutları arttığında, primordiyal germ hücreleri onların içerisine girerler. Yaklaşık onaltıncı haftada, bu kordonlar izole hücre kümelerine parçalanırlar (21). Bu kümelerdeki hücreler çoğalmaya devam eder ve her oogoniumun etrafını tek sıralı yassı folliküler hücreler sararlar. Folliküler hücreler, oogoniumlar ile birlikte primordiyal follikülü meydana getirir (25). Fetal yaşam sırasında, overlerdeki oogoniumlarda oluşan aktif mitoz sonucu, binlerce primordiyal follikül meydana gelir. Doğumdan sonra overin yüzey epiteli (germinal epitel) düzleşir ve tek tabakalı hale geçen hücreler, over hilumunda periton mezoteliyle devamlılık gösterirler. Yüzey epiteli korteksteki folliküllerden tunika albuginea adı verilen ince bir fibröz kapsülle ayrılır (21).



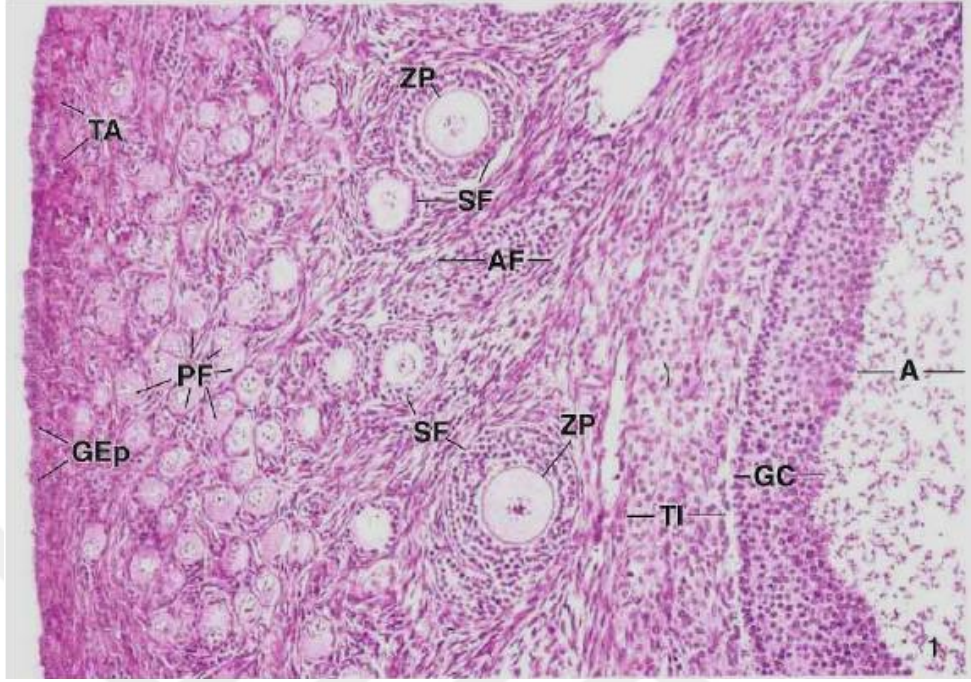


Şekil 2.3.1. Overin embriyonik gelişimi (21)

## 2.4. Over'in Histolojisi

İnsanlarda overler, badem şeklinde yapılar olup, yüzeyleri tek katlı yassı ya da kübik over yüzey epiteli (germinal epitel) ile kaplıdır. Over yüzey epitelinin altında, overin beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea (TA) olarak adlandırılan sıkı bağ doku tabakası bulunur. Tunika albugineanın altında primer oositleri içeren over folliküllerinin bol miktarda bulunduğu korteks yer alır (27). Kortekste over yüzey epitelinin altında, primer oositlerin tek sıralı yassı follikül epiteli ile çevrili olduğu primordiyal folliküller bulunur (26). Folliküller, kortikal bölgenin bağ dokusu içine gömülüdür. Bağ dokusu hormonal uyarılara diğer organlarda bulunan fibroblastlarından farklı yanıt veren fibroblastlar içerir (Şekil 2.4.1).

Overin en iç kısmı yani medulla bölgesi gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı, sinirleri içeren kısımdır (26,27). Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur.



Şekil 2.4.1. Over dokusunun hematoksilen-eozin ile boyanmış kesiti (20)

## 2.5. Germ Hücrelerinin Kökeni

Erişkin memeli dişilerinin overlerindeki oositlerin (ve primordiyal foliküllerin) kökeni germ hücrelerinin muhtemel gonadın somatik sölom (germinal veya yüzey) epitelinin proliferasyonundan meydana geldiği 1870'te Waldeyer tarafından önerilmiştir (28,29). Karşıt görüş olarak germ plazmasının devamlılığı Weismann tarafından teori olarak önerilmiştir (30,31).

Yeni tekniklerin kullanımı Weismann'nın teorisinin omurgasızlar (*C. Elegans* ve *Drosophila melanogaster* ve bazı alt omurgalılar (zebrafish ve kurbağalar) için uygun olabileceğini ancak fareler ve memelilerin geneli için uygun olmadığını göstermiştir (32,33). Genetik olarak işaretlenmiş 4 ve 8 hücreli fare embriyoları ile yapılan çalışmalarda hücrelerin ya germ hücrelerine ya da somatik hücreleri oluşturduğunu göstermiştir (34). Bu spesifik olmayan germ hücrelerinin implantasyon öncesinde var olduğu göstermektedir. İmplantasyon sonrası periyod sırasında fare germ hücreleri fertilizasyondan yaklaşık 7 gün öncesine kadar tanımlanamamıştır (35). Germ hücreleri

somatik nesilden farklılaşmaktadır. Bu aynı zamanda greft edilen embriyonik hücrelerin hücrel farklılaşmalarının greftlere bağlı olmadığını ancak onların bırakıldığı yere bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca başka çalışmalarla null BMP4 fare embriyolarında primordiyal germ hücrelerinin gelişiminin başarısız olduğu bundan dolayı TGF $\beta$  süperalesinin bir üyesi olan BMP-4'ün germ hücrelerinin gelişiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (36).

Oogenez, kültüre edilmiş fare embriyonik kök hücrelerinde gösterilmiştir. Böyle oogonyalar mayozu başlatır, komşu hücreler follikül benzer yapılar oluşturur ve daha sonra blastosist gelişir (37). Kültüre edilmiş fare embriyonik kök hücrelerinin oositi fertilize edebilen haploid erkek gamete farklılaştığı ve blastosist geliştiği bildirilmiştir (38).

Erişkin farelerin overlerinde germline kök hücreler olduğu (39) ve prosimian primatların overlerinde farelere benzer biçimde bölünen germ hücreleri olduğu bildirilmiştir (40-43).

Bu çalışmalar somatik hücrelerin germ hücrelerine gelişme potansiyeli olduğunu göstermektedir ve bazı memeli türleri erişkin overlerinde mitotik olarak aktif germ hücrelerini bulundurmaktadır. Bununla birlikte, erişkin memeli dişilerde tüm primer folliküllerin fetal periyod sırasında olduğu hala çok sayıdaki araştırmacı tarafından desteklenmektedir. Erişkin memeli overlerinde yeni primer follikül oluşumunun direkt kanıtlarının eksikliği nedeniyle desteklenmemiştir (44). Erişkin prosimiyanlarda mitotik olarak aktif germ hücreleri ve olası germline kök hücreler yaşamlarının fetal periyodlarından itibaren aktif olup olmadığı veya progenitor hücrelerin bazı tiplerinin aktivasyonu hala belirsizdir. Bukovsky ve arkadaşları erişkin insan overlerinin tunika albugineasındaki mezenkimal kök hücrelerin hem primitif granuloza hemde germ hücreleri ile bipotent progenitorler olduğunu ileri sürmektedir (29).

## **2.6. Tunika Albuginea, Yüzey Epiteli Ve İnsan Over Korteksinden Elde Edilen Epitel Yapısı**

İnsan tunika albugineası gevşek bağ doku hücrelerin kalın fibröz subepitelial bir tabakasıdır. Bu tabaka intrauterin hayatın son dönemine (45) ya da doğumdan birkaç ay sonrasına kadar oluşmamaktadır (46). Bu tabaka tam bir membran olmamasına rağmen, sadece gevşek bağ dokusu hücrelerinin tabakasıdır. Over yüzey epitelinin aksine, over tümörlerinin bir çeşit kaynağı olduğu düşünüldüğünden, tunika albuginea iyi bir şekilde çalışılmamıştır.

Over korteksi genellikle düzensiz şekilli yaygın olarak ovarian “germinal”, süperfisiyal, ya da yüzey epiteli olarak bilinen epitel benzeri mezotelyal hücre tabakası tarafından örtülmüştür (47). Bu tabaka altındaki tunika albuginea ile birlikte kollajen fibriller aracılığı ile altındaki bazal laminaya tutunmuştur. Yenidoğan hayvanların overleri hariç, over yüzey epitelinde mitoz bölünme aslında yoktur (48). Fonksiyonel insan overlerinde yüzey epiteli sadece belirli bölgelerde bulunur ancak anovulatuvar döngüdeki kadınlarda, ya da polikistik veya sklerotik overli hastalarda, over yüzeyi tamamiyle over yüzey epiteli ile kaplıdır (49). Bu durumun benzer cerrahi yöntemlerle toplanmasına rağmen, over denüdasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (50).

Ovulatuvar sikluslar boyunca OYE'nin taramalı elektron mikroskop ve submikroskopik çalışmalarında sık sık sayı, boyut ve dağılımda çeşitli büyüklükteki çapta olabilen bir dizi villus benzeri çıkıntı ve papillaların çıktığı bildirilmiştir (47). Yüzey epiteli tamamen organa giren over korteksinin içine de invajine olur. Bu durum insanlar da dahil tüm memeli hayvanlar için geçerlidir. Kortikal invajinasyonlar küçük uzamış yarıklar, yüzey altı kanal benzeri kriptalar ve epitel hücrelerinin solit kordonları şeklinde meydana gelir. Kriptalar çukur şeklindedir, tübüler invajinasyonlar yüzey epiteli hücreleri ile benzer özelliklere sahip olduğundan bu hücreler gibi sıralanmıştır. Ancak kordon hücreleri bazı granüloza hücreleri ile çok benzerlik gösterir. Overin bazı alanlarında, kordon parçaları ve epitel hücrelerinin küçük kümeleri gibi görünür. Genellikle buradaki epitel kümeleri (kordonların parçaları) primer folliküllere yakın durumdadır (47,48). Erişkin overlerinde, yüzey epiteli embriyonik yapıdaki özelliğini

nispeten devam ettirmektedir (51). Yüzey epiteli türevli kordonlar sinir sonlanmaları tarafından penetre edilmiştir ya da birbirine değeri ve parçalanmış kordonların, ovaryan folliküllerin epitelyal bileşiklerinin oluşumuna katkıda buldukları ileri sürülmüştür (48).

Böylece yüzey epitelinin stroma içerisine doğru yaptığı invajinasyonlar ve over yüzeyinden genişleyerek öne doğru çıkıntı yaparak şekillenmesi ile değışkenliğinin yüksek şiddette olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca, epitel hücreleri ile çevrelenen kripta benzeri yüzey altı kanallar vardır ve yüzey epiteli hücrelerinin kısmen embriyonik yapısını korur. Bir diğeri yandan epitel kordonlarından türevlenen epitel kümeleri over follikülleri için epitel hücrelerine katkı sağlamaktadır.

## **2.7. İn Vitro Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm**

Kültürde ovaryan yüzey epitel hücreleri epitelyal-mezenkimal dönüşüm geçirir. Sonuçta oluşan mezenkimal hücreler epitelyal fenotipli hücrelere geri farklılaşmayı uyarabilir (52,53). Over yüzey epitel hücreleri epitelyal-mezenkimal dönüşüm geçirirken başlangıçta CK pozitifdir ancak zamanla ve kültürler pasajlandıkça CK ekspresyonu kaybolur (3). Bu yüzden CK ekspresyonunun azalması yüzey epiteli türevli mezenkimal hücreleri için bir dinlenme evresi belirtisi gibi görünmektedir.

## **2.8. Over Yüzey Epiteli Tarihiçesi**

Her iki cinsiyette de gametler, mayotik bölünme yeteneğine sahip tek hücredir. Bundan dolayı yüz yılı aşkın süredir germ hücrelerinin somatik kök hücrelerden köken alıp almadığı tartışılmaktadır (54). Kanıtlar over gelişimi sırasında dişi germ hücrelerinin over yüzeyindeki somatik kök hücrelerden yani germinal epitelden farklılaştığını ileri sürmüştür ancak (28) daha sonra ekstraprenadial primordiyal germ hücrelerinin embriyonik gonadlara yerleştiği bulunmuştur (55).

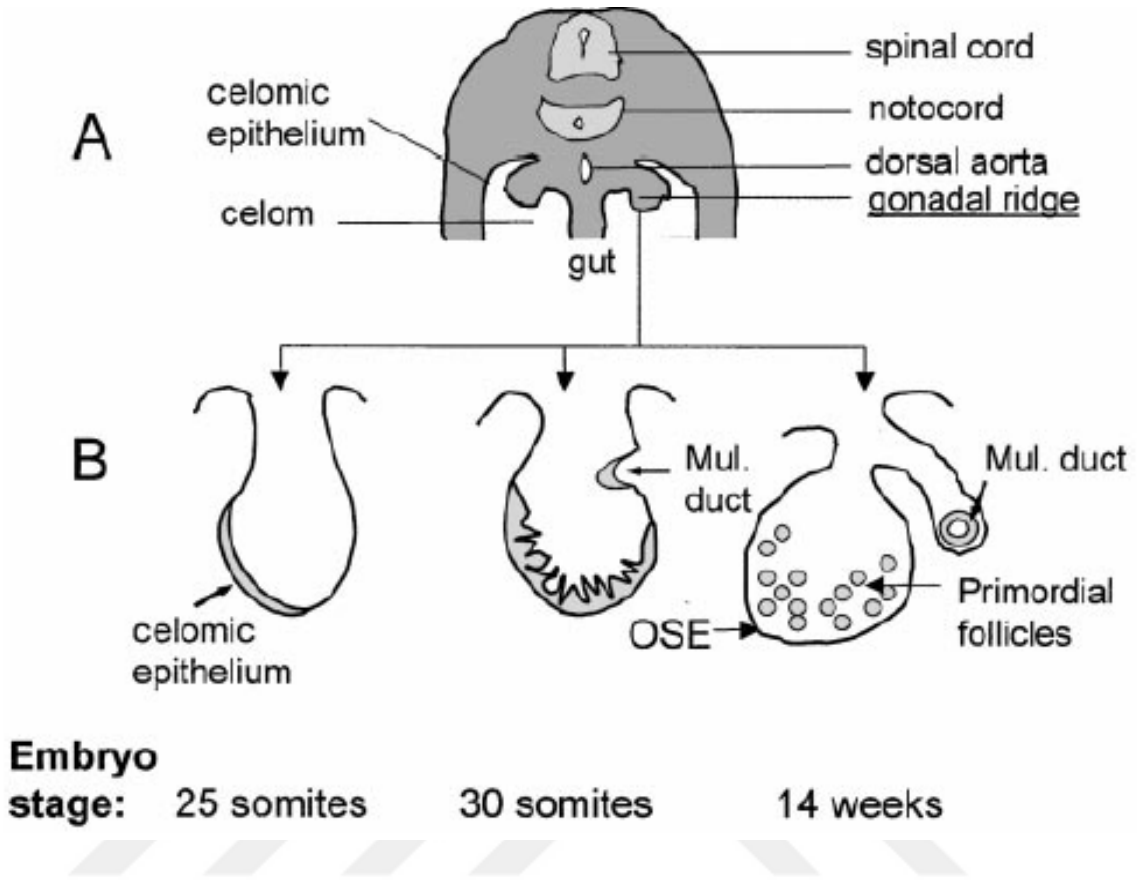
Kingery ve arkadaşları 1917'de yaptıkları bir çalışmada faredeki definitif oositlerin cinsel olgunluk öncesi over yüzey epitelinden köken aldığını ileri sürmüştür (56). Simkins ve arkadaşları 1932'de yaptıkları bir çalışmada fetal hayat boyunca germ hücrelerinin destekleyicisi olarak OYE'nin doğal rolünü tanımlamışlardır (46). Allen ve arkadaşları da fare ve diğer memeli türlerindeki erişkin overlerinin incelenmesi sonrası "germinal epitelin siklik proliferasyonu her normal östrus döneminde erişkin over korteksinde yeni bir oositin meydana geldiğini bildirmiştir.1986'da yapılan bir çalışmada intrauterin hayat boyunca oositlerin bir kaynağı olarak insan OYE'i ve rolü taramalı ve transmisyon elektron mikroskobu ile gösterilmiştir (45). Oogonial kök hücreler insandaki gibi yenidoğan ve erişkin fare overlerinden başarılı bir şekilde izole edilmiştir

## **2.9. Over Yüzey Epitelinin Embriyonik Gelişimi**

Over yüzey epiteli, intraembriyonik sölomun epitel bölgesinden mezodermal olarak köken alan, sölomik epitelin parçasından oluşur. Bu parça, daha sonra oluşacak olan gonadal bölgenin üzerini örtmektedir. Proliferasyonu ve diferansiyasyonu ile gonadal blastemin parçasını oluşturur (**Şekil 2.9.1**). OYE'nin gelişimi, embriyonik gelişimin onuncu haftasında başlar ve insan gestasyonunun beşinci ayına kadar devam eder. Fetal OYE, iyi tanımlanmış bazal membran üzerine papiller epitel, çok tabakalı, parçalı bir bazal membran ile tek katlı kübik epitele dönüşür ancak bu zamanla tek katlı haline geri döner. İntragonadal steroid hormonlarının fetal OYE için büyüme sinyalleri OYE büyümesini ve morfogenezi arttırdığı kabul edilmektedir (66). Fetal gelişim boyunca OYE ve ekstraovaryan mezotel arasında farklılıklar vardır. Bu farklılıklar gonadal kabartı bölgesindeki lokal faktörlerin hareketine bağlıdır. OYE ve ekstraovaryan mezotel sölomik epiteldeki kökenleri aynıdır ve pelvik boşlukta her ikisi de benzer çevre ile karşı karşıyadır. En ilginç farklılıklarından biri pelvik mezotelin bu iki parçası arasında hücre yüzey proteini CA125'in ekspresyonudur. Erişkinlerde CA125 hem epitel farklılaşma belirteci hem de müller kanalı kaynaklı neoplazma ve over için tümör belirteçidir (67). CA125 oviduktal, endometriyal ve endoservikal epitel

ile insan fetüslerinin birinci ve ikinci trimesterlerinin ve erişkin kadınların plevra, perikardiyum ve peritonlarından eksprese edilir ancak OYE’nde eksprese edilmez. gelişimde bu farklılaşma belirteci ya olmadığından ya da erken evrede kaybediğinden dolayı OYE sadece sölomik epitelyal kökenlidir (68). Bu OYE’nin daha az farklılaştığını ve pelvik peritonun geriye kalan kısmından daha az olgun bir mezotelyal fenotip meydana getirdiği fikrini desteklemektedir. OYE türevli epitelyal karsinomlarda CA125’nin ekspresyonu, erişkin OYE’nin en az patolojik koşullar altında sölomik epitelin farklılaşmasını koruduğunu gösterir.

Fetal OYE’i aynı zamanda ovaryan granüloza hücrelerin olası kaynağıdır. Granüloza hücrelerinin intraovaryan rete aracılığıyla mezonefrik tübüllerden ya da her ikisinden ve değişik türler arasında kökeninin ne dereceye kadar OYE’i türevli olup olmadığı hala tartışmalıdır. Buna ilaveten bu farklılık sadece gelişimin geç evresinde önemlidir çünkü OYE ve ürogenital kabartıyı örten, intraovaryan rete sölomik epitelden ortak kökenlidir (21-25). Fetal OYE’i aracılığıyla granüloza hücrelerinin progenitörü olarak görevinin yanı sıra olası gonad invajinasyonlarının çevresinde sölomik epitel, müller(paramezonefrik) kanalını yani tuba uterinanın epitelini, endometrimu ve endoserviksi meydana getirir. Bundan dolayı gonadal bölge içinde ve yakınında sölomik epitel birçok farklı yolak boyunca farklılaşma yeteneğine sahip embriyonik alanlar oluşturur. Müllerian epitel ve ovaryan epitelyal karsinogenezin OYE’i arasındaki bu yakın gelişimsel ilişkinin uyumluluğu Auersperg ve arkadaşları tarafından açık bir şekilde gösterilmiştir (3).



Şekil 2.9.1. Over embriyonik gelişimin şematik görüntüsü.

## 2.10. Over Yüzey Epiteli

Over yüzey epiteli (OYE), peritoneal mezotelyal hücrelerin mezenkimal hücrelerden epitelyal hücrelere dönüşmesi ile peritoneal mezotelyal hücrelerden farklılanırlar (1,2). OYE, literatürde over mezotelyumu veya normal over epiteli olarak bilinir ve erişkin kadınlarda tek katlı prizmatikten kübik doğru giden bir epitel olup, over yüzeyini kaplar ve peritonun devamıdır (3). OYE, bazal membran ve bazal membranın altında yoğun kollajenöz sıkı bağ doku tabakası olan tunika albuginea ile over stromasından ayrılmaktadır (4). OYE az farklılaşmış, normal epitele benzemeyen hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçler eksprese eden bağımsız hücre tabakasıdır ve menstrual siklus sırasında yırtılan overin fonksiyonel bölgelerini örter diğer bölgeler epitel tabakası ile çevrilidir Sağlıklı OYE'nin fonksiyonu, rejenereasyon ve üreme periyodu boyunca ovulasyon sonrası hücrelerin tekrarlayan proliferasyonudur. OYE'nin önemli fonksiyonlarının eksikliği, over dokusunun diğer bileşenleri ile



karşılaştırıldığında daha az dikkate alınmıştır. OYE'nin rolü epitelyal over karsinomunun patogenezinde daha iyi anlaşılmıştır ancak insan oogenezindeki rolü hala tartışmalıdır (73-76). OYE insanda granüloza hücrelerinin kaynağıdır ve hem epitelyal hem de mezenkimal kökenli kök hücre belirteçlerini eksprese eder (69-75).

Fare overleri kemoterapi ile ovaryan hücreleri yok edildikten sonra OYE'ndeki germline kök hücrelerin (GKH'lerin) varlığında yeni oositler ve folliküller üretme yeteneğine sahip olduğunu gösterilmiştir (39). Buna ilaveten juvenil ve erişkin fareden OYE'nden muhtemel mitotik olarak aktif GKH'lerin varlığı germ hücre spesifik protein VASA ekspresyonunu da göstermişlerdir. Yine Johnson ve arkadaşları insanlarda ve memeli türlerinde yeni germ hücrelerinin kökeni konusunda kemik iliği ve periferal kanda germline kök hücrelerin olabileceğini önermişlerdir (77).

OYE hücrelerinin menopozun başlamasında da rol oynadığı ileri sürülmektedir (78-80). Ancak immun hücrelerin, over kök hücrelerinin germ hücreye dönüşmesinin başlamasında belirleyici olduğu bu hücrelerin eksikliğinin menopozun başlamasını sağladığı düşünülmektedir (54). Over yüzey epitelinden köken alan kök hücrelerin tam germline potansiyeline sahip olması uzun süreli kültür edilmesi ile ortaya çıkmaktadır ve bu hücrelerin onkojenik aktivitesi in vivo suprese edilebilmektedir (79). Over kök hücrelerinin onkojenik aktivitesi iki koşul dışında suprese edilmektedir. Bunlardan bir hormonal koşullardır. Fetal orta gebelik ve erişkin periovulatuvar periyotta yüksek östrojen ve LH/hCG seviyesidir. Bu durumda bazı kök hücreler germ hücrelerine dönüşmektedir. Bu dönüşümde immun sistem ilişkili hücreler önemli rol oynamaktadır. HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>T hücreleri ve monosit türevli hücreler MDC (CD14+) germ hücrelerin ortaya çıkmasında, HLA-DR<sup>+</sup> MDC'ler granüloza hücrelerinin ortaya çıkmasına neden olur. Aktive olmuş MDC germ hücrelerinin tunika albuginea dan over korteksine doğru migrasyonu sağlamaktadır, burada germ hücreleri ovaryan damarlara girer (81-83). Bu sonuçlar immun hücreler olaya katılmadıkça OYE hücrelerinin germ ve granüloza hücrelerine diferansiye olamadığını göstermektedir. Kemoterapi sonrası prematür over yetmezliği gelişen farelerde kemik iliği transplantasyonu fertilitiyi de düzeltmektedir. Bu muhtemelen immun related cell sağlanması ile olmaktadır (84). İn vitro da ise immun bağlantılı hücreler gerekli değildir çünkü in vivo da uygun hormonal

ve hücre kativite dışında ovarian germ hücrelerinin oojenik aktivitesi inhibe edilmektedir, in vitroda ise bu gerekmemektedir (54).

### **2.11. Over Yüzey Epitelindeki Germ Hücrelerinin Tespit Edilmesi**

Taramalı ve transmisyon elektron mikroskopunda intrauterin yaşamın yedinci haftasından yirmidördüncü haftasına kadar insan fetüslerinin OYE'inde çok sayıda germ hücrelerinin (10µm çapında) varlığı gösterilmiştir. Germ hücreleri yuvarlak şekli, düz yüzeyi ve bazı örneklerdeki büyük ameboid evajinasyonlar ile küçük sölomik epitel hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilmektedir (45). Diferansiyel interferens kontrast (DIC) ve immunohistokimya kullanılarak daha önceki çalışmalarda erişkin insan overlerinin korteks ve yüzey epitelinde putatif kök hücrelere benzer hücreler bulunduğu bildirilmiştir (81). Bu yüzey epitelindeki germ hücrelerinin varlığını göstermektedir. Bu germ hücreleri ya komşu yapılardan yüzey epiteline gelmektedir veya overden gelmektedir (45) ya da yüzey epitelinden köken alır ve over korteksine gelir ya da her iki durumda olabilir (81).

Germ hücreleri aynı zamanda alkalin fosfataz aktivitesi ile de tespit edilebilir. Ancak çeşitli dokularda bazı spesifik olmayan alkalin fosfataz aktivitesi tanımlanmıştır (85-88). Zona pellusida (ZP) proteinleri daha çok oositler için spesifik belirteçlerdir. Postnatal sıçan overlerinde keratin pozitif granüloza hücrelerine yakın primer folliküllerde ilk olarak görülmüştür (73). Ancak PS1 gibi bazı ZP proteinleri tavşan, kedi, maymun, babun ve insan OYE'nde ve insan over kanserlerinde de tanımlanmıştır (89-92). Bu nedenlerden dolayı yüzey epitel hücrelerindeki ZP protein ekspresyonu oositlerle ilişki göstermektedir.

### **2.12. Germinal Epitelin Rejeneratif Bir Tabakası Olarak Over Yüzey Epiteli**

OYE gen ekspresyon profiline bakılarak incelenmiştir. Sağlıklı overleri ya da seröz papiller ovaryan karsinomlu kadınlardan alınan OYE'nin gen ekspresyon profili üzerine yapılan çalışmada normal OYE'nden eksprese edilen genler erişkin kök hücre genlerinin korunduğunu, pluripotensi genlerinin yüksek oranda eksprese edildiğini,

adenokarsinomdan elde edilen OYE hücrelerinin bu genleri çok düşük seviyede eksprese ettiğini ya da tamamen eksprese etmediğini bildirmiştir (93). Kazınan OYE'nden yapılan hücre kültürlerinde detaylı gen ekspresyon profili kullanılarak putatif pluripotent kök hücrelerin varlığı doğrulanmıştır.

Buna karşılık, anovulatorik siklus, PCOS, menopoz boyunca, sklerotik overler gibi durumlarda over yüzeyinin tamamı epitel bir tabaka ile kaplıdır (5). Ayrıca hem üreme fonksiyonunu hem de over tümör oluşumunu kapsayan insan overinin önemli bir yapısıdır (94). Over yüzey epiteli erişkin dişi insanlarda germ hücre kaynağıdır ve yeni primer folliküller over korteksinde primitif granüloza hücrelerin iç içe düzenlenmesi ile oosit kümeleri tarafından oluşturulmaktadır (8). OYE hücrelerinin oosit benzeri hücrelere dönüşebildiği 2010 yılında yapılan çalışmada rapor edilmiştir (5).

## **2.13. Erişkin Over Yüzey Epiteli**

### **2.13.1.Yapısı**

Erişkin kadınlarda OYE fark edilmeyen tek katlı yassıdan kübiğe doğru giden bir epitelidir. Basit epitel için tipik olan keratin 7, 8, 18 ve 19 ile karakterizedir. OYE ekstraovaryan mezotel, apikal mikrovillus ve basal laminadan ayırt edilen musin antijen MUC1, 17 $\beta$ -hidroksi steroid dehidrogenaz ve silia eksprese eder (95,96-99). OYE'nin intraselüler bağlantısı ve epitelyal bütünlüğü basit desmozomlar, tamamlanmamış sıkı bağlantılar (95,98), çeşitli integrinler (100,101) ve kadherinler(102,103) tarafından korunur. seçici hücre-hücre adezyonu ve kateninlerle yakın ilişkileri aracılığıyla indirekt etki gen ekspresyonu yapan kadherinler kalsiyum bağımlı adezyon moleküllerinin ailesindedir (103,104). İnsanda OYE, granüloza hücreleri ve ekstraovaryan mezotel mezodermal türevli dokuların adheziv mekanizmaları ile karakterize olan N-kadherinler tarafından bağlanır (103,105-107). E-kadherin birçok epitelde temel adhezyon molekülüdür ve insan oviduktal, endometrial ve endoservikal epitelde bulunur (108) aynı zamanda fare ve domuz OYE'nde de bulunur (109,110). Aksine insan OYE'nde E-kadherin ekspresyonu nadir bölgeler için sınırlıdır. Bu bölgelerdeki hücreler metaplastik

epitel fenotipine benzeyen silindir şekilli hücrelerdir (102,103,107,111). Bu yüzden insan OYE’nde N-kadherinle E-kadherinin yardımcı ekspresyonuna bağlıdır ve metaplastik ve neoplastik OYE anormal epitelyal farklılaşmasına karşı eğilim gösterir (107). Dişi üreme dokularında E-kadherin ekspresyonunu düzenleyen faktörler hormonal kontroller içerir gibi görünmektedir. Östrojenden ve progesterondan beri *in vivo* uterus ve immatur fare overinde E-kadherin mRNA seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (109,112). E-kadherin sadece normal müllerian epitel için farklılaşma belirteci değildir aynı zamanda epitelyal farklılaşmanın bir uyarıcısıdır (113). SV40 büyük T antijeni ölümsüz OYE hattı Auersperg ve arkadaşları tarafından oluşturulmuştur. Bu hücreler fare E-kadherini için tümorojenik olmayan genin transfekte edilmesiyle oluşturulmuş ovaryan seröz adenokarsinom hücrelerine yakın benzerlik gösteren epitelyal tümorojenik OYE türevli hücre hattıdır (114). E-kadherin gibi P-kadherinde erişkin kadınların OYE’nde yoktur ancak müllerian kanal epitelde ve ovaryan adenokarsinom hücre hatlarında bulunmaktadır (107,108,115). Bu yüzden P-kadherin dağılımı doku spesifik morfojenetik olaylarla ilgili durumlarda değişir. Hem reseptör tirozin kinazlar hem de reseptör tirozin fosfatazlar kadherin-katenin komplekslerinin immunpresipitasyonu birlikte bulunmaktadır. Bu etkileşimler çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda OYE’nin farklı fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli olabilir (116,117). OYE altındaki overin beyazımsı renginden sorumlu tunika albuginea, sıkı kollajenöz bağ doku tabakası ve bazal membran tarafından ovaryan stromadan ayrıştırılır. Bu testiste tunika albugineadan daha ince ve daha az esnektir ancak ovaryan stroma ve OYE arasında biyoaktif ajanların difüzyonu için kısmi bariyer oluşturur. OYE bazal membran zayıf bağlanmasından dolayı diğer tüm epitellerden farklıdır ve mekanik olarak kolaylıkla ayrılır. Cerrahi örneklerde over yüzey epitel genellikle kaybolmaktadır ve bundan dolayı OYE yaşlı kadınların overlerinde sıklıkla yoktur. Bu gevşek bağlanma herhangi bir fizyolojik sonucu var olup olmadığı bilinmemektedir. Yaşla birlikte insan overlerinde düzensiz kenarların arttığı varsayılmaktadır ve over korteksinde OYE hattında yüzeysel invajinasyonlar ve epitelyal inklüzyon kistleri oluşur. Bu over yüzeyinde var olan hücre gruplarında postovulatuvar proliferasyon geçirip geçirmediğini, OYE hücrelerinin yassı ve kübik formları olduğunu göstermektedir (118). Buna ek olarak OYE hücreleri özellikle

çukurlarda ve inklüzyon kistlerinde silindir şekilli olma eğilimindedir. Bu şekil değişikliklerin birikme sonucunda mı yoksa genetik olarak belirlenmiş metaplastik değişiklikler sonucu gözleendiği net değildir ancak bu herhangi birinden dolayı olabilir. CA125 ve E-kadherin belirteçlerini bulduran müllerian epitelin fenotipik özelliklerini alan metaplastik değişimler geçiren bu bölgelerdeki OYE epitelindeki eğilim, önemli yüzey invajinasyonları ve inklüzyon kistleri oluşturur. CA125 ve E-kadherin belirteçlerini bulduran silindir şekilli hücreler ve çeşitli belirteçler over neoplazilerinde bulunmuştur (95,102,111,119-121). Buna ek olarak OYE’nde ise OYE hattının çukurları ve inklüzyon kistleri sadece bening metaplazi ortak alanları değil aynı zamanda neoplastik ilerleme ortak alanlarıdır (122-124).

### **2.13.2. Fonksiyonları**

OYE materyalleri peritoneal boşluk içinden taşınır ve ovulatuvar döngünün tetiklenmesinde ve tamirinde görev alır. Bu fonksiyonların çoğu üreme döngüsü ile çeşitlendirilir ve bu yüzden bu döngü hormon bağımlı olabilir (125). Bu konu ile ilgili iyi anlaşılmiş olan nokta OYE’i over yüzeyi içerisindeki defektleri tamir edebilmek için çoğalmak zorunda olduğu Osterholzer ve arkadaşları tarafından tavşan oositleri üzerinde direkt olarak gösterilmiştir. Bu çoğalma aktivitesi, ovulasyon zamanından hemen sonra hem ovulasyon alanında hemde uç noktasında gösterilmiştir. Histokimyasal ve elektron mikroskopi tabanlı birkaç raporda over yüzey epitelinin içeriğinde follüküler çatlamaya katkıda bulunan proteolitik enzim ürünlerinin ve lizozom benzeri inklüzyonların varlığı desteklenmiştir (126). Buradaki raporlar over yüzey epiteli kültüründe proteaz salınımının direkt olarak gözlenmesi ile desteklenmişti. Ancak over yüzey epiteli içerisindeki lizozom benzeri granüllerin yoğunluğunun dış görünüşünün tutarsız oluşu, over yüzey epitelinin üzerini örten follüküllerin parçalanabilmesinden dolayı bu yapı hala daha kullanılabilirliği sorgulanmaktadır. Ayrıca çeşitli türlerin elektron mikroskopi çalışmalarında over yüzey epiteli hücrelerinin dejenere olduğu ve ovulatuvar çatlamadan önce follüküler yüzeyin kabaca değiştirilebildiği gösterilmiştir. Buradaki döngüde prostoglandinler (127,128) ve belki

Fas antijenleri tarafından apoptozisin indüklenmesinden dolayı ovulasyonun yakın zamanında over yüzey epitelinin konumunda belli bir kaybın olduğu gösterilmiştir (129,130). Tunika albugineanın bulunduğu alanda stigma incilir ve ovulasyondan sonra tamamen yok olurken, over yüzey epiteli bu bölgede apoptozisi indüklemek için stromal faktörleri salgılaması mümkündür. Ancak olanaklar over yüzey epitelinin tunika albuginea üzerinde değişebilir olduğunu ve ovulasyonun başladığı alanda yüzey stromasının gözden kaybolabilir olduğunu göstermektedir. Over yüzey epitelinin proteolitik kapasitesi ovarian korteksin kırılması gibi ovaryumun yeniden şekillenmesine katkıda bulunabilir. Over yüzey epiteli ekstraselüler matriksin hem epitelyal hem de bağ dokusu tipi bileşenlerinin sentezi tarafından ovarial korteksin yeniden yapılandırılmasına yara iyileşmesi sırasında bağ doku fibroblastları tarafından sergilenen kasılma aktivitesine benzer bir kasılma aktivitesi ile yapıya katılabilir (98,100,131) ve doku tamirinde rol alan miyofibroblasta dönüşen fibroblastlar gibi, kültüre edilen over yüzey epiteli hücreleri yapısında düz kaslardaki aktini bulundurur (132). Bu durum onların her iki epitelyal-mezenşimal fenotipi ile birlikte tutulur ve burada yapılan öneri diğer hücre tipleri gibi over yüzey epiteli hücrelerinin kültür içerisinde yaşatılan dokuda nisbeten sabit fenotipli regeneratif bir yapı elde edilmiştir. Over yüzey epiteli hücrelerinin kasılmaları over yaş ile birlikte overin büzüşmesinde rol oynar ve tipik olarak heliks şeklini almasına ve over yüzey epitelini kaplayan çukurların ve inklüzyon şeklinde kistlerin oluşumuna neden olur.

## 2.14. Postmenopozal Kadınlarda Over Yüzey Epiteli ve Kök Hücre

OYE yaşı ilerlemiş menopozal kadınlarda yavaş yavaş düzleşir ancak daima vardır (45). Apoptotik ve nekrotik hücreler sıklıkla OYE tabakasında sık sık görülmektedir.

İnsan OYE kök hücreleri embriyonik kök hücre özelliklerini devam ettirmektedir. Daha önceki deneyimlerimize dayanarak Bukovsky ve arkadaşları (133), Virant-Klun ve arkadaşları, (134,135) postmenopozal ve erken over yetmezliği (POF) bulunan genç kadınların kazınmış OYE’nde doğal yolla olmayan oosit ve folikül oluştuğunu bildirmiştir.

Kazınmış hücre popülasyonu öncelikle epitel hücrelerinden oluşur ve PKH’ler küçük, yuvarlak, 2-4 µm çaplı sarı boyanan hücrelerdir. Hücreler kan ya da immün sistemle ilişkili hücrelere yanıt vermezler. Benzer hücreler hastaların histolojik kesitlerde de gözlenmiştir. Bu hücreler immünmanyetik olarak izole edilmiştir ve pluripotent embriyonik kök hücre özelliği gösteren transkripsiyon faktörleri ve yüzey antijenlerinin bir kaçı eksprese edilmiştir. Heterolog foliküler sıvı IVF program enstitüsünden elde edilmiştir. Bu hücreler yuvarlak oosit benzeri hücrelere gelişmiştir birkaç oosti spesifik gen eksprese etmiştir. Bu hücrelerin bazıları bir çeşit partenogenetik embriyo oluşturabilen blastosist benzeri yapılar geliştirir (9). Araştırmacılar diğer erişkin doku ve organlarında bulunan küçük embriyonik kök hücrelere benzeyen embriyonik benzeri kök hücreler bulmuşlardır (135-138). Bu küçük embriyo benzeri kök hücreler daha karakterize olarak kalmasına rağmen yaşamın embriyonik evresinden erişkin dokulara kadar devamlılık gösterebilir ve uzun yaşam süresi ile gençleşmede rol oynayabilir. Ayrıca farede embriyonik kök hücrelerin oosit benzeri hücrelere in vitro gelişimi bildirilmiştir (139-143).

Kök hücre benzeri tipler fareler de de bulunmuştur (143). Neonatal ve erişkin fare germline kök hücre hatları immünomanyetik izolasyon sonrasında kurulmuştur. Bu hatlar normal karyotiptedir ve yüksek telomeraz aktivesi eksprese ederler ve birkaç ay kültüre edilebilirler.

Son zamanlarda Tilly ve grubu erişkin fare overler üzerinde önemli deneyler yapmıştır ve oositleri tamamen tükenmiş yaşlı fare overlerinde *Stimulated by retinoik*

*asit (Stra8)* ve *Deleted in azospermia-like (Dazl)* germline spesifik mayoz-bağımlı genlerin yüksek şiddette eksprese edildiğini bulmuşlardır (144). Yaşlı fare overlerinin OYE tabakasında Stra8 geni eksprese eden premayotik germ hücre popülasyonu nadir bulunmuştur ve daha ileri gelişimi başarısız olmuştur. Bu hücreler transpalnte edildiğinde ve genç bir alıcı çevresine bırakıldığında oositlere gelişme kapasitesini korurlar. Premayotik germ hücreleri yaşlı atrofik fare overlerinde devamlılık göstermektedir ancak bu hücrelerin mayoz geçirmesi ve oositlere dönüşümü bloke edilmiştir.

### **2.15.2. Putativ Kök Hücre**

Kazınan OYE hücreleri ve OYE yaymaları içinde çeşitli boyutlarda putativ kök hücrelerin (PKH) iki farklı popülasyonu tespit edilmiştir. Kazınan OYE hücrelerinin içinden eritrositlere benzer boyutlarda ve daha küçük boyutlarda hücreler ayırt edilmiştir. 1-3 µm den daha küçük, çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler (ÇKEBKH) nükleer OCT-4 ve hücre yüzeyi SSEA-4 ile boyanmaktadır ve pluripotent yapıdadırlar. 4-7 µm'den daha büyük hücrelerde OCT-4 sitoplazmik lokalizasyon ve SSEA-4'ün minimal ekspresyon göstermektedir, muhtemelen dokunun progenitör kök hücresidir. 3 hafta OYE kültüründe epitelyal-mezenşimal değişim ile putativ kök hücreler (PKH'ler) oosit benzeri yapılara, partenot benzeri yapılara, embriyonik bodi benzeri yapılara, nöral benzeri fenotipli hücrelere ve embriyonik kök hücre benzeri kolonilere, spontan farklılaşma geçirirken epitel hücreleri mezenşimal fenotip şekline dönüştüğü görülmüştür. Sonuç olarak, OYE hakkındaki bilinen bilgilerin aksine OYE'i oosit ve granüloza hücrelerinin bipotent kaynağıdır. Bu hücrelerin düzensiz bir şekil ile tipik bikonkav disk gibi görünümü ve koyu görünen karakteristik kabarcıklı(köpüklü), parlak olarak gözlemlenmiştir. Bu hücreler diğer hücre tiplerinden kolaylıkla ayırt edilebilir. H.E boyanmış hem insan hem de koyun OYE hücreleri, KKH'lerinin, bol sitoplazmalı epitel hücrelerin, sitoplazması ince bir kenar ile çevirili koyu boyanan



çekirdekli, büyük yuvarlak PKH'leri varlığını ortaya çıkardı. PKH'lerin çekirdekleri epitel hücrelerine nazaran daha koyu boyanmıştır (5).

### **2.15.3. Çok Küçük Embriyonik Benzeri Kök Hücreler (ÇKEBKH'ler)**

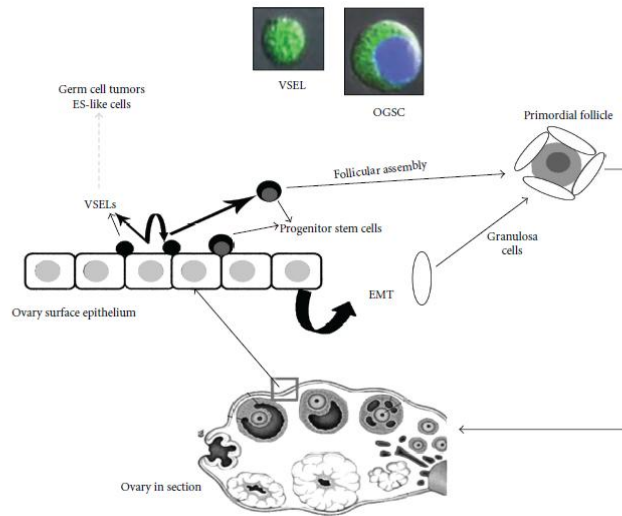
Pluripotent ÇKEBKH'ler (OCT4<sup>+</sup>, SSEA1<sup>+</sup>, Sca1<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>) ilk kez Ratajczak grubu tarafından erişkin fare dokularında buldukları bildirilmiştir. (150,151). Zuba-Surma ve arkadaşları, tarafından da beyinde, böbreklerde, kaslarda, pankreasta, gonadlarda, kordon kanında ve kemik iliğinde çok sayıda bulunduğu bildirilmiştir (9,134,152,153). Bunlar yüksek telomeraz aktivitesine sahip diploid hücrelerdir, yaşla birlikte azalan diğer pluripotent (Rex-1, Nanog, SSEA, and Klf-4) ve germ hücre (Mvh, Stella, Fragilis, Nobox and Hdac-6) belirtecileri eksprese ederler (154). Embriyonik kök hücreler gibi MHC klas I ve HLA-DR antijenleri eksprese etmezler ve CD90<sup>-</sup>, CD105<sup>-</sup> ve CD29<sup>-</sup> gibi mezenkimal kök hücre belirteçleri için negatiftir. Boyutları 3-5µm'dir ve büyük nükleositoplazmik oran yoğun ökromatini olan büyük çekirdek ve OCT-4 ve Nanog promoterları için açık kromatin yapıları olan hücrelerdir (155). mRNA'da OCT-4 ekspresyonu ve ÇKEBKH'lerde protein seviyesi sekans spesifik primerler kullanarak doğrulanmaktadır. ÇKEBKH'ler in vitro üç germ yaprağına farklılaşabilme yeteneğine sahiptir ancak EK hücrelerden farklı olarak ÇKEBKH'ler ne blastosist gelişimi boyunca tamamlanır ne de immünyetersizliği olan farelerdeki gibi teratomlar oluşturur (156). Besleyici katmanlar bu hücrelerin yayılması için yapılmaktadır ancak bu hücreler gelişimsel olarak önemli olan bazı genleri değişen metilasyon seviyelerinden dolayı kurulan embriyonik hücre hatları kadar kolay kendilerini yenileyemezler. Benzer şekilde ÇKEBKH'ler CD133, lin, CD45 gibi belirteçler kullanılarak flow sitometri ile aynı zamanda farklı santrifüjleme yöntemleri kullanarak insan umbilikal kord, dolaşan periferik kan ve erişkin kemik iliğinden izole edilmiştir (157,158).

ÇKEBKH'ler epiblast evresinin pluripotent kök hücrelerinden gelmektedir ve pasif kök hücre popülasyonu doku oluşturan kök hücrelerin (DOKH) yedeği olarak görev yapan pasif kök hücre popülasyonuyken gelişimin erken evrelerinde gonadları da

kapsayan çeşitli vücut organlarında depolanmışlardır. Kök hücrelerin bu iki popülasyonu (ÇKEBKH'ler ve DOKH'ler) birlikte hayat boyunca doku yenilenmesi, homeostaz ve yaralanma sonrası rejenerasyondan sorumludurlar. Bu iki kök hücre popülasyonunun birlikte varoluşu Li ve Clevers tarafından önerilmektedir (159). ÇKEBKH'ler DNA label retainingdir (örneğin BrdU), doku oluşturan kök hücreler aktif olarak bölünürken düşük metabolik durumlu pasif kök hücrelerdir ve zamanla DNA etiketi korumazlar. ÇKEBKH'ler çok iyi hareket ederler, SDF-1 gradiyentine yanıt verirler ve rejenerasyon ve homeostaza neden olan herhangi yaralanma durumunda dolaşıma katılırlar. Ayrıca kanser gelişiminin germline hipotezini destekleyen kayıp bir halka olarak kabul edilirler [159,160]. ÇKEBKH'lerin klinik potansiyeli flow sitometri ile kordon kanı ya da kemik iliğiden izole edilerek henüz ortaya çıkarılmıştır. Miyokard enfarktüsü, inme, cilt yanıkları, nöral rejenerasyon v.b gibi çeşitli hastalık modellerinde bu hücreler 24 saat içinde dolaşıma katılırlar. Miyokard rejenerasyonu için ÇKEBKH'ler sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonunu (SVEF) arttırmak ve miyokard hipertrofinin azalması için önemlidir. Yaşla birlikte sayıları azaldıkça yaşla ilgili hastalık belirtilerinde rejenerasyon sonuçları verimsiz olmaktadır (152).

### 2.15.3.1. Memeli Gonadlarında ÇKEBKH'lerin Lokalizasyonu

ÇKEBKH'lerin varlığı ilk kez doğal somatik nişlerinde prostat kanserli hastalardan ve postmenopozal kadınlardan toplanan testiküler ve ovaryan dokusunda in situ ile gösterilmiştir. Bu ÇKEBKH'ler seminiferöz tübüllerde bazal membrana yakın hücrelerin bazal kısmında lokalizedir ve over yüzey epiteli hücrelerinin arasına yerleşmiş olarak bulunur (5). Gonadlardaki ÇKEBKH'ler kemik iliği ve kordan kanındakilere benzer şekilde kırmızı kan hücrelerinden daha küçük, yüksek nükleo-sitoplazmik orana sahip, hematoksilenle koyu boyanan, DAPI ile kolay boyanmayan, OCT4A, SSEA-4, Nanog, Sox-2, Rex gibi pluripotent, primordiyal germ hücreleri gibi STELLA, FRAGILIS, ÇKEBKH'ler gibi SCA-1, CD133 ve germ hücreleri gibi VASA ve DAZL gibi spesifik belirteçler eksprese eden sferik hücrelerdir bu hücreler doğada sessizdir ve progenitörleri oluşturmak için kendilerini yenilerler. Hızlıca bölünürler ve bazen kist gibi görünürler. Farklılaşmaları daha fazladır ve gametleri oluşturmak için mayoz geçirirler (152). Bhartiya ve ark., tarafından over ÇKEBKH'leri tavşan, koyun ve maymun (5) ve fare overlerinden (161) kazınan over yüzey epitelinde ve testiküler seminiferöz tübüllerin bazal epitelinde tespit edilmiştir ve ÇKEBKH'ler erişkin fare gonadlarında (162) da gözlenmiştir. Bu yüzden gonadal dokudaki ÇKEBKH'lerin varlığı evrimsel olarak korunuyor gibi görünmektedir.



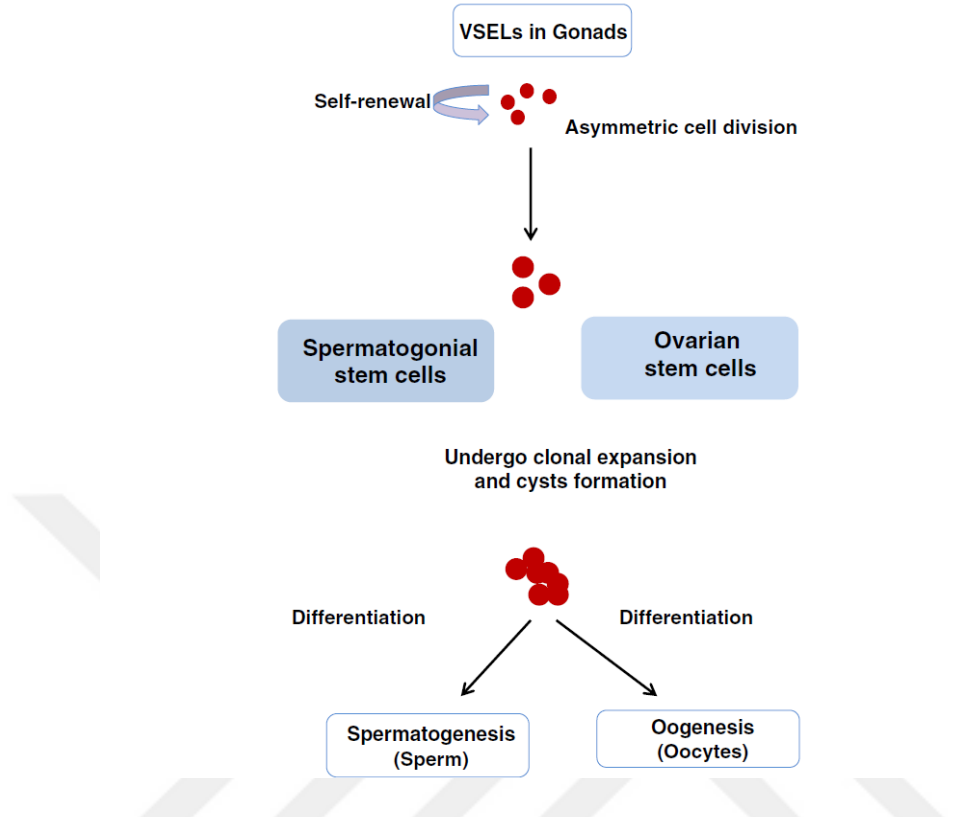
Şekil 2.15.3.1.1.: Memeli gonadlarında ÇKEBKH'ler ve OKH'lerinin fonksiyonu (163)

### 2.15.3.2. Erişkin Over dokusundaki ÇKEBKH'ler

Tavşan, koyun, maymun ve perimenopozal kadınlardan dikkatli bir şekilde kazınan over yüzey epitelinde ÇKEBKH'ler (1-3  $\mu\text{m}$ ) ve ayrıca ovaryan germ hücreleri (OGSC'ler 5-7  $\mu\text{m}$ ) tanımlanmıştır. ÇKEBKH'ler KKH'lerinden daha küçüktür ve yüksek nukleositolazmik oran, yoğun kromatin, nukleer OCT-4, hücre yüzeyinde SSEA-4 ve diğer pluripotent belirteçler vardır (5). Bhartiya ve arkadaşları., kazınmış OYE'de H&E boyanan kök hücrelerin koyu boyanan çekirdekli OGKH'lerinin görüntülenmesi sonucunda,  $A_{\text{koyu}}$  SKH'lere benzer kök hücre biyolojisi gösterir ve 5-metil sitozin için nukleer boyama gösterir . Bu kök hücrelerin üç haftalık kültürü putatif oosit benzeri yapılar, embriyo benzeri yapılar, nöron benzeri yapılar, EK benzeri koloniler ve embriyonik body benzeri yapılar oluşturur ve bu yapılar pluripotent ve totipotent özellik gösterir (5).

### 2.15.3.3. Gametogenez Sırasında ÇKEBKH'lerin Rolü

Gametogenez, genetik bilginin nesilden nesile aktarılmasını sağlayan, gonadlarda diploid germ hücrelerinden haploid gametlerin oluştuğu bir süreçtir ve böylece türlerin devamlılığı sağlanmış olur. Epiblast evresindeki embriyonun primordiyal germ hücreleri (PGH) farklılaşmamış gonadlarda gonadal kabartı içine kolonize olurlar ve dişi ya da erkek germ hücre prekürsörlerine farklılaşırlar. Bu PGH'ler muhtemelen erişkin gonadlarda ÇKEBKH'ler olarak kalırlar ve yaşam boyunca asimetrik bölünme geçirirler ve kendini yenileyen ve doku oluşturan gonadal kök hücreleri yani testiste  $A_{\text{koyu}}$  SKH'leri ve overde OGKH'leri oluşturan hücreler olarak kalırlar (152).



Şekil 2.15.3.3.1. Memeli gonadlarındaki kök hücrelerin varlığının şematik sunumu (241)

#### 2.15.3.4. Postnatal Oogenez

Yıllarca süren araştırmalardan sonra bile üreme biyologları doğumda over folikül sayılarının sabit kalıp kalmayacağı tartışacaktır. Foliküllerin sayısındaki dramatik düşüş yaş ve menopozla ilişkilendirilmiştir ya da testisteki sperm gibi erişkinlik boyunca folliküller kendini yenilemeye devam eder (son zamanlarda Tilly ve Woods postnatal oogenez lehine (164) ve Notarianni’de yumurta sayılarının sabit olması lehine derleme yayımlamıştır (165).

ÇKEBKH’ler tavşan, koyun, maymun ve perimenopozal insan overlerinin kazınmış over yüzey epitelinde olduğu rapor edilmiştir (5). Szotek ve grubu OYE’ndeki kök hücre popülasyonunu progenitor ovaryan germ kök hücreler olan (OGKH), asimetrik etiket kalmasıyla bu hücreleri 4 aydan fazla bir süre etiketleyen ve  $A_{koyu}$  SKH’lerle karşılatıran bir çalışma yayınlamıştır (166). Buna ek olarak kazınmış

OYE'ndeki ÇKEBKH'lerin biraz daha büyük ve daha çok sitoplazması vardır ayrıca sitoplazmik OCT-4 ve minimum SSEA-4 ekspresyonu da gösterirler. OGKH'leri sonrasında epitelyal hücrelere epitelyal mezenkimal dönüşüm ile gelişen pregranüloza hücreleri tarafından çevresi sarılır. Bhartiya ve arkadaşları PF oluşumu ile sonuçlanan benzer fikri yakın zaman önce önermiştir (5).

Byskov ve grubu (167) postnatal hayatın ilk iki yılında sonrası erişkin insan overlerinde oogonia varlığı için kanıt olmadığını buldu. Ancak arşivlenmiş dokular formalinle fikse edilmiştir ve 30-40 µm'luk kesitler immun boyama için kullanmıştır. Bu şekilde ÇKEBKH'ler asla tespit edilemez ve negatif sonuçlar verebilir (168). Fiksatif seçimi ve immünlokalizasyon sonuçları üzerine etkileri daha önce tartışılmıştır (169,170). Bu sonuçların aksine tavşan, koyun ve insan overlerden kazınmış yüzey epiteli üzerine yapılan konfokal mikroskop çalışmaları OCT-4 (hem nükleer hem de sitoplazmik) ve hücre yüzeyi SSEA-4 ile boyanan kök hücrelerin farklı popülasyonunun varlığını göstermiştir. Benzer şekilde Zhang ve arkadaşları (171) erişkin fare overlerinde mitotoik olarak aktif olmayan dişi germline progenitörlerin varlığını deneysel kanıtlarla göstermiştir. Ancak progenitörlerin izole edilmesi için kullanılan DDX1 hücre yüzey belirtecinin seçimi bir sorundur (172,173). Aslında, çalışmalarında bir belirteç olarak DDX1 10-15 µm'lik hücreler için kullanırken ÇKEBKH'ler 3-5 µm aralığındadır. Bundan dolayı DDX1 kullanmaktansa, farelerde SSEA-1 (insanda SSEA-4) pluripotent over kök hücrelerinin izole edilmesi için daha iyi bir hücre yüzey belirtecidir.

İlginç bir şekilde Byskov ve arkadaşları (167) Liu ve arkadaşlarının (174) sonuçlarını makalelerinde tartışmıştır ve ne erken mayoz spesifik ya da oogenez spesifik mRNA'lar ne de oogonya veya mayoz için immünohistokimyasal belirteçlere kanıt yoktur, ayrıca erişkin insan overlerinde oogonya varlığı için kanıtta yoktur. Ancak RT-PCR ve immünlokalizasyon çalışmalarının sonuçları daha yakından incelediğinde erişkin overlerde Oct-3/4, DMC1 ve SCP3 göstermektedir (fetal overlerle karşılaştırıldığında daha az olmasına rağmen göz ardı edilemez). RT-PCR datalarında yüksek ekspresyona sahip hücrelerle düşük ekspresyona sahip hücreler karşılaştırıldığında aralarında ayrımın başarısız olduğunu göstermektedir. Bu kaygılar ışığında yetişkin insan over kök hücresi ve oogonya varlığının yeniden değerlendirilmesi gerekir. Bu farklılıklar ve

teknolojik kısıtlamara bağlı belirsiz biyolojik sonuçların çözümlenmesi gerekmektedir ve kök hücrelerin varlığı ve erişkin overlerindeki postnatal oogenezin yakın zamanda daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

## **2.16. Over Yüzey Epitelinden Eksprese Olan ve Farklılaşmada Rol Alan Belirteçler**

### **2.16.1. OCT-4**

OCT-4, OCT-3 veya POU5F1 olarakta adlandırılmaktadır ve memeli gelişiminin başlangıcında ve olgun oositlerde maternal transkript olarak (175) ve blastosistin iç hücre kitlesinde bulunmaktadır. Aynı zamanda primordiyal germ hücrelerinin sağkalımı için gereklidir (176). Oct-3/4 ekspresyonu germ hücre tümörleri ve gonadoblastoma ile de ilişkilidir. OCT-4 geni kromozom 6 üzerinde lokalizedir ve beş ekzonu vardır. OCT-4A ve OCT-4B iki ana alternatif splicing tarafından kodlanır. OCT-4A'da sadece ekzon 1 vardır. 360 aa ve 265 aa'lık iki transkript oluşur C-terminalinin 225 aa'i tanımlayıcıdır. OCT-4A pluripotensiden sorumluyken OCT-4B sorumlu değildir (178). OCT-4A, PKH'lerde eksprese olur ve çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. OCT-4B, bir çok pluripotent olmayan hücrenin sitoplazmasında bulunur ve fonksiyonu kesin olarak tanımlanmamıştır Lee et al. 2006; Atlasi et al. 2008.

Bunun yanı sıra embriyonik kök hücreler, germ hücreleri, primordiyal germ hücreler, germ hücre tümörlerinde eksprese olmaktadır. OCT-4 aynı zamanda ÇKEBKH'lerde, genital kabartı bölgesindeki germ hücrelerinde ve erişkin somatik dokularda/organlarda eksprese olmaktadır. (155,7)

Somatik kök hücrelerdeki OCT-4 üzerine yayımlanan literatür birkaç psödojen ve alternatif spliced transkriptten dolayı kök hücre araştırmacılarının kafasını karıştırmaktadır (179-181). Bundan dolayı RT-PCR için primerlerin tasarlanması ve uygun antikorların seçiminde spesifik transkriptlerin tespit edilmesi için dikkatli olunmalıdır. Ayrıca OCT-4 antikorunun dikkatli seçimi pluripotent kök hücrelerin tanımlanması için gereklidir (180). Bhartiya ve ark., tarafından poliklonal antikor

kullanarak nükleer OCT-4 ile ÇKEBKH'lerin, sitoplazmik OCT-4 ile doku oluşturan kök hücreler yani spermatogonyal kök hücre (SKH) ve over germline kök hücrelerinin (OGKH) belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Erişkin gonadlarında ve diğer vücut dokularında OCT-4 pozitif ÇKEBKH'lerin varlığı Jaenisch'in grubu tarafından daha önce önerilen aktif bir pluripotensi OCT-4 ağının sadece embriyonik ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinde var olduğu fikriyle çelişmektedir. Homeostaz ve rejenerasyonda anormallik olmayan 8 haftalık farelerin bağırsak, kemik iliği, saç folikülü, karaciğer, MSS v.b çeşitli dokularda *OCT-4* geni susturulduktan sonra onlar tarafından gözlenmiştir. Sonuçlara dayanarak onlar OCT-4'ün somatik hücre fonksiyonu için vazgeçilmez olduğunu önermişlerdir. Doku spesifik OCT-4 silinmesine rağmen 8-10 haftalık farelerde rejenerasyon ve homeostazda gözlemlenmiştir(152).

#### **2.16.2. SSEA-4**

Evre Spesifik Embriyonik Antijen-4 (SSEA-4), ilk kez insan teratokarsinom hücrelerinde globolipid epitoplari olarak bulunmuştur. Reiji Kannagi ve ark. 1983'te SSEA-4'ü tanımlamışlardır. Oosit ve insan EK hücreleri globo serisi glikolipid antijenlerini eksprese eder. SSEA-3 ve SSEA-4 insan teratokarsinom hücrelerine özgü bir globolipidin epitoplari dır (182). Globo serisi bir gangliosid olan SSEA-4, insan embriyonik karsinoma hücreleri ve embriyonik kök hücreler için bir belirteç olarak kullanılmaktadır (182,183). Daha sonraki çalışmalarda OCT-4 ve SSEA-4'ü kapsayan embriyonik kök hücre ilişkili antijenler kordon kanından tüevlenen erişkin kök hücrelerinde, insan olmayan primatların farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerinde, plasentada, kemik iliğinde, adipoz dokuda, dermiste, kalpte ve dental pulpada bulunmuştur (184-186). SSEA-4 konfokal z-stack analizi sonucunda koyun over kistlerinde hızlı proliferasyon ve tamamlanmamış sitokinez nedeniyle kistleri içeren hücreler arasında hücre yüzeyinde devamlılık göstermektedir (152). Virant-klun I ve ark. 2013, SSEA-4 pozitif hücreleri magnetic-activated cell sorting (MACS) ve fluorescence-activated cell sorting (FACS) ile izole etmişlerdir (187).



### 2.16.3. VASA

VASA (DDX4 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polipeptid 4'te olarak adlandırılan 724 aminoasitten oluşur ve ilk olarak *Drosophila*'da tanımlanmıştır, farede Mvh olarak bilinir ve ATP bağımlı RNA helikaz ailesinin DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box ailesinin bir üyesidir (12,172). Helikaz aktivitesi germ hücre göçü ve gelişimini kapsayan *nanos* gibi en az iki mRNA'nın translasyonu için gereklidir (188,189). VASA, göç eden primordiyal germ hücrelerinde sitoplazmik olarak eksprese olmaktadır ve gelişimin farklı evrelerinde insan germ hücrelerinde eksprese olmaktadır (172). VASA, 1. Trimester overlerinde incelenmemiştir ancak 2. trimester overlerindeki primordiyal oositlerin sitoplazmasında lokalizedir (190). VASA, sıgırdaki primordiyal germ hücreleri, germ hücrelerinin farklılaşmasının erken evrelerinde karakterizedir ve somatik dokulardan uterus, kalp, dalak, bağırsak, karaciğer, akciğer, meme bezleri, kas, testis, over ve immatur oositte incelenmiştir ancak sadece testis ve overde bulunmuştur. Farede primordiyal foliküllerden ant antral foliküllerden elde edilen oositlerde tespit edilmiştir(191). Ayrıca VASA epitelyal epitelyal over kanserlerinde de eksprese olmaktadır ve G2 kontrol noktasını kaldırmaktadır (192). Erişkin insanlarda testis ve overde VASA ekspresyonu yüksektir(172). Overde VASA ekspresyonu oositte yüksektir ancak oogenez boyunca devamlılık göstermektedir. VASA, RNA bağlama fonksiyonu olduğuna inanılan bir RGG motifinin çoklu tekrarları ile glisinden zengin N- terminaline sahiptir. VASA fonksiyonu erişkinde gametogenez boyunca gerekli değildir ancak embriyogenezde germ hücre hatlarının farklılaşması için önemlidir. Gastrulasyonda VASA proteini sadece germ hücrelerinde ve sitoplazmalarında güçlü bir şekilde saptanmıştır ve hem dişilerde hem de erkeklerde embriyogenez boyunca korunmuştur(8).

VASA geni, *C. Elegans*, *Xenopus*, *Drosophila*, zebrafish, fare, sıçan ve insanı kapsayan omurgalı ve omurgasızlarda korunmuştur (172).

#### 2.16.4. C-KİT

C-KİT, Mast/kök hücre büyüme faktör reseptörü (SCFR), proto-onkogen C-KİT, tirozin protein kinaz Kit ya da CD117 olarak bilinen, 4q12 kromozomu üzerinde lokalize olan *C-KİT* geni tarafından kodlanan bir proteindir. Hematopoetik kök hücre, mast hücreleri, belirli epitelyal bazal hücreler, meme lümenine ait epitel, germ hücreleri, melanositler ve Cajal'ın interstisyel hücrelerinin gelişiminde önemli rol oynar (193). KİT ilk kez Alman biyokimyacı Alex Ullrich tarafından 1987 yılında kedi sarkom viral onkogeninin hücresel homoloğu olan C-KİT olarak tanımlanmıştır (194). Hematopetik kök hücre belirteci C-KİT, langerhans adalarının gelişiminde ve fonksiyonunda özellikle  $\beta$  hücrelerinin proliferasyonunda, olgunlaşmasında ve hayatta kalmasında önemli rol oynar (195). Li ve arkadaşları erken ve gestasyonun ortasında insan fetal pankreasının gelişimi boyunca eksprese edildiğini bildirmiştir (196).

Farklılaşma kümelerinin (CD) molekülleri, hücre tiplerinin tanımlanması ve hücrenin farklılaşması ve aktivasyon için kullanılan yüzey üzerindeki belirteçlerdir. C-KİT, kemik iliğinde hematopetik (kan) progenitörlerinin belirli tiplerini tanımlamak için kullanılan önemli bir hücre yüzey belirteçidir. Spesifik olması hematopoetik kök hücre (HKH), multipotent progenitörler (MPP) ve yaygın myeloid progenitörleri (YMP) yüksek seviyelerde C-KİT eksprese eder. Yaygın lenfoid progenitörleri (YLP) C-KİT'i düşük seviyelerde eksprese eder. C-KİT aynı zamanda timusta erken timosit progenitörleri olarak tanımlanmıştır. Erken T lineage progenitörleri (ETP/DN1) ve DN2 timositler, C-KİT'i yüksek seviyelerde eksprese eder. C-KİT aynı zamanda prostat kök hücre belirteçidir (197). Ayrıca mast hücreleri, derideki melanositler ve Cajal'ın interstisyel hücreleri ve sindirim kanalı C-KİT eksprese eder. Embriyogenez sırasında C-KİT sinyali, melanoblast ve/veya melanositlerin göçü, proliferasyonu ve farklılaşmasında önemlidir. Postnatal kutanöz melanogenezin korunmasına katkı sağlar (198,199).

C-KİT hem hematopetik kök hücrelerin hem de diğer hücre tiplerinin yüzeyinde eksprese edilen sitokin reseptörüdür. C-KİT, tirozin kinaz tip III bir reseptördür. Bu reseptör kök hücre faktörüne (KHF) bağlandığında intrinsik tirozin kinaz aktivitesini aktive eden bir dimer formu oluşturur ve hücrede sinyalleri uyaran sinyal iletim

moleküllerini aktive eder. C-KİT aracılığıyla sinyaller hücre sağ kalımında, proliferasyonda ve farklılaşmada rol oynar.

Bu gendeki aktif olan mutasyonlar gastrointestinal stromal tümörler (GIST'ler) , testiküler seminom, mast hücre hastalıkları, melanom, akut myeloid lösemi ile ilişkili iken inaktif olan mutasyonlar genetik bozukluk piebaldizimle ilişkilidir (200). Tümör hücreleri ile ilgili olarak, C-KİT gastrointestinal tümörlerde pozitifdir ancak melanom, anjiyosarkom ve Kaposi sarkom (KS)'u içeren birkaç mezankimal tümörde aşırı ekspresyonu da bildirilmiştir (201).

C-KİT bir proto onkogendir. Bu genin mutasyonu ve aşırı ekspresyonu kansere neden olabilir (202). C-KİT pozitif iç şekilli hücreler, deri remodeling ve rejenerasyonunu kapsayan, kan kapillerleri ve perifoliküler kılıfları ile bağlantılı olan erişkin derilerinde de tespit edilmiştir. Bu hücreler literatürde dendrositler, dendritik hücreler ve telositler olarak tanımlanmıştır. C-KİT pozitif endotel anjiyosarkomlara benzeyen fetal endotelyal hücre fenotipine tümör hücrelerinin bir geri dönüşümü gösterir (203).

#### **2.16.5. CK-18**

Sitokeratin 18 (CK-18) , tek katlı ya da birçok basit epitelyal dokularda primer olarak bulunan 45 kDa ağırlığında asidik tip I ara filament proteinidir. *CK-18* geni, 12q13 kromozomu üzerinde lokalizedir ve 3,791 bp uzunluğundadır. CK-18, tamamlayıcı tip II keratin partneri CK-8 ile birlikte karaciğer, akciğer böbrek pankreas, gastrointestinal sistem, meme bezi, gibi erişkin epitelyal organlarda ve bu dokulardan oluşan kanserlerde eksprese edilir. Ayrıca koyun overinde over yüzey epitelinde eksprese edilmektedir (5). CK-8 yokluğunda, CK-18 proteini degrades olur ve keratin ara filamentleri oluşmaz. Bu CK-8 cDNA klonu izole edilen fare fibroblastları ile yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (204).

CK-18'in bilinen fonksiyonu, hücreye uygulanan dış basınca direnç, sitoplazmaya hücre içi esnek iskelet ve mitrokondriyal yapıların korunmasını sağlamaktır. CK-18 apoptoz, mitoz, hücre döngüsü ilerlemesi ve hücre sinyali gibi

hücrel olaylarda önemlidir. Bunun yanı sıra CK-18 yıllardır tanısal histopatolojik belirteç olarak bilinir ve tümör hücre davranışında önemi vardır (204).

#### **2.16.6. ZP-4**

Zona pellusida-4, ZPB olarakta bilinmektedir. İnsanlarda kromozom 1q43 üzerinde lokalizedir ve ZP-4 geninden kodlanır. Sıçanlarda kromozom 17q12.1 üzerinde lokalizedir (205). İnsanda ZP-1, ZP-2, ZP-3 ve ZP-4 olmak üzere dört zona pellusida glikoproteini eksprese olur. ZP-4'ün sperm bağlama özelliği vardır (206).

#### **1.16.7. PTEN**

Fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN), insanlarda *PTEN* geni tarafından kodlanan bir proteindir (207). Bu genin mutasyonları birçok kanserin gelişmesinde rol oynar. Pten ilk kez bağımsız bir grup tarafından keşfedilmiş ve primer insan kanserlerinde mutasyona son derece duyarlı bir lokus olan, insan kromozomu 10q23 üzerinde sık sık tekrarlayan tümör süpresör gen kaybı olarak tanımlanmıştır (208). PTEN, fosfataz protein ürününün eylemi aracılığıyla tümör süpresör bir gen olarak işlev görür. Bu fosfataz, çok hızlı büyüyen ve bölünen hücreleri önleyerek hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alır (207). PI3K'ın negatif düzenleyicisi olduğu ve primordiyal folikül aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (209,210). PTEN, PI3K'nın negatif düzenleyicisidir ve fosfatidilinositol 3-kinazın bir ürünü olan, fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (PIP3) içeren, hem lipid hem de peptid substratları bilinen çift yönlü bir spesifik fosfataz kodlar. Büyüme uyarıcıları ile hücrelerin büyümesi üzerine, sınıf 1 PI3K aile üyeleri hayatta kalma, büyüme ve proliferasyona teşvik eden ikinci bir mesaj ile fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP2)'in fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3)'a dönüşümünü katalizler. Özellikle PTEN, PIP3 üzerinde 3-fosfat PIP2'yi oluşturmak için hidrolize olur ve böylece PIP3 aracılı downstream sinyal negatif düzenlenir. PTEN yokluğunda, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat(PIP3) protein kinaz B(Akt) sinyalinin artmasına neden olur (211).

PTEN, hücre polaritesini ve göçünü, hücre döngüsü, hücre ölümü kapsamaktadır böylece sitoiskelatal reorganizasyona neden olan dış membran fosfolipidleri ve yolakları arasında potansiyel bir bağ sağlar (212). Adhikari ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada PTEN inhibitörlerinin primordiyal folikülleri aktive edeceğini, büyümelerine izin vereceğini ve foliküllerin FSH'a yanıt verebileceğini düşünmüşlerdir (211). Yapılan bir başka çalışmada da PTEN inhibitörlerinin hem neonatal fare overlerinde hem de insan over kortikal dokularındaki primordiyal folikülleri aktive ettiği gösterilmiştir Ayrıca aktive edilen bu primordiyal foliküllerin olgun foliküllere geliştiği ve ovariectomy yapılan farelerin böbrek kapsülü içerisine transplantasyonu sonrasında fertilize olabilen oositler meydana getirdiği aynı grup tarafından bildirilmiştir . Ayrıca PTEN'in ve Tsc1/mTOR gibi bazı inhibitör sinyallerin olduğu gösterilmiştir. Bu süreç dormant fazdaki primordiyal foliküllerin ve onların erken aktivasyonunu, erken tükenmesi ve POF'u önler. Bu supresör ve aktivatör sinyallerinin koordineli eylemi folikül büyümesinin başlaması ve devam etmesi için gereklidir (213).

PTEN bir tümör supresör gen olarak insan kromozomu 10 üzerindeki bir bölgede lokalizedir ve bir çok insan tümöründe delesyona uğramıştır (213,214). Bu lokustaki monoallellik mutasyonların sıklığı sporadik tümörlerde(endometrial karsinom, glioblastoma ve prostat kanserini kapsayan) %50-80 ve meme, kolon ve akciğer tümörlerinde %30-50 olarak tahmin edilmektedir. PTEN'in tamamının kaybı, endometrial kanserde ve glioblastomalarda yüksek frekanslarda görülmektedir ve ileri derecede kanser ve metastazlarla ilişkilidir (215). PTEN kaybının BRCA1 eksikliğinden kaynaklanan meme kanserlerinde yaygın bir olay olduğu 2008 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (216). PTEN'in bir tümör supresör olarak önemi, gelişimsel bozukluklar, nörolojik defektler, çoklu hamartomlar ve meme, tiroid, endometrial kanser ve beyin tümörleri risklerinin artması ve germline mutasyon çalışmaları ile daha fazla desteklenmiştir. PTEN genindeki germline mutasyonlar, Cowden hastalığına neden olur ve deri, sindirim, meme ve tiroidin çoklu hamartomları ile karakterize olan nadir otozomal dominant sendroma neden olur (217).

Bir çalışmada fare modelinde başarılı bir şekilde üretilen yavruların primordiyal foliküllerini aktive etmek için PTEN inhibitörleri kullanılmıştır (211). Ayrıca çalışmalar

PTEN ve Tsc1/mTOR gibi bazı inhibitör sinyallerin olduğu gösterilmiştir. Bu süreç dormant fazdaki primordial foliküllerin ve onların erken aktivasyonunu, erken tükenmesi ve POF'u önler. Bu supresör ve aktivatör sinyallerinin koordineli eylemi folikül büyümesinin başlaması ve devam etmesi için gereklidir (213).

### 2.16.8. PI3K

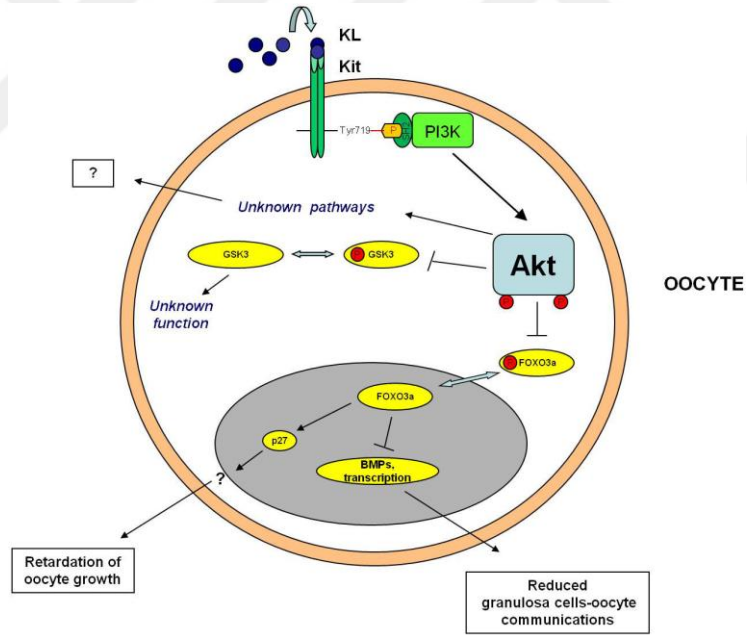
Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz (PI3K), aynı zamanda fosfatidilinositol-3-kinaz, fosfatidilinositid 3-kinaz, PI-3-kinaz, PI(3)K'lar veya PI-3K'lar olarak adlandırılmaktadır. PI3K süperalesinin üyeleri protein serin/treonin kinazdır. PI3K, kanserde dahil olmak üzere, hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması, motilite, sağkalım ve sırayla kansere katılan hücre içi gibi hücre fonksiyonlarında yer alan enzim ailesidir. Bu fonksiyonların çoğu protein kinaz B'nin (PKB veya AKT) aktive olması için gerçekleşir. PI3K'lar, fosfatidilinositolün (PtdIns) inositol halkasının 3 hidroksil grubunu fosforilleyen hücre içi sinyal dönüştürücü enzimlerle ilişkili bir ailedir (217). Yolak PIK3CA ve PTEN onkogenleri ile kanser tümörlerinin duyarsızlığında insülin ve IGF1 ilişkilidir (218-219). PI3K'lar bir dizi fosforilasyon olayları aracılığıyla glukoz alımını düzenlemek için İRS (İnsülin Reseptör Substrat) ile etkileşir. Bundan dolayı Diabetes mellitus'ta PI3K sinyalinin rolü çok önemlidir.

PI3K ailesi Class I, Class II ve Class III olmak üzere üç farklı sınıfa ayrılır. Sınıflandırmalar, primer yapı, düzenleme ve *in vitro* lipid substrat özelleşmesine dayanır. Class I PI3K'lar, Fosfatidilinositol 3-fosfat (PI(3)P) Fosfatidilinositol (3,4)-bifosfat (PI(3,4)P<sub>2</sub>) ve Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) üretiminden sorumludur ve düzenleyici katalitik bir subünitten oluşan heterodimerik moleküllerdir (220). PI3K'lar G protein bağımlı reseptörler ve tirozin kinaz tarafından aktive edilir. Class II ve III PI3K'ların yapıları ve işlevleri Class I' den farklıdır. Class II üç farklı katalitik izoformdan (C2 $\alpha$ , C2 $\beta$ , ve C2 $\gamma$ ) oluşmaktadır ancak Class I ve III'den farklı olarak düzenleyici proteinleri yoktur. Class III, PI'dan PI(3)P meydana getirir ve yapısı Class I'e benzerdir. Primer olarak proteinler ve veziküllerin haberleşmesinde rol oynar (221).

Çeşitli 3-fosforillenmiş fosfoinositidler, PX domeini, plekstrin homoloji domeini (PH domeini), FYVE domeini ve diğer fosfoinositid bağlayıcı domaini içeren çeşit çeşit bir grup sinyal proteini olan, mekanizmadaki PI3K kinazların (PtdIns3P, PtdIns(3,4)P2, PtdIns(3,5)P2 ve PtdIns(3,4,5)P3) fonksiyonu ile üretilerek çeşitli hücrel membranlardan alınır.

Birçok kanserde, Class IA PI 3-kinaz p110 $\alpha$  mutasyona uğrar. Bu mutasyonların çoğu kinazın daha çok aktive olmasına neden olur. PI3K kinaz aktivitesi bundan dolayı hücrel dönüşüm ve kanser gelişimine önemli derecede önemlidir.

Class II PI3K kinaz ailesinin üyelerinin duyarlılığının azaldığı gösterilmesine rağmen tüm PI3K kinazlar wortmannin ve LY294002 ilaçları tarafından inhibe edilir (217).



Şekil 2.16.8.1.: PI3K/AKT kaskadı ve oosit büyümesinin düzenlenmesi (18)

### 2.16.9. AKT

Protein Kinaz B (PKB) olarak bilinen AKT, glukoz metabolizması, apoptoz, hücre proliferasyonu, farklılaşması, transkripsiyonu ve hücre göçü gibi çoklu hücresel süreçlerde rol oynayan serin/treonin spesifik protein kinazdır (222). AKT, hücre sağkalım ve metabolizmayı, Nükleer Faktör  $\kappa\beta$ , Bcl-2 ailesinin proteinleri ve murine double minute 2 (MDM2) ile düzenler (14). AKT hücre siklusunda da rol oynamaktadır. Çeşitli şartlarda AKT aktivasyonunun G1 ve G2 fazlarında hücre siklus arrestinin üstesinden geldiği bilinmektedir (223,224). Glikojen sentez kinaz 3 (GSK-3) AKT'ın fosforilasyonu ile inhibe edilebilir.

AKT gen ailesinin 3 üyesi vardır. AKT1, apoptoz sürecinin inhibisyonu ile hücre sağkalım yollarında görev alır. Ayrıca iskelet kası hipertrofisi ve genel organ büyümesinde meydana gelen protein sentez yollarını indükler. AKT1 bir çok kanser tipinde majör rol oynar. AKT1, anjiyogenez ve tümör gelişiminde de rol oynar. AKT1 yokluğunda farede fizyolojik anjiyogenez inhibe edilir, patolojik anjiyogenezi artırır ve tümör büyümesi deri ve kan damarlarında matriks anomaliler ile ilişkilidir (225,226). AKT2, insülin sinyal yolağında önemli bir sinyal molekülüdür. Glukoz transporter 4 (GLUT4) insülin indüklenmiş translokasyonu aracılığıyla glukoz transportunun gerçekleşmesi için gereklidir. AKT1 null AKT2 normal olan farede glukoz homeostazı stabildir ancak hayvanlar daha küçüktür ve büyüme AKT1 için daha anlamlıdır. AKT3'ün rolü henüz tam olarak bilinmemektedir büyük bir çoğunlukla beyinde eksprese edilir. AKT3 eksikliği olan farelerin daha küçük beyni sahiptir (227).

PI3K bağımlı AKT aktivasyonu tümör süpresör olan PTEN aracılığıyla düzenlenir (13). PTEN, PIP3'ün PIP2'ye defosforilasyonunda rol oynayan bir fosfatazdır. Bu durum AKT sinyal yolağından membran lokalizasyon faktörünü kaldırır. Bu lokalizasyon olmadığında AKT aktivasyonu önemli derecede azalır. PIP3 ayrıca inositol fosfatların SHIP ailesinden olan SHIP1 ve SHIP2 tarafından "5" pozisyonunda defosforillenebilir. Bu poli-fosfataz inositol fosfatlar PIP2'yi PIP3' defosforilliler. AKT inhibitörleri nöroblastoma gibi kanser tedavilerinde kullanılabilir ve bazı klinik denemelerde kullanılmıştır (228).



PHLPP ailesindeki fosfatazlar olan PHLPP1 ve PHLPP2 farklı AKT izoformlarının defosforilasyonunda doğrudan rol oynar. PHLPP2, AKT1 ve AKT3'ü defosforillerken, PHLPP1 AKT2 ve AKT3 için spesifiktir (228).

#### 2.16.10. FOXO3A

Forkhead box O3 (FOXO3A), FOXO, FOXO3A, FKHRL1 olarak bilinir ve *FOXO3* geni tarafından kodlanan bir insan proteindir (229). FOXO, farklı fork head DNA bağlayıcı bölge ile karakterize olan forkhead transkripsiyon ailesinin O alt sınıfına aittir. İnsanlarda ayrıca FOXO1, FOXO4 ve FOXO6 olmak üzere üç ayrı FoxO ailesi daha vardır. Bu transkripsiyon faktörlerinin ortak inhibisyon yetenekleri vardır ve PI3K sinyal yolağında AKT/PKB gibi proteinler ile fosforilasyonu üzerine nükleusun dışına yer değiştirir (230). Asetilasyon ve metilasyonu kapsayan diğer post translasyonel modifikasyonlar görülmektedir ve böylece FOXO3A aktivitesi değişir ya da artar.

Bu protein, FLIP gibi anti-apoptotik proteinlerin downregülasyonu ya da *Bim* ve *PUMA* gibi hücre ölümü için gerekli olan genlerin upregülasyonu aracılığıyla apoptoz için tetikleyici olarak fonksiyon görebilir(231,232).

FOXO3, kas rejenerasyonu boyunca kök hücrelerin kendini yenilemesinde Notch sinyal yolağının bir düzenleyicisi olarak işlev görmektedir (233). FOXO3a ayrıca MnSOD ve katalaz gibi antioksidanların upregülasyonu ile oksidatif strese korunmasında görev alır. *Foxo3* knockout dişi farelerde erken over yetmezliğinden dolayı yaşa bağlı infertili ortaya çıkar.

FOXO3A'nın deregülasyonu tümörögenizde rol oynar (234). MLL ile bu genin translokasyonu sekonder akut lösemi ile ilişkilidir. PTEN kaybından dolayı AKT aktivitesinin artması ile FOXO3A aktivitesinin downregülasyonu sıklıkla kanserde görülür. FOXO3 tümör süpresör olarak bilinir. Aynı proteini kodlayan alternatif spliced transkript varyantlarda vardır.

### **3. MATERYAL VE METOD**

Bu çalışmada over yüzey epitelinden embriyonik kök hücrelerin elde edilmesi ve oosit benzeri hücrelere farklılaştırılması planlandı. Üç haftada farklılaşan hücrelerin birinci hafta, ikinci hafta ve üçüncü hafta sonlarında alınan örneklerinden kök hücre belirteçleri ve bu dönemde PTEN-PI3K-AKT-FOXO3A sinyal yolağında oluşan değişikliklerin incelenmesi amaçlandı. Kök hücrelerden oosit ve blastosist elde edilebilmesinin mekanizması bilinmesi ile ovaryan indüksiyon tedavileri düzenlenebilecek ve over yüzey epiteli bir kök hücre kaynağı olarak kullanılabilir ve infertil vakaların tedavisinde yeni yollar açabileceği düşünüldü. Bu amaçla çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü ile Merkez Efendi Devlet Hastanesi Doğumevi Kliniği'ne çeşitli jinekolojik hastalıklar nedeni başvuran ve ile opere olan, etik onam formunu imzalayan, postmenopozal kadın hastalardan toplanan over doku örnekleri ve over doku örneklerinden elde edilen OYE hücre kültürleri ikinci gün, birinci hafta, ikinci hafta ve üçüncü hafta örnekler alınarak rutin histokimyasal ve anti- OCT-4, anti-SSEA-4, anti-C-KIT, anti-VASA, anti- anti-ZP-4, anti-CK-18, anti-PTEN, anti-PI3K, anti-pAKT, anti-FOXO3 primer antikorları kullanılarak avidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile indirekt immünohistokimyasal boyamalar uygulandı ve antikorların varlığı doğrulandı.

Çalışmada kullanılan histokimyasal, immünohistokimyasal inceleme için gerekli kimyasal malzemeler ve cihazlar Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/061 nolu proje ile desteklendi.

Çalışmamız, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 18/08/2011 tarih, 284 protokol numaralı onayı ile yapıldı.

#### **3.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi**

Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü ile Merkez Efendi Devlet Hastanesi Doğumevi Kliniğine çeşitli jinekolojik hastalıklar

nedeni başvuran etik onam formunu imzalayan ve opere olan, postmenopozal kadınlardan temin edildi.

Over doku örneğinin yüzeyindeki epitel hücreleri kazınmadan önce OYE epitelinin durumunun belirlenmesi amacı ile bir parçası kesilip ışık mikroskobu ile değerlendirilmek üzere %10'luk formalin solüsyonu ile 24-48 saat süreyle oda sıcaklığında fikse edildi. Doku örnekleri, rutin ışık mikroskopi parafin doku takibi yöntemi ile takip edilerek; derecesi giderek artan alkol serileri ile dehidratasyon işlemini takiben, ksilen ile şeffaflaştırılarak parafine gömüldü (**Tablo 3.1.1.**).

**Tablo 3.1.1.** Parafin Doku Takip Protokolü

<b>İŞLEM</b>	<b>MADDE</b>	<b>SÜRE</b>
<b>A. FİKSASYON</b>	% 10 FORMALİN	24-48 SAAT
	AKAR SU	1 GECE
<b>B. DEHİDRATASYON</b>	%60 ALKOL	30 DAKİKA
	%70 ALKOL	30 DAKİKA
	%80 ALKOL	30 DAKİKA
	%100 ABSOLÜ ALKOL	60 DAKİKA
	%100 ABSOLÜ ALKOL	60 DAKİKA
<b>C. ŞEFFAFLAŞTIRMA</b>	ALKOL:KSİLEN (1:1)	30 DAKİKA
	KSİLEN I	60 DAKİKA
	KSİLEN II	60 DAKİKA
<b>D. İNFİLTRASYON</b>	KSİLEN:PARAFİN (1:1)	30 DAKİKA
	PARAFİN I	60 DAKİKA
	PARAFİN II	60 DAKİKA
<b>E. GÖMME</b>	PARAFİN	

**Kullanılan Malzemeler:**

- Ksilen (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- Alkol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- Parafin (Surgipath, Cambridgeshire, UK)

### 3.2. Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü

Beş µm kalınlıkta alınan kesitler bir gece 60°C etüvde deparafinize edildikten sonra, 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinizasyon işlemi yapıldıktan sonra boyama başlatıldı (Tablo 3.2.1.).

**Tablo 3.2.1.** Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60 °C ETÜVDE	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
	% 80 ALKOL	1 DAKİKA
	% 95 ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA	1-2 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	

#### Kullanılan Malzemeler:

- Ksilen (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- Alkol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- Hematoksilen (Invitrogen, Paisley, UK)
- Asit alkol
- Eozin (Surgipath, Cambridgeshire, UK)
- Entellan (10-20/21; Merck, Darmstadt, Germany)

### 3.3. İndirekt İmmunohistokimya Protokolü

İndirekt avidin-biyotin yöntemi ile boyanacak preparatlar bir gece 60°C etüvde deparafinize edildikten sonra, 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinizasyon işlemi yapıldıktan sonra boyama başlatıldı (**Tablo 3.3.1.**).

**Tablo 3.3.1.** İndirekt İmmunohistokimya Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60 °C ETÜVDE	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	HİDROFOBİK KALEMLE DOKULARIN ETRAFININ ÇİZİLMESİ	
	TRİPSİN	10 DAKİKA 37 °C ETÜVDE
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	% 3'LÜK HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
BLOKLAMA	NON-İMMUN BLOKLAMA SOLÜSYONU	60 DAKİKA
	PRİMER ANTİKOR	18 SAAT +4 °C'DE NEMLİ ORTAMDA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	BİOTİNLENMİŞ SEKONDER ANTİKOR	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
BOYAMA	DAB	3 DAKİKA
YIKAMA	PBS	1X5 DAKİKA

<b>YIKAMA</b>	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
<b>ARTALAN BOYAMA</b>	MAYER'S HEMATOKSİLEN	1 DAKİKA
<b>YIKAMA</b>	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
	% 80 ALKOL	1 DAKİKA
	% 90 ALKOL	1 DAKİKA
<b>KURUTMA</b>	HAVADA	1-2 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
<b>KAPAMA</b>	ENTELLAN	

### **Primer Antikorlar**

- Anti-OCT-4 Antikoru (Katalog No: PDM 155, Diagnostic Biosystem)
- Anti-SSEA-4 Antikoru (Katalog No: LS-C148645, Lifespan Biosciences)
- Anti-VASA Antikoru (Katalog No: NBP1-46504 Novus Biologicals)
- Anti-C-KİT Antikoru (Katalog No: PDR 045, Diagnostic Biosystem)
- Anti-CK-18 Antikoru (Katalog No: 08-1213, İnvitrogen)
- Anti-ZP-4 Antikoru (Katalog No: NBP1-86823, Novus Biologicals)
- Anti-PTEN Antikoru (Katalog No: 18-0256, İnvitrogen)
- Anti-PI3K Antikoru (Katalog No: 04-403, Millipore)
- Anti-pAKT Antikoru (Katalog No: NBP1-20183, Novus Biologicals)
- Anti-FOXO3A Antikoru (Katalog No: 04-1007, Millipore)

### **Kullanılan Malzemeler:**

- Ksilen (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- Alkol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- PBS (Fosfat Buffer Solüsyonu) (Kat No: 041M8227)
- Tripsin (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA)
- Dakopen (Kat. No: 00-8877 Invitrogen, Paisley, UK)
- Hidrojen peroksit (Merck, Darmstadt, Germany)
- Sekonder Antikor (Histostain Plus Bulk Kit; Invitrogen, Paisley, UK)
- DAB Kit (DAB Plus Substrate Kit; Invitrogen, Paisley, UK)
- Mayer's Hematoksilen (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA)
- Entellan (10-20/21; Merck, Darmstadt, Germany)

### **3.4. Over Yüzey Epitelinin Kazınması**

Çalışmada çeşitli jinekolojik hastalıklar nedeni ile Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi ve Merkez Efendi Devlet Hastanesi Doğum ve Çocuk Bakımevinde histerektomi yapılan, etik onam formunu imzalamış 10 postmenopozal kadın hasta kullanıldı. Over örnekleri, kısa sürede 37 °C'de %0.1 gentamisin (100 mg / ml), %1 penisilin (100 U / ml)-streptomisin (100 mg / ml), %30 fetal sığır serumu içeren DMEM/F12 kültür vasatı içerisinde laboratuvara taşındı. Over dokuları, DMEM/F12 ve antibiyotikler içeren kültür vasatında ve antibiyotik içeren kalsiyum ve magnezyum içermeyen Dulbecco'nun tamponlanmış fosfat tuzunda yıkandı.

Overin yüzey epiteli 37°C'de steril şartlar altında DMEM/F12 kültür vasatı içine steril bistüri yardımı ile kazındı ve serbest kalan hücreler toplandı. Elde edilen hücreler 25 °C 'de 10 dakika 1000 devirde santrifüj edildi. Pellet, taze medyumda süspansiyon edildi ve 37 °C'de %5'lik CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde %30 fetal sığır serumu ve %0.1 gentamisin (100 mg / ml), %1 penisilin (100 U / ml)-streptomisin (100 mg / ml) içeren DMEM/F12 vasatla üç hafta kültüre edildi.

### **3.5. Hücre Örneklerinin Alınması ve Fiksasyonu**

Kültürün ikinci gün, birinci, ikinci ve üçüncü haftalarının sonunda hücre örnekleri 30 dakika %4'lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında fikse edildi ve immunohistokimyasal boyama gerçekleştirildi.

### 3.6. Hücreler için İndirekt İmmunohistokimya Protokolü

İndirekt avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile boyanacak hücreler anti- OCT-4, anti-SSEA-4, anti-C-KİT, anti-VASA, anti-CK-18, anti-ZP-4, anti-PTEN, anti-PI3K, anti-pAKT, anti-FOXO3 primer antikorları kullanılarak indirekt immunohistokimya yöntemi ile değerlendirildi (**Tablo 3.6.1.**). Preperatlar, Olympus BX-40 ışık mikroskobu altında incelenerek, Nikon kamera aracılığı ile fotoğrafları çekildi.

**Tablo 3.6.1.** Hücreler için İndirekt İmmunohistokimya Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
FİKSASYON	%4'LÜK PARAFORMALDEHİT İLE ODA SICAKLIĞINDA	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	% 3'LÜK HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
PERMEABİLİZASYON	TRİTON X-100 BUZ ÜZERİNDE	15 DAKİKA
BLOKLAMA	BLOKLAMA SOLÜSYONU	60 DAKİKA
	PRİMER ANTİKOR	18 SAAT +4 °C'DE NEMLİ ORTAMDA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	BİOTİNLENMİŞ SEKONDER ANTİKOR	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
BOYAMA	DAB	15-60 SANİYE
YIKAMA	PBS	1X5 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	1 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
KAPAMA	MOUNTİNG MEDIUM	



**Kullanılan Malzemeler:**

- Ksilen (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- Alkol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- PBS (Fosfat Buffer Solüsyonu) (Kat No: 041M8227)
- Hidrojen peroksit (Merck, Darmstadt, Germany)
- Triton X-100 (AppliChem Cas No: 9002-93-1 Darmstadt, Germany)
- Sekonder Antikor (Histostain Plus Bulk Kit; Invitrogen, Paisley, UK)
- DAB Kit (DAB Plus Substrate Kit; Invitrogen, Paisley, UK)
- Mayer's Hematoksilen (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA)
- Entellan (10-20/21; Merck, Darmstadt, Germany)

## **4.BULGULAR**

### **4.1. Histokimyasal Bulgular**

Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin, Hematoksilen-Eozin ile boyanmış preparatlarında primordial veya gelişmekte olan folliküller yapılar gözlenmedi. Tek katlı kübik epitel olarak over yüzey epiteli gözlendi. Putativ kök hücreler çekirdekleri koyu boyanan az sitoplazmaları olan hücreler olarak gözlendi (Resim 1; A,B,C,D).

### **4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular**

#### **Negatif Kontrol**

Parafin doku kesitleri ve hücre kültürü örneklerinin tamamına yapılan immunohistokimyasal boyamalarda negatif kontrollerde spesifik boyanma gözlenmedi. (Resim 2; A,B,C,D)

#### **OCT-4**

Bu çalışmada, parafin doku kesitlerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, doku kesitlerinin OYE hücreleri arasında bulunan OCT-4 monoklonal antikoru eksprese eden kök hücrelerin, epitel hücrelerine komşu olarak yerleştiği gözlendi (Resim 3; A,B).

Over dokusu kazınan epitel hücrelerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, hem over dokusunun kazınan epitel hücreleri arasında, hemde over yüzey epitel hücrelerinden yapılan ikinci gün ve birinci hafta kültür örneklerinde, OCT-4 pozitif hücreler gözlendi. (Resim 3; C,D).

Over yüzey epitelinden elde edilen hücrelerin immunoreaktivitesi incelendiğinde ise, over yüzey epitelinden elde edilen hücrelerin ikinci ve üçüncü haftaya ait hücre kültür preparatlarında yuvarlak oosit benzeri hücrelerde OCT-4 boyanması gözlenmezken, az sayıda hücrede OCT-4 boyanması gözlendi (Resim 3; E,F).

## **SSEA-4**

Parafin doku kesitlerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, OYE hücreleri arasında bulunan SSEA-4 eksprese eden kök hücrelerin olduğu gözlemlendi boyanma gözlenmedi (Resim 4; A,B).

Over yüzey epiteli arasındaki küçük hücrelerin immunoreaktivitesi incelendiğinde, ikinci gün örneklerinde kuvvetli boyanma gözlenirken, birinci hafta hücre kültürü preparatlarında az sayıda küçük hücrenin SSEA-4 monoklonal antikoru ile boyandığı gözlemlendi (Resim 4; C,D).

Over yüzey epitelinden elde edilen hücreler immunoreaktivitesi incelendiğinde ise, ikinci ve üçüncü haftaya ait hücre kültürü preparatlarındaki küçük hücrelerde SSEA-4 boyanması gözlenmedi (Resim 4; E,F).

## **VASA**

Alınan doku örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, hem parafin doku kesitlerinde hemde hücre kültürü örneklerinin ikinci gün, birinci, ikinci ve üçüncü hafta hücrelerinde, yaygın olarak VASA poliklonal antikoru ile boyandığı gözlemlendi (Resim 5 A,B,C,D,E,F). Bu çalışmada yaygın boyanmanın nedeni artefakt olarak değerlendirildi. Antikor dilüsyon oranlarının azaltılmasına rağmen boyamalarda değişiklik olmadı.

## **C-KİT**

Parafin doku kesitlerinde OYE hücrelerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, doku kesitlerinde OYE hücrelerinin arasında bulunan C-KİT eksprese eden az sayıda kök hücre ve epitel hücrelerinin olduğu gözlemlendi (Resim 6; A,B).

OYE'nden elde edilen hücrelerin immunoreaktivitesi incelendiğinde, OYE'nden elde edilen hücrelerin ikinci gün ve birinci haftada içindeki alınan örneklerdeki

morfolojik olarak kök hücrelere benzer hücrelerde ve epitel hücrelerinde kuvvetli boyanma gözlemlendi (Resim 6; C,D).

OYE’i preparatlarının immunoreaktivitesi incelendiğinde ise, ikinci ve üçüncü haftada OYE hücreleri arasında morfolojik olarak kök hücrelere benzer hücrelerin ve yuvarlak oosite benzer hücrelerde C-KİT poliklonal antikoru ile orta şiddette immunoreaktivite gözlemlendi (Resim 6; E,F).

### **CK-18**

Over doku örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, over doku örneklerinin CK-18 monoklonal antikoru ile boyanan preparatlarda kök hücrelerin ve epitel hücrelerinin, orta şiddette CK-18 ekspresyonu olduğu gözlemlendi (Resim 7; A,B).

Over doku örneklerinin birinci ve ikinci haftaya ait hücrelerin immunoreaktivitesi incelendiğinde, alınan over doku örneklerinin birinci ve ikinci haftaya ait hücrelerin epitel hücrelerinde CK-18 ekspresyonu orta şiddette, yuvarlak oosite benzer hücrelerde ekspresyonun artmış olduğu gözlemlendi (Resim 7; C,D).

Üçüncü haftaya ait over yüzey epitel hücre kültürü örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde ise, üçüncü haftaya ait over yüzey epitel hücre kültürü örneklerinin CK-18 ile boyanmış preparatlarında da epitel hücrelerinin daha hafif şiddette, yuvarlak şekilli farklılaşan hücrelerde CK-18 immünoreaktivitesinin fazla olduğu gözlemlendi (Resim 7; E,F).

### **ZP-4**

Over doku örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, over doku örneklerinin ZP-4 poliklonal antikoru ile boyanan preparatlarda kök hücrelerin ve epitel hücrelerinin, çok düşük seviyede ZP-4 ekspresyonu olduğu gözlemlendi (Resim 8; A,B).

ZP-4 monoklonal antikoruna ile boyanmış hücre kültürü örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde ise, ikinci gün, birinci ve ikinci haftaya ait hücre kültürü materyallerinde boyanmış hücre gözlenmezken, 3. haftaya ait örneklerde yuvarlak biçimli oosit benzer hücrelerin kuvvetli immunoreaktivite gözlemlendi (Resim 8; C,D,E,F).

## **PTEN**

Over doku örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, over doku örneklerinin PTEN poliklonal antikoruna ile boyanan preparatlarda kök hücrelerin, epitel hücrelerin ve kortikal dokunun, kuvvetli PTEN ekspresyonu gösterdiği gözlemlendi (Resim 9; A,B).

Alınan hücre örneklerinin ikinci gün örnekleri, birinci hafta hücre örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, hem ikinci gün örneklerine ait hem de birinci haftaya ait hücre örneklerinde OYE hücrelerinin PTEN poliklonal antikoruna ile kuvvetli immunoreaktivite gösterdiği tespit edildi (Resim 9; C,D).

Alınan hücre örneklerinin ikinci ve üçüncü haftası örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde ise, ikinci ve üçüncü haftası örnekleri kök hücrelerde ve yuvarlak şekilli oosit benzeri hücrelerde PTEN immunoreaktivitesinin giderek azaldığı tespit edildi (Resim 9; E,F).

## **PI3K**

Over doku örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, over doku örneklerinin PI3K monoklonal antikoruna ile boyanan preparatlarda kök hücrelerin, epitel hücrelerin ve kortikal dokunun, oldukça düşük PI3K immunoreaktivitesi gösterdiği gözlemlendi (Resim 10; A,B).

Alınan hücre örneklerinin ikinci gün örnekleri, birinci hafta hücre örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, ikinci gün ve birinci hafta örneklerinde PI3K immunoreaktivitesinin oldukça düşük olduğu gözlemlendi (Resim 10; C,D).

Bu çalışmada PI3K aktivasyonunun ikinci hafta ve üçüncü hafta hücre örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde ise, ikinci hafta hücre örneklerinin hafif şiddette ve üçüncü hafta örneklerinde ikinci hafta hücre örneklerine göre daha fazla artmış immunoreaktivite olduğu tespit edildi (Resim 10; E,F).

## **AKT**

Alınan postmenopozal kadınların over doku örneklerinin AKT poliklonal antikorusunun immunoreaktivitesi incelendiğinde, over doku örneklerinin parafin kesitlerde yüzey epitel hücrelerinin az boyanmasına rağmen stromasındaki AKT immünoreaktivitesinin oldukça fazla olduğu gözlemlendi (Resim 11; A,B)

Hücre kültürü yapılan OYE hücrelerinin ikinci gün ve birinci hafta örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde, OYE hücrelerinin ikinci gün ve birinci hafta örneklerinin kök hücrelerin AKT aktivasyonunun oldukça düşük olduğu gözlenmesine rağmen epitel hücrelerinde kuvvetli immunoreaktivite gözlemlendi (Resim 11; C,D).

İkinci ve üçüncü haftaya ait hücre örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde ise, AKT immünoreaktivitesi ikinci haftaya ait hücre örneklerinde artmış bulundu (resim 17) AKT immünoreaktivitesi üçüncü hafta hücre kültürü örneklerinde pozitif olarak boyandığı gözlemlendi (Resim 11; E,F).

## **FOXO3A**

Parafin doku kesitlerinin FOXO3A monoklonal antikoru ile boyanmış preparatlarının immunoreaktivitesi incelendiğinde, ikinci gün ve birinci hafta hücre örneklerinde hafif şiddette FOXO3A aktivitesi gözlemlendi (Resim 12; A,B,C,D).

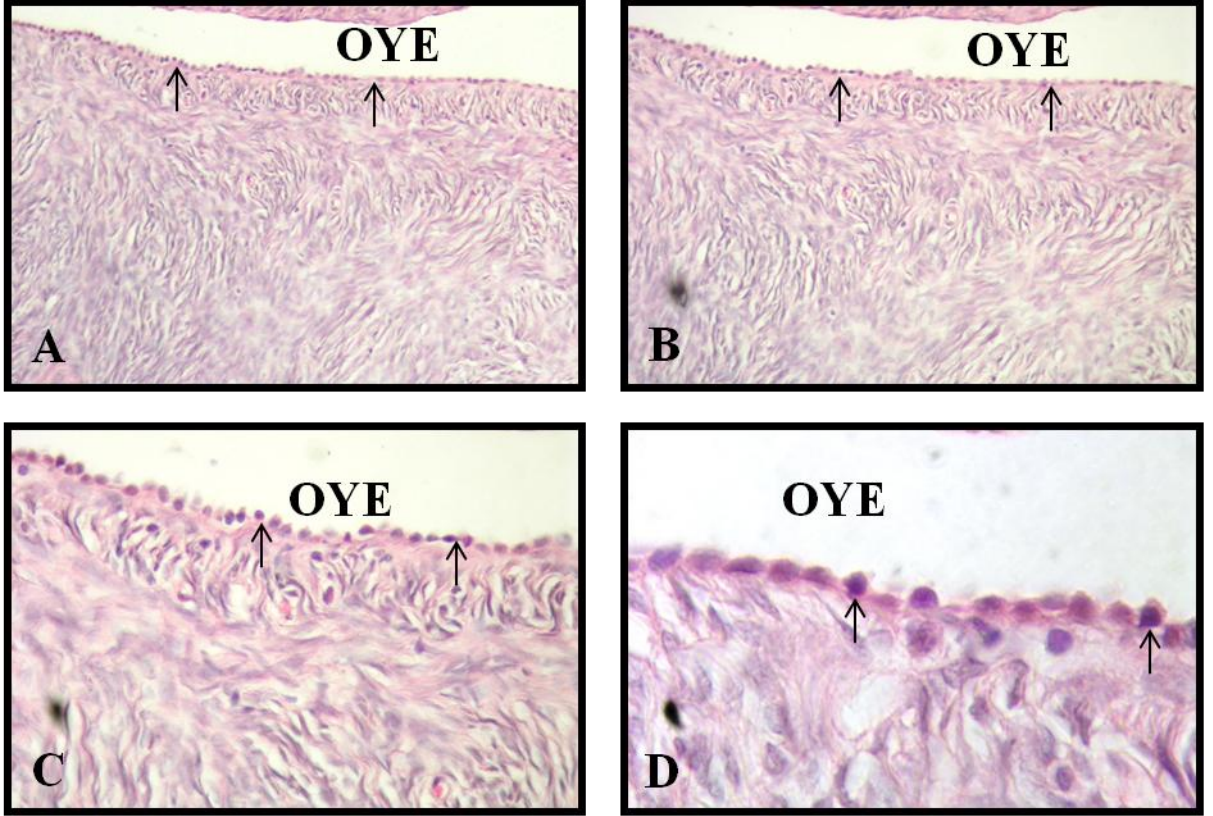
Hücre kültürü yapılan OYE hücrelerinin ikinci hafta ve üçüncü hafta örneklerinin immunoreaktivitesi incelendiğinde ikinci hafta ve üçüncü hafta hücre örneklerinde FOXO3A aktivitesinin azaldığı gözlemlendi (Resim 12; E,F).

### **Blastosist Benzeri Yapılar**

Üçüncü hafta hücre örneklerinde “oosit benzeri” ve “blastosist benzeri” hücreler tespit edildi, ancak bu hareketli yapıların immunohistokimyasal boyanmalar sırasında kaybolmasına engel olunamadı. İnsan çalışmasının getirdiği doku elde etmedeki güçlükler neden ile çalışmaya dahil edilen vaka sayısının azlığı boyamaların tekrarlanmasını engelledi.

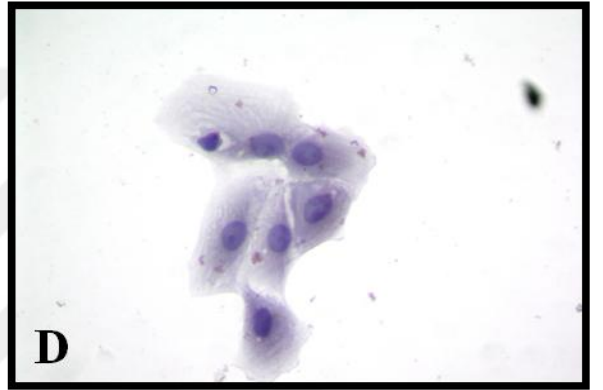
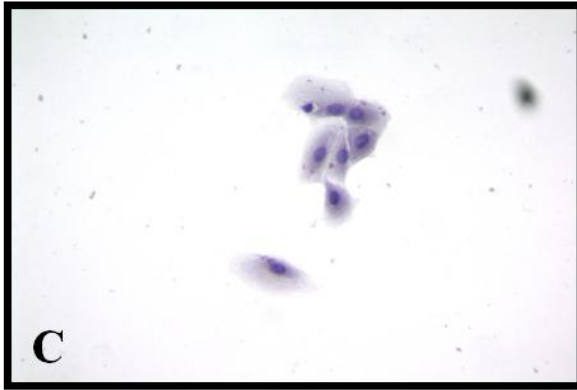
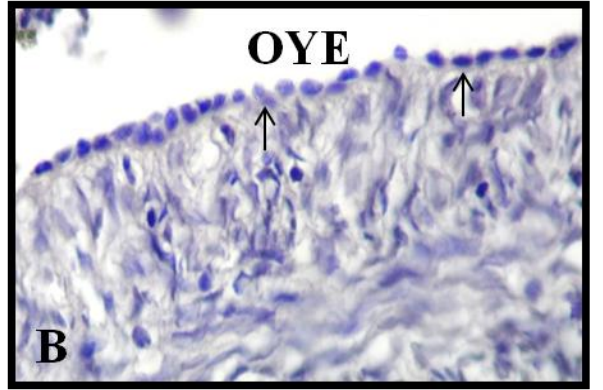
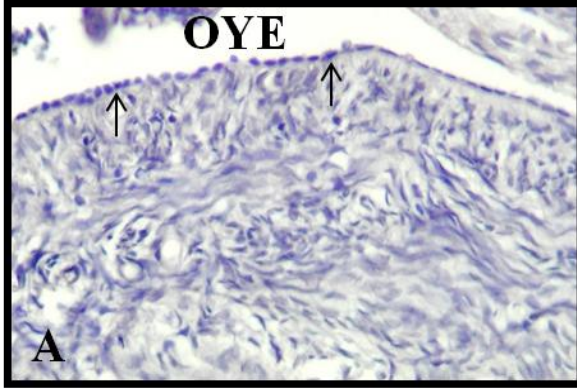


## 5.RESİMLER

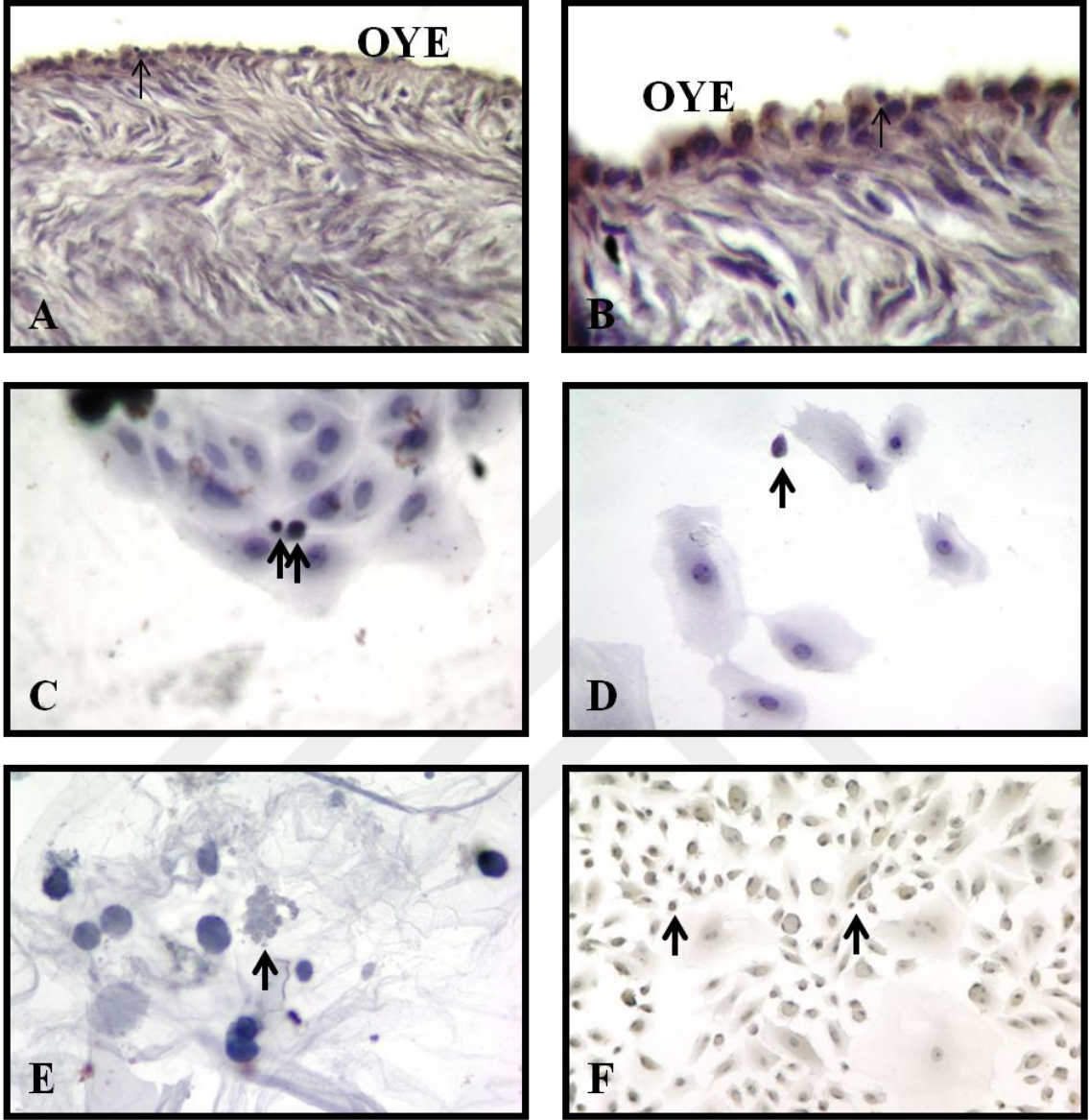


**Resim 1:** H.E ile yapılan boyamlarda postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinde, over yüzey epiteli (OYE) primordial veya gelişmekte olan folliküller yapılar gözlenmedi (A,B) ve tek katlı kübik epitel olarak over yüzey epiteli gözlendi (C,D). İnce ok: over yüzey epiteli, OYE: over yüzey epiteli. Orjinal Büyütme; A:X100, B:X200, C:X400, D:X1000

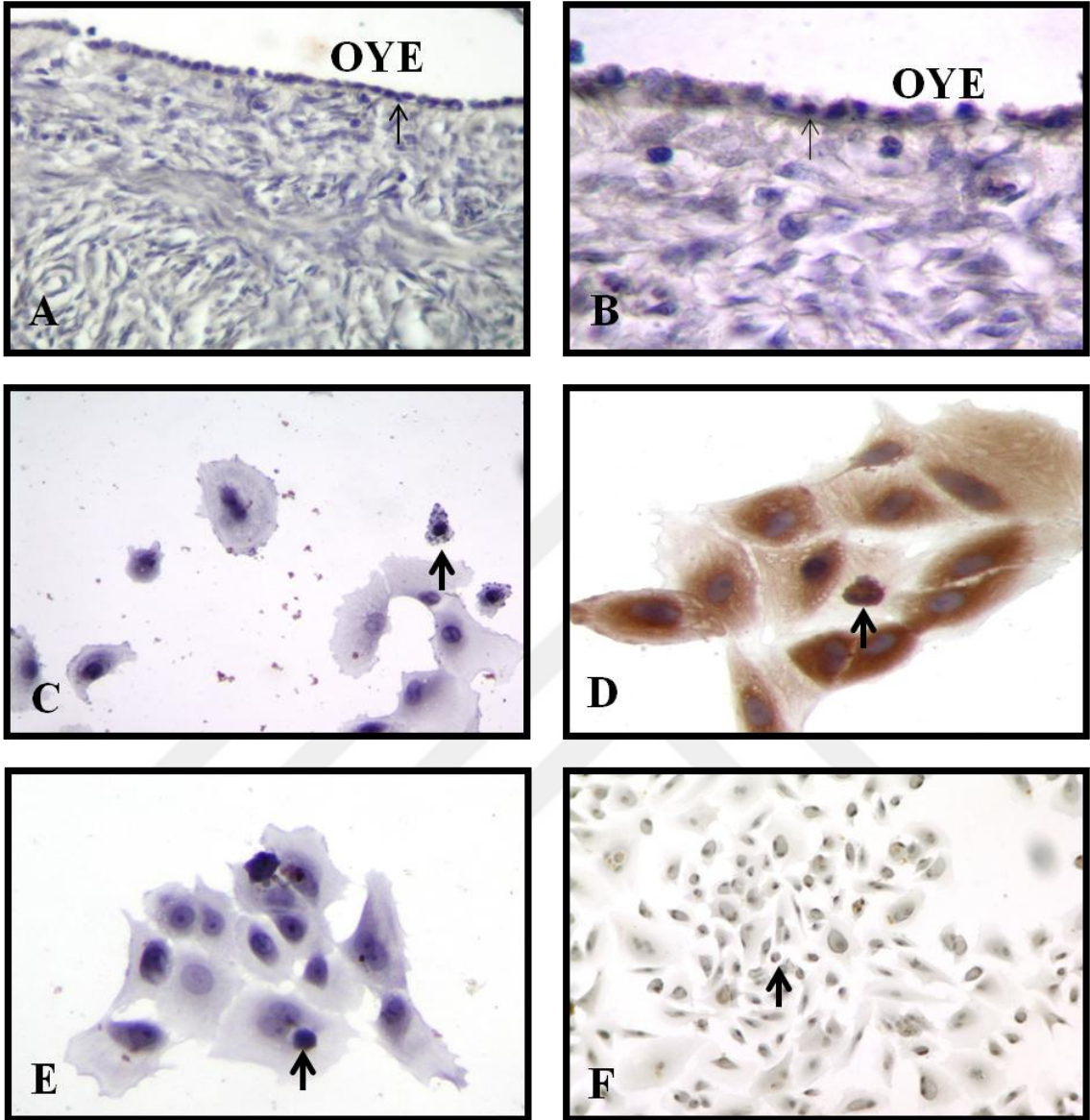




**Resim 2:** Postmenopozal kadınlardan alınan over doku örneklerinin (A,B) ve kazınan over yüzey epiteli hücrelerinin (C,D), immunohistokimya-negatif kontrol boyamasına ait görüntüler. Yapılan immunohistokimyasal boyamalarda negatif kontrollerde spesifik boyanma gözlenmedi. İnce ok: over yüzey epiteli, OYE: over yüzey epiteli. Orjinal Büyütme; A:X200, B:X400, C:X200, D:X400

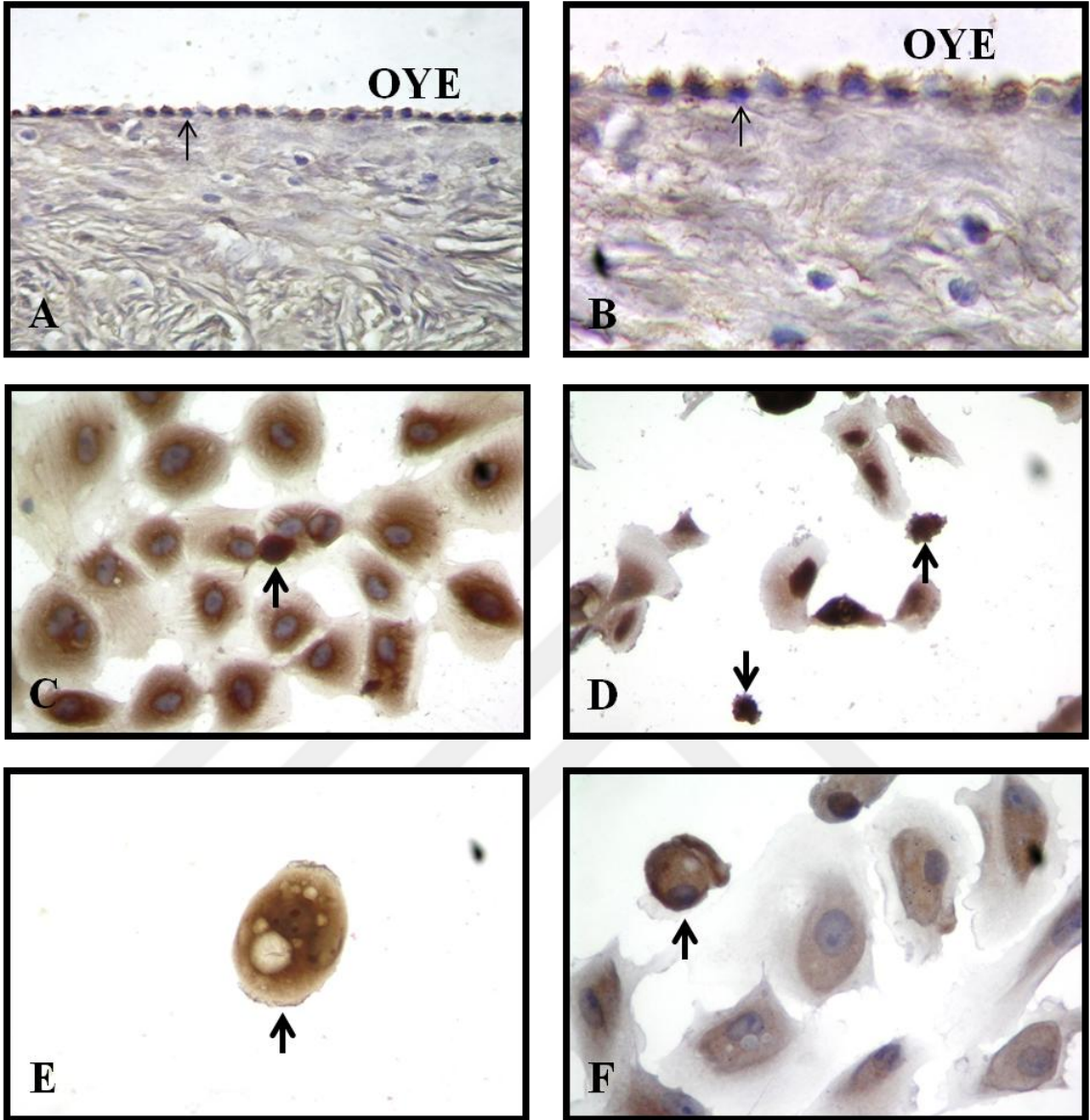


**Resim 3: Anti-OCT-4** monoklonal primer antikoruna ile boyanan örneklerin parafin doku kesitlerinde, OYE hücreleri arasında bulunan OCT-4 ekspresyon eden kök hücrelerin (A,B), epitel hücrelerine komşu olarak yerleştiği ve hafif immunoreaktivite gösterdiği over yuzey epitel hücrelerinden yapılan 2. gün ve birinci hafta kültür örneklerinde (C,D), OCT-4 pozitif hücreler ikinci ve üçüncü hafta örneklerinde (E,F) az sayıda hücrede çok az şiddette immunoreaktivite görülmektedir. İnce ok: over yuzey epiteli, kalın ok: kök hücre, OYE: over yuzey epiteli. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E, F:X400

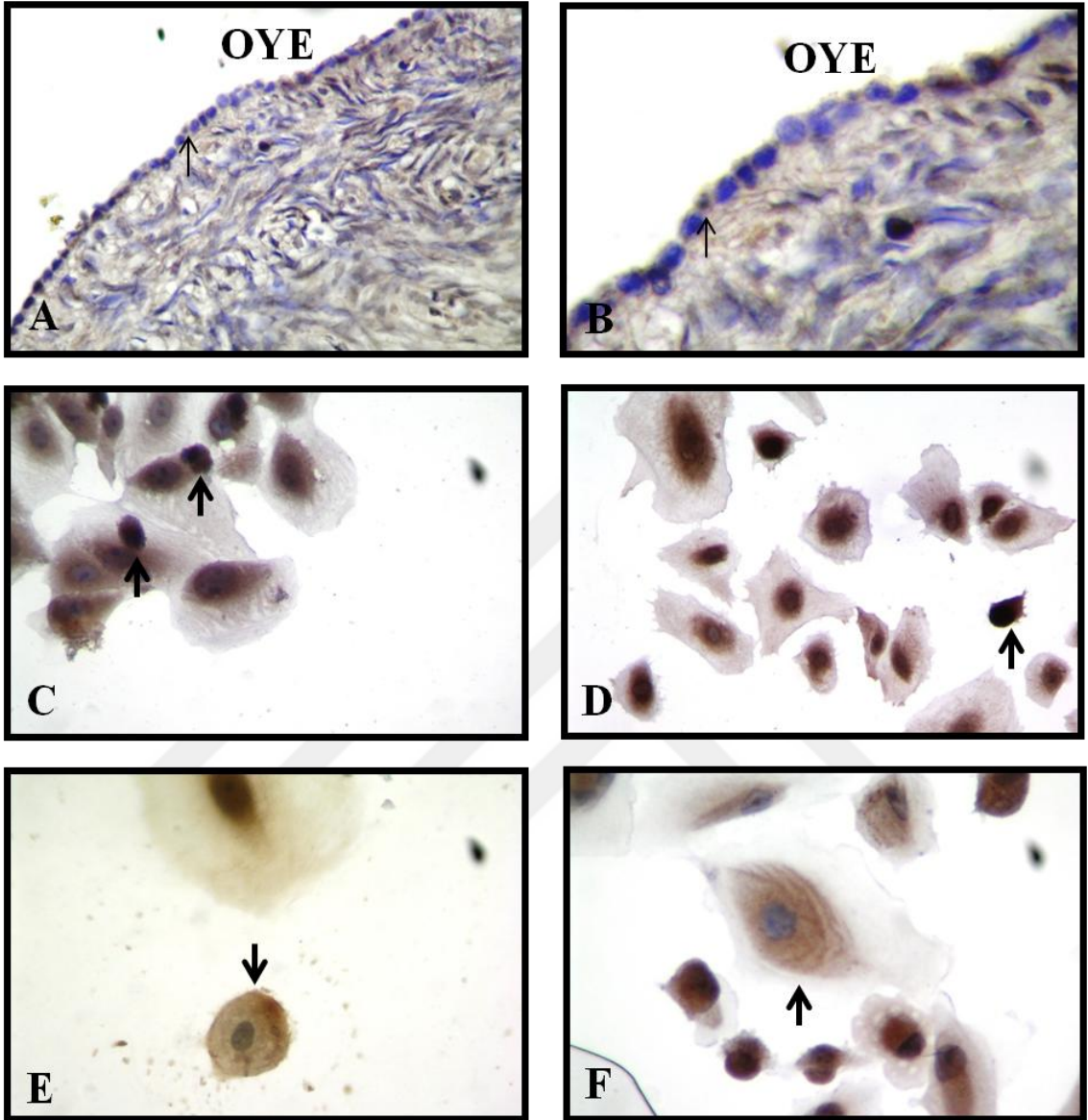


**Resim 4:** Anti-SSEA-4 monoklonal primer antikoru ile boyanan örneklerin parafin doku kesitlerinde, OYE hücreleri arasında bulunan SSEA-4 ekspresye eden kök hücrelerin (A,B), epitel hücrelerine komşu olarak yerleştiği ve hafif immunoreaktivite gösterdiği over yüzey epitel hücrelerinden yapılan 2. gün ve birinci hafta kültür örneklerinde (C,D), SSEA-4 pozitif hücreler ikinci ve üçüncü hafta örneklerinde (E,F) az sayıda hücrede çok az şiddette immunoreaktivite görülmektedir. İnce ok: over yüzey epiteli, kalın ok: kök hücre, OYE: over yüzey epiteli. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E, F:X400

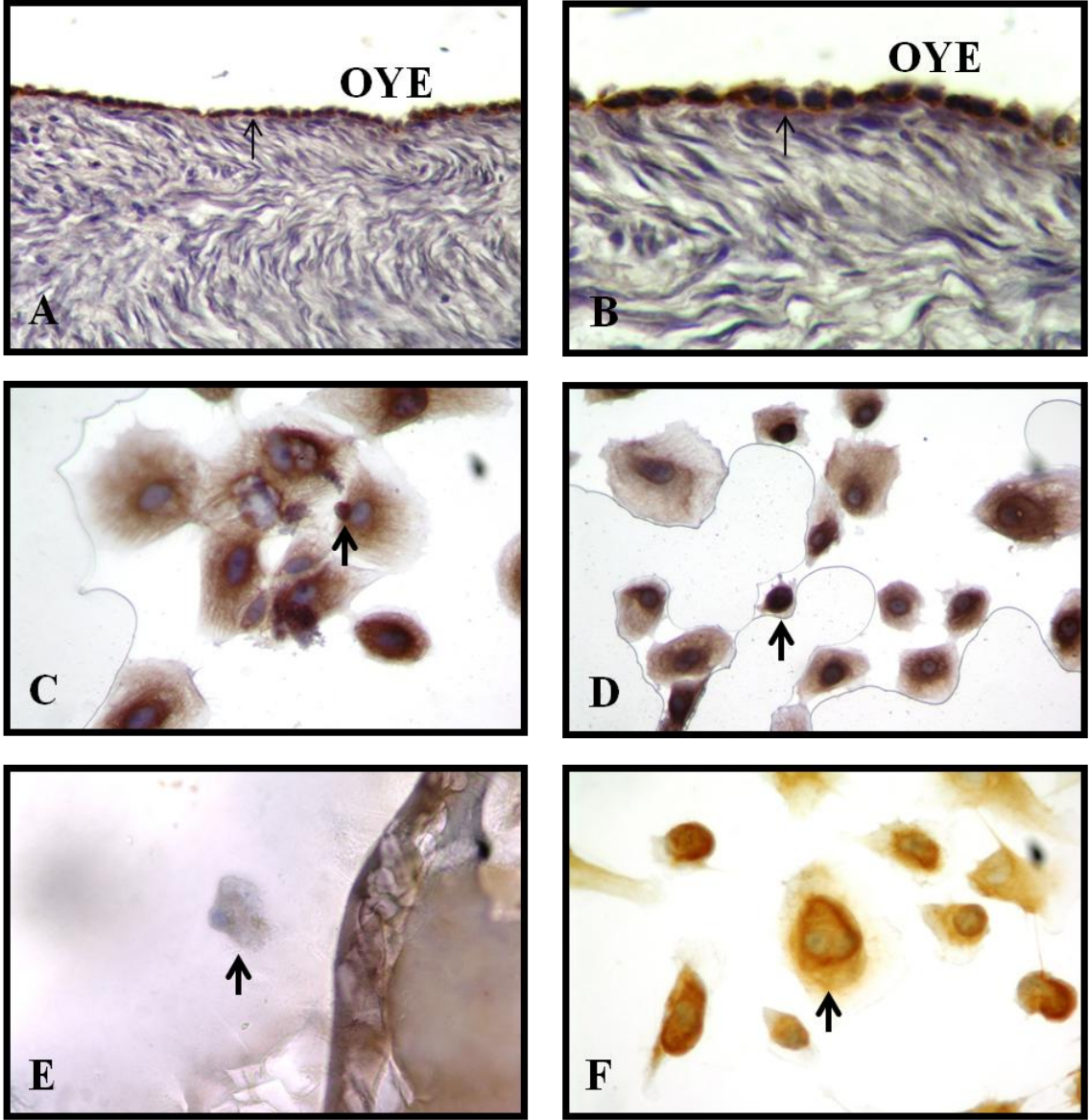




**Resim 5: Anti-VASA** poliklonal primer antikoru ile boyanan örneklerde, hem parafin doku kesitlerinde hem de hücre kültürü örneklerinin ikinci gün, birinci, ikinci ve üçüncü hafta hücrelerinde, yaygın olarak immunoreaktivite görülmektedir. Ok: over yüzey epiteli, OYE: over yüzey epiteli. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E, F:X400

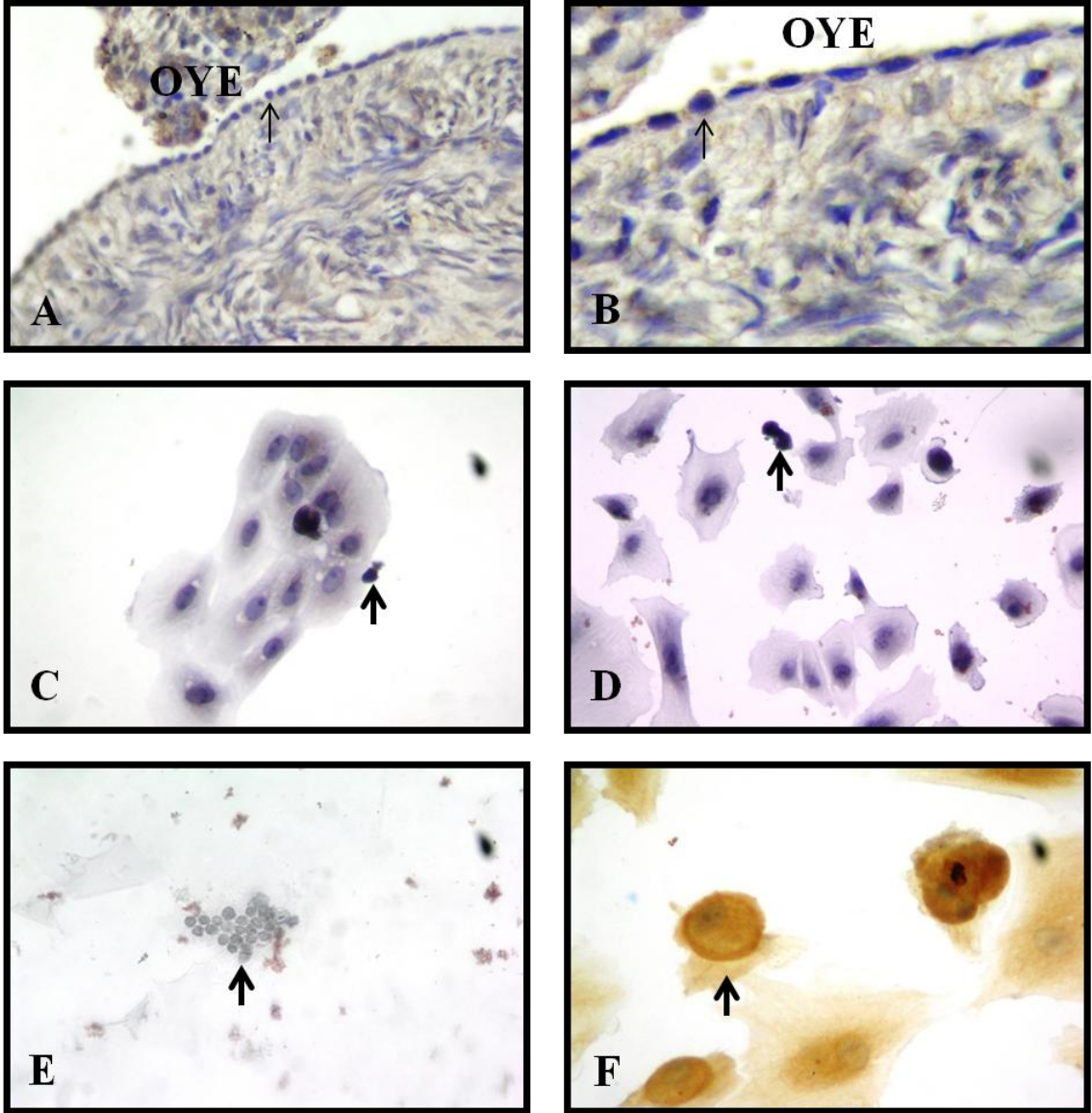


**Resim 6:** Anti-C-KİT poliklonal primer antikoru ile boyanan örneklerin parafin doku kesitlerinde, OYE hücreleri arasında az sayıda kök hücre ve epitel hücrelerinde hafif immunoreaktivite görülmektedir (A,B). Over yüzey epitel hücrelerinden yapılan ikinci gün ve birinci hafta kültür örneklerinde morfolojik olarak kök hücrelere benzer hücrelerde ve epitel hücrelerinde kuvvetli boyanma görülmektedir(C,D). İkinci ve üçüncü hafta örneklerinde hücrelerde orta şiddette immunoreaktivite görülmektedir(E,F). İnce ok: over yüzey epiteli, kalın ok: kök hücre, OYE: over yüzey epiteli. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E,F:X400

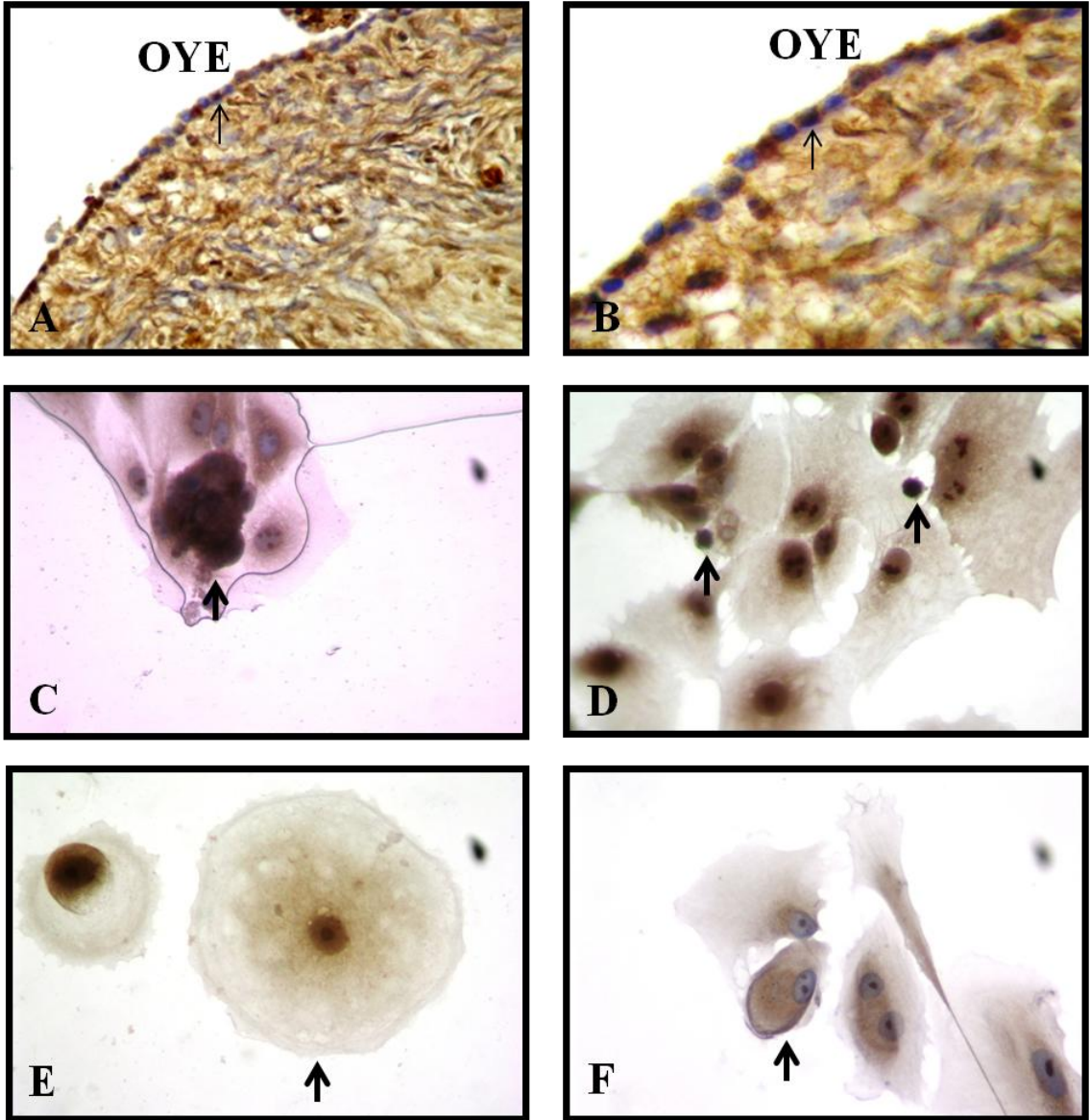


**Resim 7:** Anti-CK-18 monoklonal primer antikoruna ile boyanan parafin doku kesitlerinde, kök hücrelerin ve epitel hücrelerinde, orta şiddette immunoreaktivite görülmektedir (A,B). İkinci gün, birinci ve ikinci hafta kültür örneklerinde epitel hücrelerinde CK-18 immunoreaktivitesi orta şiddette devam ederken yuvarlak oosite benzer hücrelerde ekspresyonun artmış olduğu görülmektedir (C,D). Üçüncü haftaya hücre kültürü örneklerinde epitel hücrelerinin daha orta şiddette yuvarlak şekilli farklılaşan hücrelerde immünoreaktivitenin fazla olduğu görülmektedir. (E,F). İnce ok: over yüzey epitel, kalın ok: kök hücre, OYE: over yüzey epitel. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E, F:X400



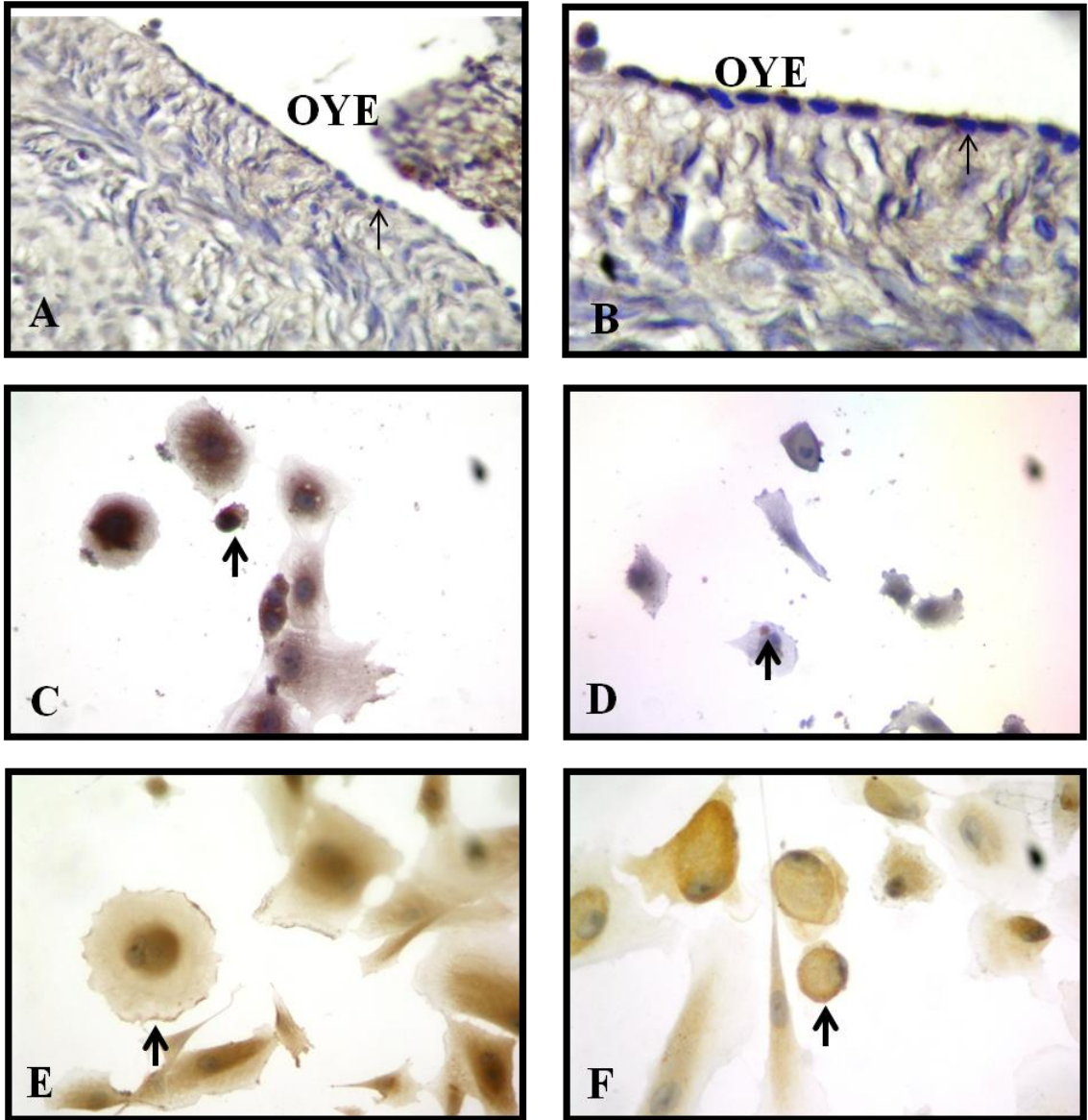


**Resim 8:** Anti-ZP-4 monoklonal primer antikoru ile boyanan parafin doku kesitlerinde, kök hücrelerin ve epitel hücrelerinin, çok düşük şiddette ZP-4 eksprese ettiği görülmektedir (A,B). ikinci gün, birinci ve ikinci haftaya ait hücre kültürü materyallerinde boyanan hücre gözlenmezken, 3. haftaya ait örneklerde yuvarlak biçimli oosit benzer hücrelerde kuvvetli immunoreaktivite görülmektedir (C,D,E,F). İnce ok: over yüzey epiteli, kalın ok: kök hücre, OYE: over yüzey epiteli. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E, F:X400

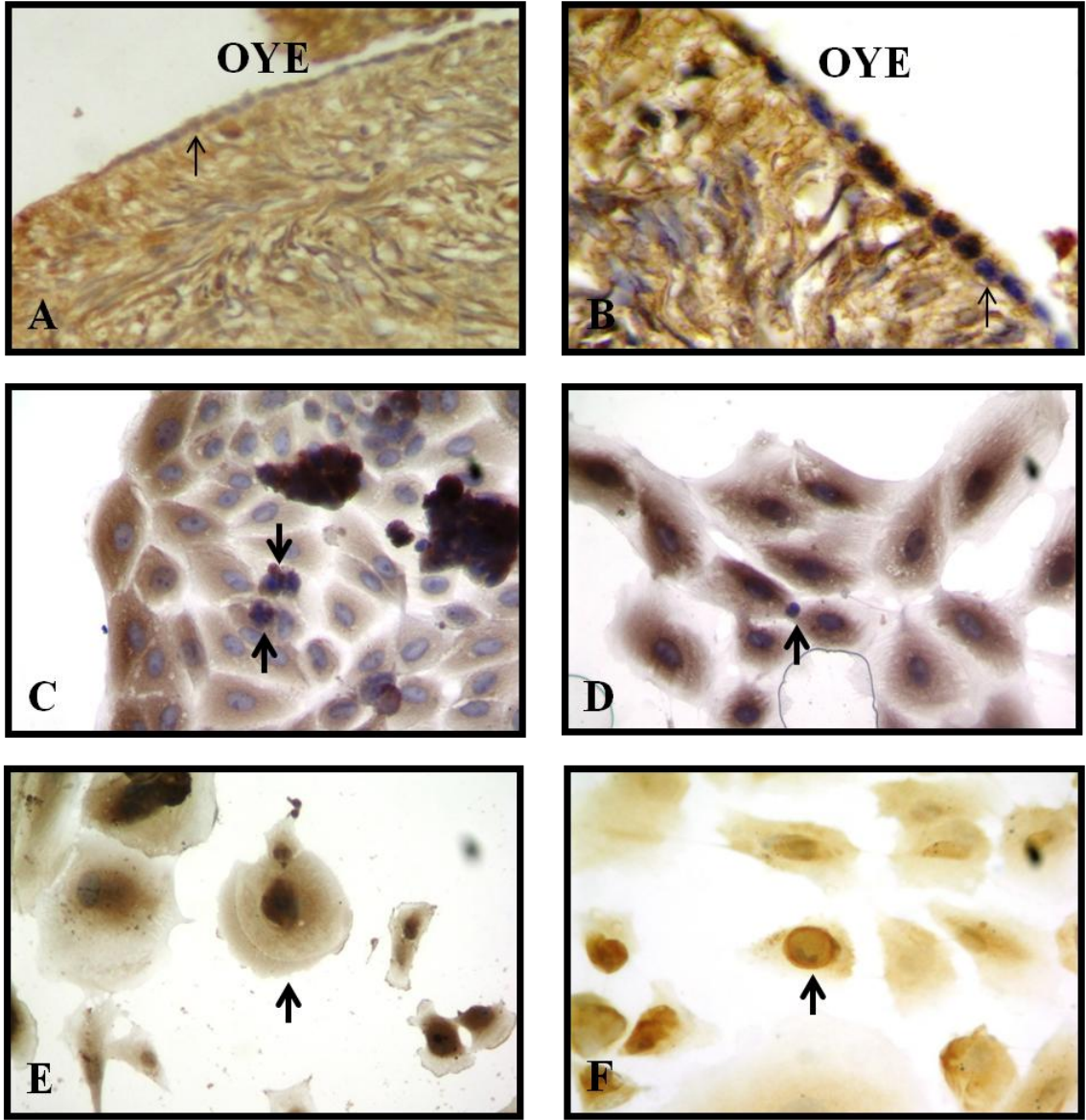


**Resim 9:** Anti-PTEN poliklonal primer antikoru ile boyanan parafin doku kesitlerinde, kök hücrelerin, epitel hücrelerin ve kortikal dokunun, kuvvetli PTEN eksprese ettiği görülmektedir (A,B). Hem ikinci gün hücre örneklerinde hem de birinci hafta hücre örneklerinde OYE hücrelerinde kuvvetli immunoreaktivite görülmektedir (C,D). İkinci ve üçüncü hafta örneklerindeki kök hücrelerde ve yuvarlak şekilli oosit benzeri hücrelerde immunoreaktivitenin giderek azaldığı görülmektedir (E,F). İnce ok: over yüzey epitel, kalın ok: kök hücre, OYE: over yüzey epitel. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E, F:X400

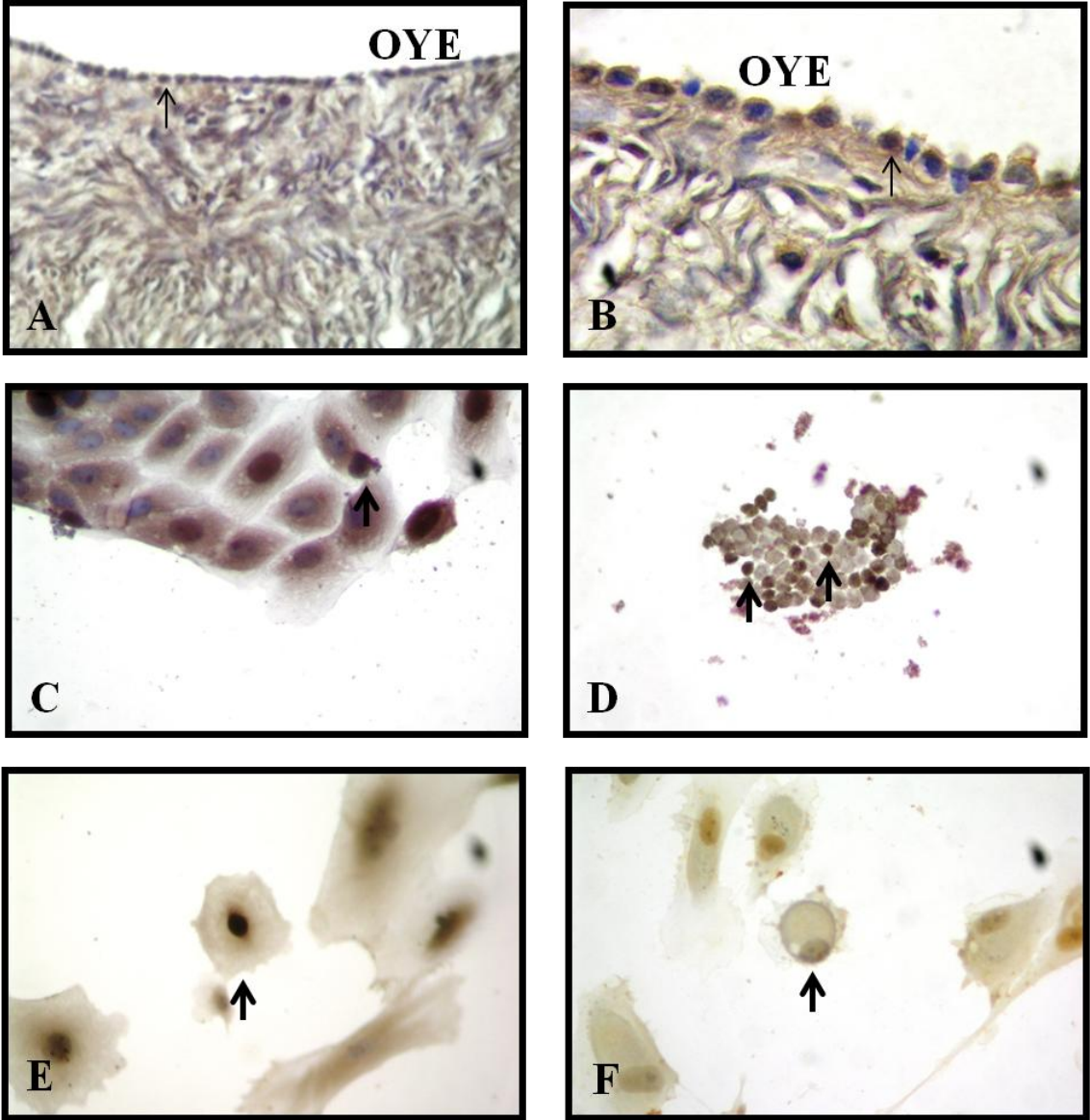




**Resim 10:** Anti-PI3K monoklonal primer antikoruna ile boyanan parafin doku kesitlerinde, kök hücrelerin, epitel hücrelerin ve kortikal dokunun, oldukça düşük PI3K immunoreaktivitesi gösterdiği görülmektedir (A,B). İkinci gün ve birinci hafta hücre örneklerinde PI3K immunoreaktivitesinin oldukça düşük olduğu görülmektedir (C,D). İkinci hafta hücre örneklerinin hafif şiddette ve üçüncü hafta örneklerinde ikinci hafta hücre örneklerine göre daha fazla artmış immunoreaktivite olduğu görülmektedir (E,F). İnce ok: over yüzey epitel, kalın ok: kök hücre, OYE: over yüzey epitel. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E, F:X400

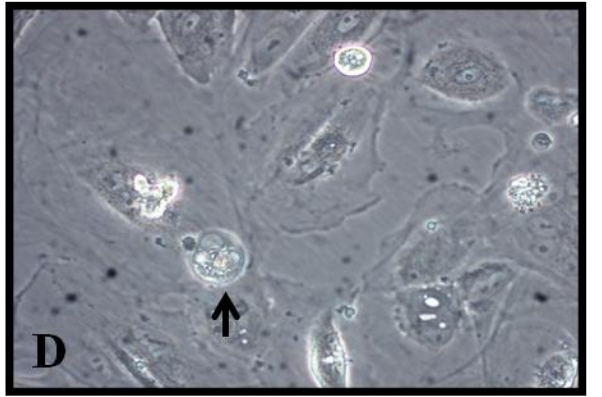
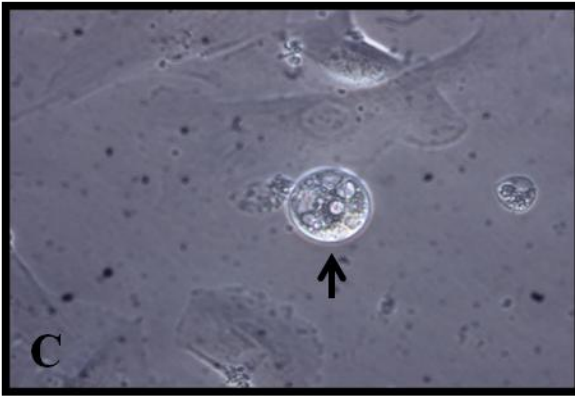
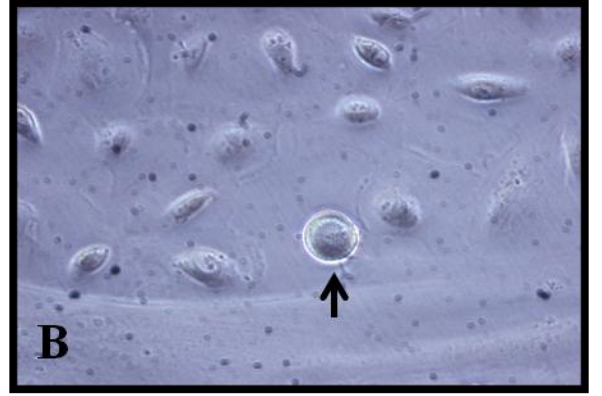
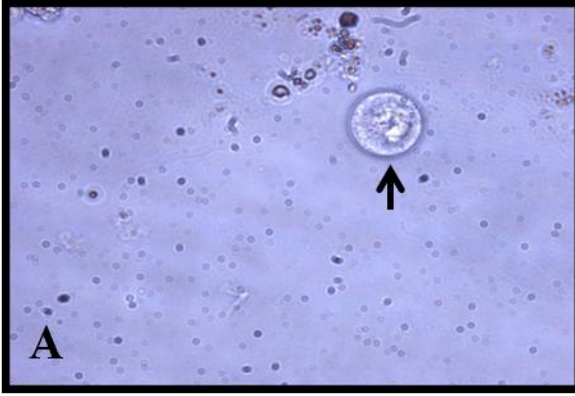


**Resim 11:** Anti-AKT poliklonal primer antikoru ile boyanan parafin doku kesitlerinde, yüzey epitel hücrelerinin az immunoreaktivite göstermesine rağmen stromasındaki AKT immünoreaktivitesinin oldukça fazla olduğu görülmektedir (A,B). Hücre örneklerinde, ikinci gün ve birinci hafta örneklerdeki kök hücrelerin immunoreaktivitenin oldukça düşük olduğu gözlenmesine rağmen epitel hücrelerinde kuvvetli immunoreaktivite görülmektedir (C,D). İkinci haftaya ait hücre örneklerinde immunoreaktivite artmış, üçüncü örneklerinde pozitif immünoreaktivite görülmektedir (E,F). İnce ok: over yüzey epiteli, kalın ok: kök hücre, OYE: over yüzey epiteli. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E, F:X400



**Resim 12:** Anti-FOXO3A monoklonal primer antikoruna boyanan parafin doku kesitlerinde, OYE hücreleri arasında hafif şiddette immunoreaktivite gösteren hücreler görülmektedir (A,B). Hücre örneklerinde, ikinci gün ve birinci hafta hücre örneklerinde hafif şiddette görülmektedir (C,D). İkinci hafta ve üçüncü hafta örneklerinde, immunoreaktivitenin azaldığı görülmektedir (E,F). İnce ok: over yüzey epiteli, kalın ok: kök hücre, OYE: over yüzey epiteli. Orjinal Büyütme; A:X400, B:X1000, C, D, E, F:X400





**Resim 13:** Üçüncü hafta hücre örneklerinde “oosit benzeri” ve “blastosist benzeri” hücreler tespit edildi, ancak bu hareketli yapıların immunohistokimyasal boyanmalar sırasında kaybolmasına engel olunamadı. Kalın ok: oosit ve blastosist benzeri yapı. Orjinal Büyütme; A, B, C,D: X100

## 6. TARTIŞMA

Waldeyer tarafından bildirilmiş olan oositlerin intrauterin dönemde çoğalması daha sonra sayısının hızla azalması dogması, 1951 yılında Solomon Zuckermean tarafından yayınlanmıştır. Son yıllarda dişi üreme biyolojisindeki yeni gelişmeler üzerine overde kök hücrelerin varlığı ve bu hücrelerin oositlere dönüştüğünü gösterilmesi üzerine, sabit oosit sayısı hakkındaki görüş değişikliğe uğramıştır (39). Over stromasında bulunan kök hücrelerinin yanı sıra, over yüzey epitelinden köken alan kök hücrelerin oosit'e dönüşebilme yeteneği gösterilmiş ve oosit kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (5). Bu çalışmada over yüzeyinden kazınarak elde edilen kök hücrelerin oosit ve blastosist benzeri hücrelere farklılaşması ve bu farklılaşma sırasında PTEN-PI3K-AKT-FOXO3A yolağının oosit ve/veya blastosist benzeri hücreye dönüşmesindeki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Over doku örneklerinin, Hematoksilin- Eozin (H.E) ile boyanmış preparatlarında, postmenapozal kadınlardan alınmış olması nedeni ile primordial veya gelişmekte olan folliküller yapılar gözlenmedi. Bununla beraber, postmenapozal kadınların over yüzey epiteli (OYE) içinde, oosit gelişiminde rol oynayan kök hücrelerin varlığı, daha önce çalışmalarda gösterilmiştir (5,54,78,79,94,235). Kök hücrelerin, memeli overlerinin yanı sıra, daha alt sınıf canlıların (sürüngen kuş ve balık) overlerinde de bulunduğu gösterilmiş olup, bu hücrelerden oogenez gerçekleştiği ileri sürülmektedir (5,236-239).

Over dokusu içinde farklı bölgelerde kök hücreler bulunmaktadır. OYE hücrelerinin alttaki tunika albugineada bulunan mezenşimal hücrelerden differansiye olduğu, bu hücrelerin germ hücrelerine ve granüloza hücrelerine farklılaşabilme "bipotansiyel farklılaşabilme" potansiyeli olan hücreler oldukları bildirilmiştir (29). OYE hücreleri arasında bulunan ve oosit ve blastosist benzeri hücreler dönüşebilme yeteneği olan hücreler "putativ kök hücreler" (5) veya "over germ kök hücreleri" (2) olarak tanımlanmaktadır. Over dokularının yüzeyleri kazınarak elde edilen epitel hücrelerin arasında çapları oldukça küçük olan hücrelerin bulunduğu ve bu hücrelerin putativ kök hücreler olabileceği ileri sürülmüştür (5). Over yüzey epitel hücrelerinin

arasında sferikal biçimli putativ kök hücrelerin 2 ayrı popülasyonu bulunmaktadır. Bu hücreler boyanmamış hücre kültürü preparatlarda parlak görünümleri ile ayırt edilebilmektedir, ayrıca H.E boyanmasında ise koyu boyalı çekirdeğe sahiptir. Aynı petride bulunan epitel hücreleri ise açık çekirdekleri ile kolayca ayırt edilebilmektedir. Putativ kök hücrelerin iki tipi boyutlarına göre gruplandırılmaktadır. Putativ kök hücrelerin daha küçük boyutta olanları 1-3 mikron çapındadır. Bu hücreler ÇKEBKH (çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler) olarak isimlendirilirken, daha büyük olanlar ise 4-7 mikron çapındadır ve putativ kök hücre adını almaktadır. Bu iki hücrenin immunohistokimyasal özellikleri de farklılıklar göstermektedir. Küçük olan kök hücrelerinin çekirdekleri OCT-4 ile hücre yüzeyi ise SSEA-4 ile boyanırken, daha büyük olanların sitoplazması Oct-4 ile sitoplazması ise SSEA-4 ile minimal düzeyde boyanmaktadır. Benzer biçimde testiste de pluripotent ÇKEBKH'lerin, OCT-4'ün çekirdek ve minimal SSEA-4 ile, daha büyük olanlar heterokromatik yapısı sitoplazmik Oct-4 ve minimal SSEA-4 boyanması ile tanımlanmıştır. (10,240). ÇKEBKH'lerinin asimetric bölünme sonucunda progenitor kök hücrelere dönüştüğü ileri sürülmektedir (159). Parthe overlerdeki H.E ile koyu çekirdek boyanması gözlenen hücrelerin testiküler A koyu spermatogonial kök hücreler ile benzer olduğunu ileri sürmüştür. Overlerde bulunan kök hücrelerin orjini hakkında tartışmalar devam etmekle birlikte, bu hücrelerin OYE'nin yerleşik hücreleri olduğu kabul edilmektedir (6,8,9). ÇKEBKH'lerin gonadlardaki sayıları oldukça düşük bulunmuştur, testiste bulunan ÇKEBKH'lerinin sayısının yaklaşık %1,5 olduğu bildirilmiştir (241).

Bu çalışmada, hem over dokusu kazınan epitel hücreleri arasında, hem de over yüzey epitel hücrelerinden yapılan birinci hafta kültür örneklerinde, OCT-4 pozitif hücreler gözlemlendi ve bu hücrelerin over yüzey epitelinde bulunan daha önce bildirilmiş olan kök hücreler olduğu düşünüldü. OCT-4 hem testis, hem de overde bulunan hücreler tarafından eksprese edilen pluripotensiyi gösteren bir protein olup, putativ germ "kök hücre" belirteci olarak isimlendirilmektedir (12). OCT-4'ün fare embriyolarında preimplantasyon periyodu boyunca eksprese olması ve daha sonra germ hücrelerinde sınırlı olması totipotent düzenleyici bir fonksiyona sahip olduğu biçiminde de değerlendirilmektedir (242). OCT-4 pozitif boyanmanın, testislerde gonositlerde

(243) overlerde ise oogoniumlarda bulunduğu bildirilmiştir (190). Anderson ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada, OCT-4 proteinin insan fetal overinde organın periferal zonundaki oogonialarda sınırlı olduğunu bildirmişlerdir. Bununla beraber OCT-4 pozitif hücreleri gelişimin diğer döneminde de hem testis, hem de over dokusunda bulunmaya devam etmektedir (244). İkinci trimester seminiferöz tübüllerde hem OCT-4 pozitif hemde negatif hücreler gözlenmiş ve OCT-4'ün down regüle olduğu ileri sürülmüştür (245).

OCT-4 eksprese eden hücrelerin sayısının ikinci ve üçüncü hafta preparatlarında çok az sayıda olduğu gözlemlendi ve bu pluripotent hücrelerin diferansiye olmaları nedeni ile sayılarının azalmış olabileceği düşünüldü. Overlerde OCT-4 ekspresyonunun geçici olduğu ve proteinin miktarının azaldığı bu hücrelerin primordial follüküllere dönüştüğü bildirilmiştir (12). OCT-4 ekspresyonunun hücrelerin differansiye oldukça azaldığının bir kanıtı da kanser hücrelerinde gösterilmiştir (169,175,246).

Over yüzey epitelinden elde edilen hücrelerin birinci haftada içindeki alınan örneklerde epitel hücrelerinde de ve ikinci ve üçüncü haftaya ait hücre kültür preparatlarında az sayıda hücrede OCT-4 boyanması gözlemlendi. OCT-4 bir kök hücre belirteci olduğu bilinmesi nedeni ile bu ekspresyonun farklılaşmış hücrelerde gözlenmesi literatür bilgileri ile uyumsuzdur. Bununla beraber daha önce yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar gözlenmiş ve erişkin hücrelerde OCT-4 olmamasına rağmen pseudogenler nedeni ile OCT-4 pozitifliğinin bir artefakt olarak gözlemlendiği bildirilmiştir (248,249). Erişkin dokularda bulunan OCT-4 hücrelerinin doku homeostasisi ve rejenerasyonda görev yaptığı da ileri sürülmektedir (5).

İncelenen preparatlarda OYE hücreleri arasında bulunan OCT-4 eksprese eden kök hücrelerin, epitel hücrelerine komşu olarak yerleştiği gözlemlendi. Oosit benzeri hücrelerin mezenşimal fibroblastlara benzer bölgede geliştiği, bu yakın ilişkinin beslenme desteği sağlama ve steroidlerden östrojen üretimi katalizleyen aromataz ekspresyonu ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (250). Ayrıca germ hücrelerinin büyümesi için gerekli olan mitokondrial enerji sağlanmasında da önemli rol oynadığı da bilinmektedir (8,134,251).

Over yüzey epiteli arasındaki küçük hücrelerde ve birinci hafta hücre kültürü preparatlarında az sayıda küçük hücrenin SSEA-4 ile boyandığı gözlemlendi. SSEA-4'ün bir germ hücre belirteci olduğu ve pluripotensi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu hücrelerin over yüzey epitelinde bulunan kök hücreler olduğunun diğer bir göstergesi olarak değerlendirildi. Virant-Klun ve arkadaşları 2011 yılında yaptığı çalışmada diğer bir çalışmada ise over korteksinin kesitlerinde immunohistokimyasal teknikle SSEA-4 pozitif hücrelerin varlığını göstermiş ve fetal overlerin yüzey epitelinde bulunan primitif oositlere benzetmiştir. Irma Virant-Klun 2013 yılında yaptığı çalışmada SSEA-4 ile boyanan over yüzeyinde elde edilen iki ayrı hücre tipi olduğunu rapor etmiştir. 2-4 mikron çapında yuvarlak sarımsı hücreler ve daha büyük 8 mikron çapında sarımsı hücreler olarak değerlendirmiştir. Büyük hücrelerin düzgün biçimli olmadığını SSEA-4 ekspresyonunun ise hücre yüzeyinde bulunduğunu göstermiştir. Aynı araştırmacılar FACs ile yaptığı sayım sonrası, SSEA-4 pozitif hücrelerin toplam hücre sayısının yaklaşık %1,6'sını oluşturduğunu rapor etmiştir. Primitif oosit benzeri hücrelerin over yüzey epitelinde bulunmasının epitelyal over kanserleri ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (187,252).

Over yüzey epitel hücreleri arasında daha küçük hücrelerin pluripotent kök hücre belirteçleri olan hem OCT-4 hem de SSEA-4 ile boyanmış olması, bu hücrelerin kök hücreler olduğunun ve over yüzey epitelinde bulunduğunun bir kanıtı olarak değerlendirildi. Sayılarının az olmasına rağmen, bu hücrelerin gerektiği durumlarda mitozla çoğalabildiği gösterilmiştir (235). Over dokusu gibi her menstrual siklusta yaralanma ve tamir olaylarının gerçekleştiği organda iyileşmenin hızlanması için farklı hücre tiplerine dönüşebilen hücelere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu iyileşmede OYE hücreleri arasındaki kök hücrelerin yanı sıra kemik iliğinden gelen kök hücrelerin göç ederek rejenerasyonda görev aldığı bir çok hayvanda (235,253,254) ve insanda (255) gösterilmiştir.

VASA, DEAD box gen ailesinin bir üyesi olup dişi germ hücre gelişiminde esansiyel rol oynamaktadır. (256). VASA sitoplazmik bir protein olup germ hücrelerinin gonadal çıkıntıya ulaştıktan sonra, memelilerde premayotik safhasında gametogenez süresi boyunca eksprese olmaktadır (172). Mvh'nin 12,5 günde



kolonizasyondan sonra germ hücrelerinde görüldüğü, buna karşılık primordial germ hücrelerinde görülmediği bildirilmiştir (257). VASA proteinin çok sayıda mRNA azalmasına bağlı olarak çok sayıda mekanizmayı kontrol ettiği bilinmektedir (258). Germ hücreleri için ise esansiyel bir komponent olduğu ve germ hücre differansiasyonunda gerekli olduğu bildirilmiştir (259). Bununla beraber bu çalışma için alınan doku örneklerinde, hem parafin doku kesitlerinde, hemde hücre kültürü örneklerinde hücrelerin yaygın olarak VASA ile boyandığı gözlemlendi. İnsan fetal testislerinde VASA ekspresyonunun sınırlı olduğu fakat proteinin gestasyonun 21. günü testislerde varlığı gösterilmiştir (260). Overlerde ise 2. trimesterde VASA'nın primordial follüküller içindeki oositlerde bulunmaktadır. (190). Bu çalışmadaki yaygın boyanmanın nedeni artefact olarak değerlendirildi. Antikor dilusyonu oranlarının azaltılmasına rağmen boyamalarda değişiklik olmadı.

VASA gonositlerden ve birinci trimester oogonyalardan eksprese olmayıp, ikinci trimester gonadların germ hücrelerinde eksprese olmaktadır (12). VASA'nın oositleri için mRNA'nın transisyonel regülatörü fonksiyonu göstermektedir ve germ hücrelerinin gelişiminin yanı sıra yeni nesil gelişiminde ana eksenini düzenlemektedir (261). VASA postmigrasyon germ hücre belirteci olarak kabul edilmektedir ve bu hücreler pluripotensi özelliği taşımaktadır. VASA'nın over hücre kültürü çalışmalarında varlığı gösterilmiştir. Bu hücrelerin çok küçük çapa sahip olduğu (15–20 µm) ve oosit olmadığı ileri sürülmektedir (262,263). Irma Virant-Klun 2011 over korteksinde yaptığı çalışmada tanımladığı iki hücre tipinden büyük hücrelerin VASA pozitif olduğunu göstermiştir. Bu hücrelerin üreme çağındaki kadınların kortikal dokularındaki follüküllerde görülmediğini bildirmiştir (252). VASA'nın germ hücreler için maturasyonu için esansiyel olduğuda bilinmektedir (12). Gonosit ve periferal oogonia gibi hücrelerde OCT-4 ekspresyonunun pozitif olduğunu, buna karşılık daha matur hücrelerin (prespermatogonia, oogonia ve oosit) VASA eksprese ettiklerini göstermiştir. (12) VASA'nın kolonizasyon sırasında germ hücre soyunda ve daha sonraki gelişim aşamalarında gözlenmesi germ hücrelerinin devamlılığı ve fonksiyonu için gerekli olduğunun bir belirtisi olarak değerlendirilmektedir (172). Anderson ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada embriyonik dönem sırasında ikinci trimesterde VASA

miktarının arttığını kanıtlamıştır(12). Ayrıca gestasyonel 9.-14. haftalar arası VASA miktarının arttığını ve dişi germ hücrelerinin mayoz bölünmeye girmesi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Erkek germ hücrelerinde ise gonositlerin maturasyonu sırasında artmaktadır.

Over yüzey epiteli preparatların incelenmesinde ikinci haftada yüzey epitel hücreleri arasında morfolojik olarak kök hücreler benzer hücrelerin C-KİT monoklonal antikoruna ile immunopozitif olarak boyandığı gözlemlendi. C-KİT'in bir protein tirozin kinaz reseptörü olduğu hücresel proliferasyon, sağkalım, adhezyon, sekresyon ve diferansiasyonda rol oynadığı bilinmektedir. Parrott ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı çalışmada normal OYE hücreleri arasında C-KİT immüonreaktivitesi gözlemlenmiş ve normal OYE fonksiyonu için gerekli olduğunu rapor etmiştir (14). OYE'den uzakta bulunan bazı stromal hücrelerde de yoğun boyanma gözlemlenmiş ve OYE hücrelerinin proliferasyonunda C-KİT'in rolü olduğunu bildirmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda C-KİT'in oosit büyümesi ve follikül gelişiminde esansiyel rol oynadığını (13) oosit benzeri hücrelerde de germinal veziküle benzer yapılar gözlemlenmiş ve bu hücrelerin C-KİT transkripsiyon faktörünü ekspres ettiğini ve follikül/oosit ile germ hücre gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (187). Buna karşılık C-KİT bloke edildiğinde farelerde postnatal follikül gelişiminin bozulduğu gözlemlenmiş ve FSH reseptörü ekspres edilmeden önce follikül gelişiminde önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (13-15).

Kit ligantı sadece germ hücrelerinde değil melanosit, mast hücreleri ve hematopoetik hücrelerin diferansiasyonu üzerine de etkilidir. (14). Bu hücreler gelişimsel süreçleri üzerine kit ligantının etkisi ile diferansiyasyon olmaktadır. Ayrıca C-KİT akciğer, tiroid, göğüs ve testiküler kanser gelişiminde de önemli rol oynamaktadır. C-KİT'in jinekolojik tümörlerden seröz adenokarsinom ve overin germ hücre tümörlerinde de rol oynadığı bildirilmiştir (264). Parrott ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada hem insan hem de inek overlerinde bazı over yüzey epitel hücrelerinin KL ve C-KİT proteininin varlığını göstermişlerdir. İnsan over kanserlerinde de C-KİT'in epitel sınırında varlığı over tümörlerinin erken dönemlerinde KL'in önemli rol oynadığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (14).

Bu çalışmada alınan over doku örneklerinin H.E ve 1. hafta hücre kültürü prepartlarındaki kök hücrelerin ve epitel hücrelerinin, orta düzeyde sitokeratin (CK) eksprese ettiği gözlemlendi. Sitokeratinin dokuların ektoderm veya endodermden köken almalarına göre ayrılmalarında kullanıldığı uzun süredir bilinmektedir (265). Over yüzey epitel hücrelerinin alışılmış epitel hücrelerinden farklıdır ve daha az differansiye olmaları nedeni ile hem epitelyal, hemde mezenşimal belirteçler taşımaktadır.. Daha önce yapılan çalışmalarda embriyonik gelişim sırasında Sertoli hücrelerinin de vimentin, CK-18 eksprese ettikleri ve bu ekspresyonların Sertoli hücrelerinin epitel orjinli olduğunun bir belirtisi olduğu bildirilmiştir. Sıçanlarda doğumdan iki hafta sonra sitokeratin ekspresyonunun ortadan kalkması, önemli modifikasyonların gerçekleştiğinin bir belirtisi olarak değerlendirilmektedir (266).

Bu çalışmada alınan hücre örneklerinin 1. ve 2. haftaya ait hücrelerin incelenmesinde epitel hücrelerinde CK ekspresyonu hafif düzeyde devam ederken yuvarlak “oosite benzer” hücrelerde ekspresyonun artmış olduğu gözlemlendi. Sıçan fetus overinde CK eksprese edildiği bilinmektedir (267). Erişkin insan overinde de granüloza hücrelerinde CK-18 varlığı gösterilmiştir. Buna karşılık erişkin sıçan overinde granüloza hücreleri CK eksprese etmemektedir. (267). V. Fridmacher ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, CK-18 primer ve büyümekte olan folliküllerde gözlemlenmişler, fakat ekspresyonun büyüyen follikülün granüloza hücrelerinde kaybolduğunu tespit etmişlerdir. Virant-Klun ve arkadaşları 2011 yılında yaptığı çalışmada primordial folliküller arasında bazılarının CK pozitifliği gösterdiği bildirmişlerdir. Löffler ise CK pozitif hücrelerin bazı primordial, primer folliküllerin, hem folliküler hem granüloza hücrelerinde varlığını göstermişler ve heterojen morfolojiye sahip granüloza hücrelerinin iki farklı kaynaktan köken aldığını, sitokeratin farklılığının da bu nedenle olduğunu ileri sürmüşlerdir (252).

CK'nin seksüel differansiasyondan önce bulunduğu bilinmektedir. Germ hücrelerinin halen tam farklılaşmamış olması nedeni ile CK ekspresyonunun devam ettiği düşünüldü. Townson DH ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bovine over folliküllerinde ve korpora luteada (CL) CK-18 varlığının apoptoza karşı direnç oluşturmada önemli rol oynadığını ve geliştirmekte olan folliküllerde CK-18<sup>+</sup> hücre popülasyonunun artış

gösterdiğini, CL'da luteal hücrelerin östrus siklusu boyunca sabit olarak bulunurken, atretik folliküllerde ise az sayıda hücrenin CK-18<sup>+</sup> olduğunu bildirmişlerdir (269).

Zona pellusida (ZP) glikoprotein yapıda olup tüm memelilerde oositleri çevreleyen ZP'nin türe özel sperm bağlanmasında, akrozom reaksiyonunda polisperminin önlenmesinde implantasyon öncesi embriyonun yapışmasının önlenmesinde önemli rolü bulunmaktadır. ZP yapısında 4 tip protein olduğu bilinmektedir (206). ZP-1 filamantöz ana yapıyı oluşturur, ZP-3 primer sperm ligantıdır, ZP-2 sekonder ligantı oluşturmaktadır. ZP4'ün insanlarda 1 kromozom üzerinde yerleşmiştir, 540 aa uzunluğunda polipeptit zinciri bulunmaktadır (205). ZP-4 tek başına sperm bağlama yeteneği olduğu rapor edilmiş olmasına rağmen ZP-3 olmadığı ortamlarda sperm bağlanmadığı gösterilmiştir (271). Buna karşılık ZP-3'ün spermin ya akrozomal cap bölgesinden ya da ekvatoryal bölgesinden bağlandığı akrozom reaksiyonuna girmiş spermin akrozomal kep bölgesinden ZP3 ile bağlanmadığı gösterilmiştir. Buna karşılık ZP-4 ile yüksek oranda sperm akrozomal kep bölgesinden bağlanmış olmasının ZP-3 ve ZP-4'ün spermatozoa üzerinde ayrı bağlanma bölgeleri olduğunun bir kanıtı olarak kabul edilmektedir (272).

Parthe ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, insan ve koyunlardaki oosit benzeri hücrelerin ZP-4'ü C-KİT, DAZL, GDF-9 ve VASA ile birlikte oositlerin gelişimde rol oynayan germ hücrelerin belirteci olarak bildirmiştir (5). Bu çalışmada ZP-4 monoklonal antikoruna ile boyanmış preparatların incelenmesinde birinci ve ikinci haftaya ait hücre kültürü materyallerinde boyanmış hücre gözlenmezken, 3. haftaya ait örneklerde yuvarlak biçimli oosit benzeri hücrelerin kuvvetli pozitif immunohistokimyasal boyandığı gözlemlendi. ZP-4 proteininin varlığı bu hücrelerin oosit benzeri hücreler olabileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi. ZP-4 ekspresyonunun primordial ve primer folliküllerdeki oositler tarafından eksprese olduğu bildirilmiştir (273). Maymunlarda yapılan in situ hibridizasyon çalışmasında ZP-2'nin büyüyen folliküllerin her aşamasında, ayrıca olgun preovulatuvar folliküllerin granüloza hücrelerinde bulunduğu gösterilmiştir (274). ZP-3'ün ise tüm folliküllerdeki oositlerde ve granüloza hücrelerinde olduğu, ZP-4'ün sekonder folliküllerde bulunduğu tersiyer folliküllerde azaldığı, primordial primer antral folliküllerde ve granüloza hücrelerinde

bulunmadığı gösterilmiştir (272). Oosit benzeri hücrelerde tespit ettiğimiz ZP-4 immünoaktivitesinin varlığı bu hücrelerin erken dönem follikül gelişimi aşamasında olabileceğini düşündürdü. Bukovsky 2008 yılında yaptığı çalışmada follikül gelişimi sırasında, oositlerden ve atrezik foliküllerden, gerçekleşen ZP-4 ekspresyonunun ZP-2'den daha önce gerçekleştiğini, sekonder folliküllerdeki oositlerden ve gelişmekte olan folliküllerden eksprese olan ZP-3'ün ise en son ortaya çıktığını bildirmiştir. ZP-3'ün büyüyen folliküllerdeki oosit maturasyonu ile ilişkili olduğu, fakat primordial folliküller için böyle bir ilişki bulunmadığı ileri sürülmektedir (83). Primordial folliküllerden ise sadece ZP-4 eksprese olmaktadır ve ZP-4 antikorları primordial folliküller havuzdaki oositleri etkilemektedir. Diğer taraftan açıklanamayan normogonadotropik dışı infertilitesinde ZP-2, ZP-3 ve IgM antikorları kan follikül bariyerini yüksek molekül ağırlığı nedeni ile geçemez sağlıklı primordial folliküllere etki etmez (275) fakat ovulasyonu gerçekleştirmiş oositlerin sperm ile bağlanmasını engellemektedir.

Alınan hücre örneklerinin hem ilk gün örneklerinde, hemde birinci gün ve birinci haftaya ait doku örneklerinde OYE hücrelerinin PTEN monoklonal antikoruna ile kuvvetli immunoreaktivite gösterdiği tespit edildi. Morfolojik olarak kök hücrelere benzeyen hücrelerde PTEN seviyesinin yüksek düzeyde olması, bu hücrelerin PTEN aracılığıyla farklılaşmasını engellediği, böylece doku içinde follikül gelişiminin bir nedeni olarak ileri sürülebilir. Daha önce yapılan çalışmalarda PTEN, PI3K'ın negatif düzenleyicisi olduğu bildirilmiş ve primordiyal follikül aktivasyonunu baskılama fonksiyonu olduğu ileri sürülmüştür (209,210). Adhikari ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada PTEN inhibitörlerinin kullanılmasının primordiyal follikülleri aktive edeceğini, büyümelerine izin vereceğini ve folliküllerin FSH'a yanıt verebileceğini rapor edilmiştir. PTEN inhibitörlerinin hem neonatal fare overlerinde hem de insan over kortikal dokularındaki primordiyal follikülleri aktive ettiği, ayrıca aktive edilen bu primordiyal folliküllerin, olgun folliküllere geliştiği ve overektomi yapılan farelerin böbrek kapsülü içerisine transplantasyonu sonrasında fertilize olabilen oositler meydana getirdiği aynı grup tarafından bildirilmiştir (211). Ayrıca PTEN tümör baskılanmasında ve çeşitli dokularda metabolik düzenlemede rollerinin olduğu bilinmesine rağmen, yeni IVF teknikleri denemesi sırasında farelerde kronik hastalık

bulguları gözlenmemiştir. PTEN'in eksikliği çeşitli dokularda tümöral oluşuma neden olmaktadır. Farede primordiyal germ hücreleri, prostat, pankreas, meme epiteli, tiroisitler, karaciğer ve düz kas hücre hatlarındaki PTEN'in şartlı delesyonları sırasıyla teratomlar, prostatik kanserler, pankreatik kanserler, meme kanserleri, tiroid kanserleri, kolanjiyosarkomlar ve leyomiyosarkomlar ile ilişkili olduğu bildirilmiş olmasına rağmen, kısa süreli insan ve sığır over dokularının PTEN inhibitörleri ile muamele edilmesinden sonra SCID farelere böbrek kapsül altına transfer edilmesi sonrasında tümör oluşumu gözlenmemiştir (210). Adhikari ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada PTEN inhibitörlerinin kullanımının sağlıklı nesiller oluşması için fertilize olabilen olgun fare yumurtalarının verimini arttırdığını ve sağlıklı ve fertilize olabilen insan oositleri üretebilmek için klinik öneme sahip olduğunu bildirmiştir (211).

Daha önce PTEN ile ilgili yapılan çalışmalar, over dokusunda follikül gelişimini incelenmesi ile ilgilidir, PTEN'in OYE hücreleri üzerindeki fonksiyonları ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Alınan hücre örneklerinin 2. ve 3. haftasına ait örneklerde, kök hücrelerdeki PTEN immunoreaktivitesinin giderek azaldığı tespit edildi. PTEN'in oosit üzerine olan farklılaşmayı baskılama özelliğinin ortadan kalması ile kök hücrelerinin oositlere farklılaşmasında rol oynadığı düşünüldü. Daha önce yapılan bir çalışmada oosit spesifik PTEN, primordial folliküllerdeki oositler üzerinde ortadan kaldırılmış ve Pten<sup>-/-</sup> farelerde primordial folliküllerin aktive edilmesi ile primer ve sekonder folliküllerin aşırı gelişimi dolayısı ile primordial folliküllerin erken depleasyonu gözlenmiştir (276). PTEN'in primordial folliküllerin hareketsiz kalmasının sağlanmasında esansiyel rol oynadığı ileri sürülmektedir (277). Supresör ve aktivatör sinyallerinin koordineli eylemi follikül büyümesinin başlaması ve devam etmesi için gereklidir. PTEN eksikliğinin dormant fazdaki primordial folliküllerin erken aktivasyonuna ve dolayısı ile oositlerin erken çocukluk döneminde tükenmesine ve premature over yetmezliğine (POF) neden olmaktadır (209).

PI3K primordial follikül gelişiminde rol oynadığı, oositlerin yaşamını, kaybını ve primordial folliküllerin aktivasyonunu kontrol ettiği bilinmektedir (278). Alınan doku örneklerinin parafin bloklarından ve birinci hafta hücre örneklerinde PI3K immunoreaktivitesinin oldukça düşük olduğu gözlemlendi ve over yüzey epitel hücreleri

arasında bulunan kök hücrelerin oosit benzeri hücrelere benzer hücrelere diferansiye olmalarında PTEN'in artmış olması nedeni ile PI3K baskılandığı düşünüldü. Hücre kültürü ile yapılan oosit farklılaşma mekanizmalarında, PI3K rolü bilinmemektedir. Bununla beraber in vivo oositlerde PI3K sinyal yolağının ekstrasellüler sinyaller ile aktive edildiği ve primordial folliküllerin yaşamını devam etmesinde rol oynadığı bilinmektedir. PI3K aktivasyonu kit ligantlar aracılığı ile başlatılmakta ve oosit ve granüloza hücrelerinde reseptör protein tirozin kinaz (RPTK) Kit ve onun ligantı Kit ligand (KL) bulunmaktadır. Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) olmayan oositlerinde artmış aktivasyonu primordial folliküllerin premature aktivasyonuna neden olmaktadır. Oosit spesifik Tsc1 (279) veya Tsc2 (280) delesyonunun mTORC1 aktivitesini arttırdığı böylece pubertede primordial folliküllerin aktivasyonunun arttığı ve POF geliştiği gözlenmiş olması mTORC1 ile PI3K'nın birlikte primordial gelişiminde düzenleyici rol oynadığının bir belirtisi olarak değerlendirilmektedir(211).

PI3K aktivasyonunun oositlerdeki bazal seviyesi, primordial follikül gelişimi için esansiyeldir (211), primordial folliküllerdeki oositin *Pdk1* geni ortadan kaldırılsa hücreler bekleme döneminde direkt olarak ölmektedir (17). Bizde bu çalışmada PI3K aktivasyonunu ikinci haftada hafif ve 3 haftada daha fazla artmış olduğu tespit edildi ve PI3K'nın farklılaşmada önemli rol oynadığı düşünüldü. Primordial folliküllerin gelişiminde çok sayıda faktör fonksiyon göstermesine rağmen, intra-oosit PI3K'nın major rol oynadığı ileri sürülmektedir (16). PI3K'nın Xenous oositleri (281). için mayozu tekrar başlatıcı ajan olduğu ileri sürülmüştür. MIS uygulamalarında PI3K'nın aktive olduğu ve oositin mayoz maturasyona başladığı gösterilmiştir. Buna karşılık PI3K inhibisyonu progesteron tarafından stimüle edilen germinal vezikül yıkımını (GVBD)' durdurmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalar folliküler üzerinde olup, over yüzey epitel hücreleri arasında bulunan kök hücrelerden oosit benzeri hücrelere dönüşüm aşamasında PI3K'nın rolü bilinmemektedir. Primordial folliküler düzeyinde çalışmalarda pre-granüloza hücrelerinin follikül gelişimi ve aktivasyonu için önemli olduğu bu ilişkinin oosit büyümesi ve folliküler gelişimin devamı için düzenleyici

olduğu ileri sürülmektedir. (16). PI3K yolağı ayrıca granüloza hücrelerinin diferansiasyonunda da rol oynamaktadır. Granüloza hücrelerinde PTEN delesyonu yapılırsa, PI3K-AKT yolağının hiperaktive olduğu bunun sonucunda ise luteolizin baskılandığı granüloza hücrelerinin proliferere olduğu follikül büyümesinin arttığı gösterilmiştir (282). Primer ve daha sonraki aşamalarda oosit içindeki PI3K sinyal yolağının artırılması veya azaltılmasının follikül gelişimi ve oosit maturasyonu üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (16). PDK1-AKT sinyal yolağının mayoz maturasyonu düzenlediği PTEN ve Pdk1 eksikliğinde mayoz ilerlemesinde farklılık gözlenmediği (17) ve intra oosit PI3K yolağının oosit mayoz başlamasına vazgeçilmez olmadığı ileri sürülmüştür (16). Bununla beraber, bu çalışmada granüloza hücrelerinin olmamasına rağmen, PTEN'nin 2. ve 3. haftalarda artmış olması oositlere doğru farklılaşmada rol oynadığının bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Protein kinaz B (PKB) olarak bilinen serin/tireonin protein kinaz AKT, insan fizyolojisinin önemli düzenleyicisidir ve büyüme, hayatta kalma, proliferasyon ve metabolizmanın düzenlenmesini içeren çeşitli hücrel fonksiyonları kontrol etmektedir (18).

Alınan postmenopozal kadınların over doku örneklerinin parafin kesitlerde yüzey epitel hücrelerinin oldukça az boyanmasına rağmen stromasındaki AKT immünoaktivitesinin oldukça fazla olduğu gözlemlendi. AKT'nin PI3K yolağının bir elemanı olması nedeni ile PI3K'nın stromada oldukça düşük olmasına rağmen AKT'nin stromada artmış olması PI3K ile uyumlu olmayan bir artış olarak değerlendirildi. AKT'nin menstrel siklus boyunca değişmediği, ektopik gebeliklerde desiduada en yüksek seviyede ekspres edildiği bildirilmiştir (283). Postmenopozal kadınların endometriumlarında ovarian yetmezlik nedeni ile atrofi ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber adrenal medullada üretilen androstenodion yağ dokuda östrojene dönüşmesinin artmış olması endometriumda proliferatif aktivitesini arttırmaktadır. Postmenopozal kadınlarda östrojen reseptörü alfanın (ER1 $\alpha$ ) glandular epitelde (284) ve epitel hücrelerinde (285) arttığı gösterilmiştir. ER1 $\alpha$ 'nın birkaç yolla AKT yolağını aktive ettiği böylece hücre sağ kalım proliferasyon ve apoptozu düzenlediği bilinmektedir (286). Hücre kültürü yapılan OYE hücrelerinin birinci hafta örneklerinde AKT



aktivasyonunun oldukça düşük olduğu gözlemlendi. AKT/PKB yolağının aktivasyonu mitotik fazda hücrenin girişini düzenlemektedir. Ayrıca AKT, MPF aktivasyonunu ve CDC25B fosfatazın AKT bağımlı fosforilasyonu ile 1 hücreli fare embriyolarının gelişimini indüklemektedir. (287). AKT proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu baskılamakta ve apoptozu bloke etmektedir(288). Bu nedenle bu çalışmada AKT immünoreaktivitesinin düşük olması henüz farklılaşmanın başlamadığının bir göstergesi olarak değerlendirildi.

AKT immünoreaktivitesi ikinci haftaya ait hücre örneklerinde artmış bulundu. Primordial folliküllerdeki oositlerde PI3K-AKT'ın yüksek olduğu ve PTEN'i baskıladığı bu durumun primordial folliküllerin prematur aktivasyonunu açıklamak için yeterli olduğu bildirilmiştir (209) mTORC1'in follikül gelişiminde primordial follikül aktivasyonu yaparak rol oynadığı bilinmektedir(289). Uzun süreli rapamisin uygulamasının mTORC1'i inhibe ettiği buna karşılık AKT yolağını aktive ettiği bilinmektedir. AKT yolağının negatif feedback düzenleyicisi olan mTORC1 inhibisyonu ile AKT aktivitesi ve artmakta ve primordial follikül aktivitesi gerçekleşmektedir. (159,209,211), AKT aktivasyonu oosit çekirdeğinin germinal vezikül yıkılması(GVBD) olarak isimlendirilen olayında gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. AKT CDK1-siklin B kompleksini aktive ederek mitotik faza girmesinde rol oynamaktadır (290). PI3K-AKT/PKB yolağı inhibisyonu siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1) ve mayozun tekrar başlamasını engellemektedir (291).

AKT immünoreaktivitesi üçüncü hafta hücre kültürü örneklerinde pozitif olarak boyandığı gözlemlendi. Oosit gelişiminin yanında embriyo gelişiminde de rol oynayabileceği düşünüldü. Riley ve arkadaşları (292) fertilizasyondan sonra da AKT/PKB sinyal aktivitesinin fare preimplantasyon embriyosunda yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. AKT/PKB'nin MPF aktivasyonunda rol oynadığını ve 1 hücreli fare embriyosunun gelişmesini sağladığı da bilinmektedir (287)

AKT/PKB normal hücre sağ kalımını sağlamanın yanı sıra, fertilize fare oositlerinde ilk mitotik bölünmede anahtar rol oynadığı da ileri sürülmektedir. AKT yolağının inhibisyonu ise CDK1 aktivitesini azalttığı ve mayozun başlamasını

geciktirdiği fare oositlerinde gösterilmiştir (291). 1 hücreli embriyoda AKT/PKB inhibe edilirse belirgin apoptoz gözlemlendiği CDK1 inhibe edilen 1 hücreli embriyolarda ise apoptoz gözlenmediği bildirilmiştir (293).

FOXO ailesinin üyelerinden olan FOXO1, FOXO3 ve FOXO4 dışı üreme sistemi içinde gonadal fonksiyonların kontrolü, embriyogenez ve follikülogenezde önemli rol oynamaktadır (19). Bununla beraber, parafin doku kesitlerinde, OYE hücreleri arasında, ikinci gün ve birinci hafta hücre kültürü örneklerinde hafif şiddette FOXO3A aktivitesi gözlemlendi. OYE içinde bulunan kök hücrelerin farklılaşmasında rolü olabileceği düşünüldü. OYE'nin FOXO ekspresyonu ile ilgili olarak literatür araştırmasında bir bilgi bulunmamaktadır. Wang ve arkadaşları 2013 yılında yaptığı çalışmada bazı kök hücrelerin hemostaz ve devamlılığında FOXO3A'nın yeni bir özelliği olarak reprogramlanma işlemine ve differansiasyon işlemine katıldığını rapor etmiştir (294). 2013 yılında Nature dergisinde yayınlanan Warr ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da hematopoetik kök hücrelerin otofajik programdan FOXO3A ile korunduğu bildirilmiştir (295).

İkinci hafta ve üçüncü hafta hücre kültürü örneklerinde FOXO3A aktivitesinin oldukça düşük olduğu gözlemlendi. FOXO3A memeli overinde folliküler aktivasyon ve erken gelişim dönemini kontrol etmektedir. Oositlerdeki yüksek PI3K-AKT sinyal yolağının aktivitesi oositlerdeki FOXO3A'yı inhibe ederek primordial folliküllerin aktivasyonunda inhibitör rol oynamaktadır. (Castrillon et al., 2003), Oosit nükleusunda bulunan FOXO3A belirgin biçimde down regüle olmakta ve primordial ve erken dönem primer follikül gelişiminde rol oynamaktadır (297,298). FOXO3A inaktivasyonunun fertilitiyi hızlı biçimde azalttığı, follikülleri atreziye uğrattığı, primordial folliküllerin tükettiği bildirilmiştir (18). Oosit spesifik FOXO3A yokluğu PTEN delesyonu ile benzer fenotipe tablo oluşturmaktadır (Reddy 2008). Bununla beraber PTEN yokluğunda PI3K, AKT bağımlı fosforlizasyonu ve FOXO3A'nın nükleer eksportunu direkt olarak stimüle etmekte ve kontrolsüz primordial follikül aktivasyonuna neden olmaktadır.

Aşırı FOXO3A ekspresyonunun follikül gelişiminin bozulması nedeni ile dişi infertilitesine de neden olduğu bildirilmiştir (18). Yeni doğan overinde FOXO3A overekspresyonu Bim (B-cell lymphoma-2), FasL ve p27 azalmasına ve dolayısı ile oositlerin apoptoza girişini stimüle etmektedir (298). Yapısal olarak aktive FOXO3A ayrıca BMP-15, konneksin37 ve konneksin-43'ü etkileyerek oosit büyümesini follikül gelişimini inhibe etmektedir. (18).



## 7. SONUÇLAR

Çalışmamızda, Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü ile Merkez Efendi Devlet Hastanesi Doğumevi Kliniğine çeşitli jinekolojik hastalıklar nedeni başvuran ve ile opere olan, etik onam formunu imzalayan, postmenopozal kadın hastalardan toplanan over doku örnekleri ve over doku örneklerinden elde edilen OYE hücre kültürleri birinci hafta, ikinci hafta ve üçüncü hafta örnekler alınarak rutin histokimyasal ve anti- OCT-4, anti-SSEA-4, anti-C-KİT, anti-VASA, anti- anti-ZP-4, anti-CK-18, anti-PTEN, anti-PI3K, anti-pAKT1/2/3, anti-FOXO3 primer antikoları kullanılarak avidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile indirekt immünohistokimyasal boyamalar uygulandı.

OCT-4 immunoreaktivitesi hem over dokusu kazınan epitel hücreleri arasında, hem de over yüzey epitel hücrelerinden yapılan birinci hafta kültür örneklerinde, OCT-4 pozitif hücreler gözlemlendi ve bu hücrelerin over yüzey epitelinde bulunan daha önce bildirilmiş olan kök hücreler olduğu düşünüldü.

Over yüzey epitelinden elde edilen hücrelerin birinci haftada içindeki alınan örneklerde epitel hücrelerinde de ve ikinci ve üçüncü haftaya ait hücre kültür preparatlarında az sayıda hücrede OCT-4 boyanması gözlemlendi.

OCT-4 eksprese eden hücrelerin sayısının ikinci ve üçüncü hafta preparatlarında çok az sayıda olduğu gözlemlendi ve bu pluripotent hücrelerin diferansiye olmaları nedeni ile sayılarının azalmış olabileceği düşünüldü.

İncelenen preparatlarda OYE hücreleri arasında bulunan OCT-4 eksprese eden kök hücrelerin, epitel hücrelerine komşu olarak yerleştiği gözlemlendi.

SSEA-4 immunoreaktivitesi over yüzey epiteli arasındaki küçük hücrelerde ve birinci hafta hücre kültürü preparatlarında az sayıda küçük hücrenin SSEA-4 ile boyandığı gözlemlendi.

Over yüzey epitel hücreleri arasında daha küçük hücrelerin pluripotent kök hücre belirteçleri olan hem OCT-4 hem de SSEA-4 ile boyanmış olması, bu hücrelerin

kök hücreler olduğunun ve over yüzey epitelinde bulunduğunun bir kanıtı olarak değerlendirildi.

Bununla beraber bu çalışma için alınan doku örneklerinde, hem parafin doku kesitlerinde, hem de hücre kültürü örneklerinde hücrelerin yaygın olarak VASA ile boyandığı gözlemlendi.

Bu çalışmadaki yaygın boyanmanın nedeni artefakt olarak değerlendirildi. Antikor dilusyonu oranlarının azaltılmasına rağmen boyamalarda değişiklik olmadı.

Over yüzey epiteli preparatların incelenmesinde ikinci haftada yüzey epitel hücreleri arasında morfolojik olarak kök hücreler benzer hücrelerin C-KİT monoklonal antikoruna ile immunopozitif olarak boyandığı gözlemlendi.

Bu çalışmada alınan over doku örneklerinin H.E ve 1. hafta hücre kültürü preparatlarındaki kök hücrelerin ve epitel hücrelerinin, orta düzeyde sitokeratin (CK) ekspresyonu ettiğini gözlemlendi.

Bu çalışmada alınan hücre örneklerinin 1. ve 2. haftaya ait hücrelerin incelenmesinde epitel hücrelerinde CK ekspresyonu hafif düzeyde devam ederken yuvarlak “oosite benzer” hücrelerde ekspresyonun artmış olduğu gözlemlendi.

Bu çalışmada üçüncü haftaya ait over yüzey epiteli hücre kültürü örneklerinin CK-18 ile boyanmış preparatlarında da epitel hücrelerinin daha hafif olmak üzere yuvarlak biçimli farklılaşan hücrelerde CK immünoaktivitesinin fazla olduğu gözlemlendi.

Bu çalışmada ZP-4 monoklonal antikoruna ile boyanmış preparatların incelenmesinde birinci ve ikinci haftaya ait hücre kültürü materyallerinde boyanmış hücre gözlenmezken, 3. haftaya ait örneklerde yuvarlak biçimli oosit benzeri hücrelerin kuvvetli pozitif immunohistokimyasal boyandığı gözlemlendi.

ZP-4 proteininin varlığı bu hücrelerin oosit benzeri hücreler olabileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Oosit benzeri hücrelerde tespit ettiğimiz ZP-4 immünoaktivitesinin varlığı bu hücrelerin erken dönem follikül gelişimi aşamasında olabileceğini düşündürdü.

Alınan hücre örneklerinin hem ilk gün örneklerinde, hem de birinci gün ve birinci haftaya ait doku örneklerinde OYE hücrelerinin PTEN monokonal antikoru ile kuvvetli immunoreaktivite gösterdiği tespit edildi. Morfolojik olarak kök hücrelere benzeyen hücrelerde PTEN seviyesinin yüksek düzeyde olması, bu hücrelerin PTEN aracılığıyla farklılaşmasını engellediği, böylece doku içinde follikül gelişiminin bir nedeni olarak ileri sürülebilir.

Alınan hücre örneklerinin 2. ve 3. haftasına ait örneklerde, kök hücrelerdeki PTEN immünoaktivitesinin giderek azaldığı tespit edildi. PTEN'in oosit üzerine olan farklılaşmayı baskılama özelliğinin ortadan kalması ile kök hücrelerinin oositlere farklılaşmasında rol oynadığı düşünüldü.

Alınan doku örneklerinin parafin bloklarından ve birinci hafta hücre örneklerinde PI3K immünoaktivitesinin oldukça düşük olduğu gözlemlendi ve over yüzey epitel hücreleri arasında bulunan kök hücrelerin oosit benzeri hücrelere benzer hücrelere diferansiye olmalarında PTEN'in artmış olması nedeni ile PI3K baskılandığı düşünüldü.

Bizde bu çalışmada PI3K aktivasyonunu ikinci haftada hafif ve 3 haftada daha fazla artmış olduğu tespit edildi ve PI3K'nın farklılaşmada önemli rol oynadığı düşünüldü.

Bununla beraber, bu çalışmada granüloza hücrelerinin olmamasına rağmen, PTEN'nin 2. ve 3. haftalarda artmış olması oositlere doğru farklılaşmada rol oynadığının bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Alınan postmenopozal kadınların over doku örneklerinin parafin kesitlerde yüzey epitel hücrelerinin oldukça az boyanmasına rağmen stromasındaki AKT immünoaktivitesinin oldukça fazla olduğu gözlemlendi. AKT'in PI3Kyolağının bir elemanı olması nedeni ile PI3K'nın stromada oldukça düşük olmasına rağmen AKT'in stromada artmış olması PI3K ile uyumlu olmayan bir artış olarak değerlendirildi.

Hücre kültürü yapılan OYE hücrelerinin birinci hafta örneklerinde AKT aktivasyonunun oldukça düşük olduğu gözlemlendi.

Bu nedenle bu çalışmada AKT immünoreaktivitesinin düşük olması henüz farklılaşmanın başlamadığının bir göstergesi olarak değerlendirildi.

AKT immünoreaktivitesi ikinci haftaya ait hücre örneklerinde artmış bulundu.

AKT immünoreaktivitesi üçüncü hafta hücre kültürü örneklerinde pozitif olarak boyandığı gözlemlendi. Oosit gelişiminin yanında embriyo gelişiminde de rol oynayabileceği düşünüldü.

FOXO3A immünoreaktivitesi arafin doku kesitlerinde, OYE hücreleri arasında, ikinci gün ve birinci hafta hücre kültürü örneklerinde hafif şiddette FOXO3A aktivitesi gözlemlendi. OYE içinde bulunan kök hücrelerin farklılaşmasında rolü olabileceği düşünüldü.

İkinci hafta ve üçüncü hafta hücre kültürü örneklerinde FOXO3A aktivitesinin oldukça düşük olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada az sayıda kök hücre tespit edildi. Üçüncü hafta hücre örneklerinde “oosit benzeri” ve “blastosist benzeri” hücreler tespit edildi, ancak bu hareketli yapıların immunohistokimyasal boyanmalar sırasında kaybolmasına engel olunamadı. İnsan çalışmasının getirdiği doku elde etmedeki güçlükler neden ile çalışmaya dahil edilen vaka sayısının azlığı boyamaların tekrarlanmasını engelledi. Bununla beraber, postmenopozlu kadınların overlerinde folliküller olmamasına rağmen yüzey epitel hücreleri arasında kök hücrelerin varlığı ilginç bulundu. Bu hücrelerden oosit benzeri hücreler gelişebileceği gözlemlendi. OYE hücreleri arasında bulunan kök hücrelerin, oosit ve/veya blastosist benzeri hücreye dönüşmesindeki sırasında PTEN-AKT-FOXO3A yolağının aktif fonksiyon gösterdiği tespit edildi. OYE içerisinde bulunan kök hücrelerin varlığı ve oositlere dönüşebilme yeteneği, bu hücrelerin ovaryan yetmezlik vakalarında kullanılmasına olanak sağlayabilir. Ayrıca OYE’den elde edilen kök hücrelerin veya embriyoların değişiklik dokulara farklılaştırılması, rejeneratif tıpta da yeni ufuklar açabilir.

## 8. KAYNAKLAR

1. Auersperg N, Edelson MI, Mok SC, Johnson SW, Hamilton TC., The biology of ovarian cancer. *Semin Oncol*, 1998; 25:281–304
2. Celik O, Celik E, Turkcuoglu I, Yilmaz E, Simsek Y ve Tiras B., Germline cells in ovarian surface epithelium of mammals: a promising notion. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012; 10:112
3. Auersperg N, Alice S. T. Wong, Kyung-Chul Choi, Sung Keun Kang and Peter C. K. Leung., Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews*, 2001; 22(2): 255–288
4. Ivarsson K, Sundfeldt K, Brännström M, Janson P O., Production of steroids by human ovarian surface epithelial cells in culture: possible role of progesterone as growth inhibitor. *Gynecologic Oncology*, 2001; 82:116–121
5. Parte S, Bhartiya D, Telang J, Daithankar V, Salvi V, Zaveri K and Hinduja I., Detection, characterization, and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. *Stem Cells And Development*, 2011; 20:1451-1464
6. Zou K, Zhaojuan ZY, Luo YH, Sun K, Zhou L, Xiang L, Shi L, Qingsheng Y, Zhang Y, Hou R and Wu J., Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature Cell Biology*, 2009; 11:631-636
7. Nayernia K, JH Lee, Drusenheimer N, Nolte J, Wulf G, Dressel R, Gromoll J and Engel W., Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest*, 2006; 86:654-663
8. Bukovsky A, M Svetlikova and MR Caudle., Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005; 3:17–30.
9. Virant- Klun I, P Rozman, B Cvjeticanin, E Vrtacnik-Bokal, S Novakovic, T Rüllicke, P Dovc and H Meden-Vrtovec., Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. *Stem Cells Dev*, 2009; 18:137-149.



10. Kucia M, R Reza, FR Campbell, E Zuba-Surma, M Majka, J Ratajczak, MZ Ratajczak., A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4 ( + ) SSEA-1 (+), Oct-4 + stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 2006; 20:857–869.
11. D. M. Shin, R. Liu, I. Klich et al., Molecular signature of adult bone marrow-purified very small embryonic-like stem cells supports their developmental epiblast/germ line origin. *Leukemia*, 2010; 24:1450–1461.
12. Anderson RA, Fulton N, Cowan G, Coutts S, Saunders PT., Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Dev Biol*, 2007; 7:136.
13. Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U, Lindgren P, Liu Y, Sun Q, Liu K., Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*, 2005; 281:160–170
14. Jeff A. Parrott, Grace Kim and Michael K. Skinner., Expression and action of kit ligand/stem cell factor in normal human and bovine ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Biology Of Reproduction*, 2000; 62:1600-1609
15. Yoshida, H, Takakura, N, Kataoka, H, Kunisada, T, Okamura, H, Nishikawa, S.I., Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev. Biol*, 1997; 184:122–137.
16. Adhikari, D, Liu, K., Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr. Rev*, 2009; 30:438–464.
17. Reddy P, Adhikari D, Zheng W, Liang S, Hamalainen T, Tohonen V, Ogawa W, Noda T, Volarevic S, Huhtaniemi I, Liu K., PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Hum. Mol. Gene*, 2009; 18:2813–2824.
18. Sandra Cecconi, Annunziata Mauro, Valerio Cellini, Felice Patacchiola., The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int. J. Dev. Biol*, 2012; 56:809-817.
19. Uhlenhaut Nh, Treier M., Forkhead transcription factors in ovarian function. *Reproduction*, 2011; 142:489-495.

20. Michael H. Ross, Wojciech Pawlina, Histology A Text And Atlas With Correlated Cell And Molecular Biology, 2011; Sixth Edition.
21. Moore K. L, Persaud T. V. N. (Çeviri Edt.; Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H.)Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi, Nobel Tıp Kitabevi, 2009.
22. Çelik Ö. (Edt.) Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Nobel Tıp Kitabevi, 2011.
23. Moore Keith L, Arthur F. Dalley, Anne M.R. Agur,. Clinically Oriented Anatomy, 2006; Fifth Edition.
24. <http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>
25. Sadler T. W. (Çeviri Edt.; Başaklar A. C.) Langman's Medikal Embriyoloji, 11. baskıdan çeviri. Palme Yayıncılık, 2011.
26. Kierszenbaum A. L. (Çeviri Edt.; Demir R.) Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology. Palme Yayıncılık, 2006.
27. Junqueira L. C, Carneiro J. (Çeviri Ed.; Aytekin Y, Solakoğlu S.) Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, 2005.
28. Waldeyer W: Eierstock und Ei. Leipzig: Engelmann 1870.
29. Bukovsky A, Caudle M.R, Svetlikova M and Upadhyaya N.B., Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2004; 2:20.
30. Weissmann A: *Die Continuitat des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung* Jena: Fischer-Verlag; 1885.
31. Franchi LL, Mandl AM, Zuckerman S: The development of the ovary and the process of oogenesis. In *The Ovary* Edited by: Zuckerman S. London: Academic Press, 1962; 1-88.
32. Baker TG. (Edited by: Balin H, Glasser S. Amsterdam: Excerpta Medica) Oogenesis and ovarian development. In *Reproductive Biology*,1972; 398-437.
33. McLaren A., Signaling for germ cells. *Genes Dev*, 1999; 13:373-376.
34. Kelly SJ., Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool*, 1977; 200:365-376.
35. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A., Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 1990; 110:521-528.

36. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL., Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999; 13:424-436.
37. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La FR, Wood J, Strauss JF III, Boiani M, Scholer HR., Derivation of oocytes from Mouse embryonic stem cells. *Science*, 2003; 300:1251-1256.
38. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ., Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, 2004; 427:148-154.
39. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL., Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 2004; 428:145-150.
40. Duke KL., Ovogenetic activity of the fetal-type in the ovary of the adult slender loris, *Nycticebus coucang*. *Folia Primatol (Basel)* 1967; 7:150-154.
41. Ioannou JM., Oogenesis in adult prosimians. *J Embryol Exp Morphol* 1968; 17:139-145.
42. Butler H, Juma MB., Oogenesis in an adult prosimian. *Nature* 1970; 226:552-553.
43. David GF., Anand Kumar TC, Baker TG., Uptake of tritiated thymidine by primordial germinal cells in the ovaries of the adult slender loris. *J Reprod Fertil* 1974; 41:447-451.
44. Telfer EE., Germline stem cells in the postnatal mammalian ovary: A phenomenon of prosimian primates and mice? *Reprod Biol Endocrinol*, 2004; 2:24.
45. Motta PM, Makabe S., Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three-dimensional microanatomical study by scanning and transmission electron microscopy. *J Submicrosc Cytol*, 1986; 18:271-290.
46. Simkins CS., Development of the human ovary from birth to sexual maturity. *J Anat*, 1932; 51:465-505.
47. Van Blerkom J, Motta PM., The Cellular Basis of Mammalian Reproduction.

*Baltimore-Munich: Urban & Schwarzenberg, 1979.*

48. Motta PM, Van Blerkom J, Makabe S., Changes in the surface morphology of ovarian 'germinal' epithelium during the reproductive cycle and in some pathological conditions. *J Submicrosc Cytol*, 1980; 12:407-425.
49. Makabe S, Iwaki A, Hafez ESE, Motta PM., Physiomorphology of fertile and infertile human ovaries. In *Biology of the Ovary* Edited by: Motta PM, Hafez ESE. The Hague: Martinus Nijhoff Publishers, 1980;279-290.
50. Gillett WR., Artefactual loss of human ovarian surface epithelium: potential clinical significance. *Reprod Fertil Dev*, 1991; 3:93-98.
51. Mossman HW, Duke KL., Some comparative aspects of the mammalian ovary. In *Handbook of Physiology, Sect. 7: Endocrinology* Edited by: Greep RO. Washington: Am. Physiol. Soc, 1973;389-402.
52. Dyck HG, Hamilton TC, Godwin AK, Lynch HT, Maines-Bandiera S, Auersperg N., Autonomy of the epithelial phenotype in human ovarian surface epithelium: changes with neoplastic progression and with a family history of ovarian cancer. *Int J Cancer* , 1996; 69:429-436.
53. Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, Somasiri A, Roskelley CD., E-cadherin induces mesenchymal-to- epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:6249-6254.
54. Bukovsky A., How Can Female Germline Stem Cells Contribute to the Physiological Neo-Oogenesis in Mammals and Why Menopause Occurs? *Microsc. Microanal*, 2011; 17:498-505
55. Bukovsky, A., Human oogenesis and follicular renewal from ovarian somatic stem cells. In *Stem Cell Research Developments*, 2007b; 229-272.
56. Kingery HM., Oogenesis in the white mouse. *J Morphol*, 1917; 30:261-315.
57. Allen E., Ovogenesis during sexual maturity. *Am J Anat*, 1923; 31:439-481.
58. Evans HM, Swezy O., Ovogenesis and the normal follicular cycle in adult mammalia. *Mem Univ Calif*, 1931; 9:119-224.
59. Ingram, D.L., Atresia. In *The Ovary*, Zuckerman, S (Ed.) London: Academic Press, 1962; 247-273.

60. Erickson, B.H., Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*, 1966; 25:800-805.
61. Block, E., Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. Variations at different ages. *Acta Anat (Basel)*1952; 14:108-123.
62. Zuckerman, S., The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res*, 1951; 6:63-109.
63. Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY: Eggs forever? *Differentiation*, 2005; 73:438-446.
64. Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Mayo KE, Shea LD, Woodruff TK., Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol*, 2006; 298:149-154.
65. Faddy M, Gosden R., Let's not ignore the statistics. *Biol Reprod* 2009; 81:231-232.
66. Nicosia SV, Saunders BO, Acevedo-Duncan ME, Setrakian S, Degregorio R., Biopathology of ovarian mesothelium. In:Familiari G, Makabe S, Motta PM (eds) *Ultrastructure of the Ovary*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 1991; 287-310
67. Jacobs I, Bast Jr RC., The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod*, 1989; 4:1-12
68. Kabawat SE, Bast Jr RC, Bhan AK, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB., Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC-125. *Int J Gynecol Pathol*, 1983; 2:275-85
69. Byskov AR, Skakkebaek NE, Stafanger G, PetersH., Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *J Anat* 1977; 123:77-86
70. Stein LE, Anderson CH., A qualitative and quantitative study of rete ovarii development in the fetal rat: correlation with the onset of meiosis and follicle cell appearance. *Anat Rec*, 1979; 193:197-212
71. Yoshinaga K, Hess DL, Hendrickx AG, Zamboni L., The development of the sexually indifferent gonad in the prosimian, *Galago crassicaudatus crassicaudatus*. *Am J Anat*, 1988; 181:89-105

72. Hirshfield AN., Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, 1991; 124:43-101
73. Pan J, Auersperg N., Spatiotemporal changes in cytokeratin expression. I. The neonatal rat ovary. *Biochem Cell Biol*, 1997; 76:27-35
74. Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA., Epithelial mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol*, 2007;213:581-588.
75. Okamoto S, Okamoto A, Nikaido T, Saito M, Takao M, Yanaihara N, Takakura S, Ochiai K, Tanaka T., Mesenchymal to epithelial transition in the human ovarian surface epithelium focusing on inclusion cysts. *Oncol Rep*, 2009; 215:1209-1214.
76. Zhu Y, Nilsson M, Sundfeldt K., Phenotypic plasticity of the ovarian surface epithelium: TGF-beta1 induction of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in vitro. *Endocrinology*, 2010; 151:5497-5505.
77. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R et al., Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 2005; 122:303-315.
78. Oktem O and K Oktay., Current knowledge in the renewal capability of germ cells in the adult ovary. *Birth Defects Res*, 2009; 87:90-95.
79. Tilly JL and EE Telfer., Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock. *Mol Hum Reprod*, 2009; 15:393-398.
80. Massasa E, XS Costa and HS Taylor., Failure of the stem cell niche rather than loss of oocyte stem cells in the aging ovary. *Aging*, 2010; 2:1-2.
81. Bukovsky A, Keenan JA, Caudle MR, Wimalasena J, Upadhyaya NB, Van Meter SE., Immunohistochemical studies of the adult human ovary: possible contribution of immune and epithelial factors to folliculogenesis. *Am J Reprod Immunol*, 1995; 33:323-340.

82. Bukovsky A, Caudle M.R, Svetlikova M, Wimalasena J, Ayala M.E & Dominguez R., Oogenesis in adult mammals, including humans: A review. *Endocrine*, 2005a; 26:301-316.
83. Bukovsky A. & Caudle M.R., Immune physiology of the mammalian ovary: A review. *Am J Reprod Immunol*, 2008; 59:12-26.
84. Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM, Tilly JL., Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol*, 2007; 25:3185-3187.
85. Richer M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J, Boucher RC., Ecto 5'- nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem*, 2003; 278:13468-13479.
86. Ziomek CA, Lepire ML, Torres I., A highly fluorescent simultaneous azo dye technique for demonstration of nonspecific alkaline phosphatase activity. *J Histochem Cytochem*, 1990; 38:437-442.
87. Quinones JA, van Bogaert LJ., Nonspecific alkaline phosphatase activity in normal and diseased human breast. *Acta Histochem*, 1979; 64:106-112.
88. Page-Roberts BA., Changes in nonspecific alkaline phosphatase activity in the rat urinary bladder wall in response to experimental filling. *Invest Urol*, 1972; 9:385-389.
89. Skinner SM, Dunbar BS., Localization of a carbohydrate antigen associated with growing oocytes and ovarian surface epithelium. *J Histochem Cytochem*, 1992; 40:1031-1036.
90. Skinner SM, Lee VH, Kieback DG, Jones LA, Kaplan AL, Dunbar BS., Identification of a meiotically expressed carbohydrate antigen in ovarian carcinoma: I. Immunohistochemical localization. *Anticancer Res*, 1997; 17:901-906.
91. Skinner SM, Kieback DG, Chunn J, Jones LA, Metzger DA, Malinak LR, Dunbar BS., Identification of a meiotically expressed carbohydrate antigen in ovarian carcinoma: II. Association with proteins in tumors and peritoneal fluid. *Anticancer Res*, 1997; 17:907-911.

92. Dunbar BS, Timmons TM, Skinner SM, Prasad SV: Molecular analysis of a carbohydrate antigen involved in the structure and function of zona pellucida glycoproteins. *Biol Reprod*, 2001; 65:951-960.
93. Bowen NJ, Walker LD, Matyunina LV, Logani S, Totten KA, Benigno BB, McDonald JF., Gene expression profiling supports the hypothesis that human ovarian surface epithelia are multipotent and capable of serving as ovarian cancer initiating cells. *BMC Med Genomics*, 2009; 2:71
94. Irma Virant-Klun and Thomas Skutella., Stem cells in aged mammalian ovaries *AGING*, January 2010; 2
95. Nicosia SV, Nicosia RF., Neoplasms of the ovarian mesothelium. In: Azar HA (ed) *Path of Human Neoplasms*. Raven Press, New York, 1988; 435-486
96. Siemens CH, Auersperg N., Serial propagation of human ovarian surface epithelium in tissue culture. *J Cell Physiol*, 1988; 134:347-356
97. Blaustein A, Lee H., Surface cells of the ovary and pelvic peritoneum: a histochemical and ultrastructure comparison. *Gynecol Oncol*, 1979; 8:34-43
98. Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG, Kruk PA., Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab Invest*, 1994; 71:510-518
99. Zhang S, Zhang HS, Cordon-Cardo C, Ragupathi G, Livingston PO Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: protein antigens. *Clin Cancer Res*, 1998; 4:2669-2676
100. Kruk PA, Uitto VJ, Firth JD, Dedhar S, Auersperg N., Reciprocal interactions between human ovarian surface epithelial cells and adjacent extracellular matrix. *Exp Cell Res*, 1994; 215:97-108
101. Cruet S, Salamanca C, Staedel C, Auersperg N., avb3/Vitronectin expression by normal ovarian surface epithelial cells: role in cell adhesion and cell proliferation. *Gynecol Oncol*, 1999; 75:254-260
102. Sundfeldt K, Piontkewitz Y, Ivarsson K, Nilsson O, Hellberg P, Brannstrom M, Janson P-O, Enerback S, Hedin L., E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and the normal ovary. *Int J Cancer*, 1997; 74:275-280



103. Davies BR, Worsley SD, Ponder BA., Expression of Ecadherin, a-catenin and b-catenin in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancers. *Histopathology*, 1998; 32:69-80
104. Midgley CA, White S, Howitt R, Save V, Dunlop M, Hall PA, Lane DP, Wyllie AH, Bubb VJ., APC expression in normal human tissues. *J Pathol*, 1998; 181:426-433
105. Peralta Soler A, Knudsen KA, Jaurand M-C, Johnson KR, Wheelock MJ, Klein-Szanto A, Salazar H., The differential expression of N-cadherin and E-cadherin distinguishes pleural mesotheliomas from lung adenocarcinomas. *Hum Pathol*, 1995; 26:1363-1369
106. Gulati R, Peluso JJ., Opposing actions of hepatocyte growth factor and basic fibroblast growth factor on cell contact, intracellular free calcium levels, and rat ovarian surface epithelial cell viability. *Endocrinology*, 1997; 138:1847-1856
107. Wong AST, Maines-Bandiera SL, Rosen B, Wheelock MJ, Johnson KR, Leung PCK, Roskelley CD, Auersperg N., Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. *Int J Cancer*, 1999; 81:180-188
108. van der Linden PJQ, Goeij de AFPM, Dunselman GAJ, Erkens HWH, Evers JLH., Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril*, 1995; 63:1210-1216
109. MacCalman CD, Farooki R, Blaschuk OW., Estradiol regulates E-cadherin mRNA levels in the surface epithelium of the mouse ovary. *Clin Exp Metastasis*, 1994; 12:276-282
110. Ryan PL, Valentine AF, Bagnell CA., Expression of epithelial cadherin in the developing and adult pig ovary. *Biol Reprod*, 1996; 55: 1091-1097
111. Maines-Bandiera SL, Auersperg N., Increased E-cadherin expression in ovarian surface epithelium: an early step in metaplasia and dysplasia? *Int J Gynecol Pathol*, 1997; 16:250-255
112. MacCalman CD, Farooki R, Blaschuk OW., Estradiol and progesterone regulate E-cadherin mRNA levels in the mouse uterus. *Endocrine*, 1994; 2:485-490

113. Marrs JA, Nelson WJ., Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. *Int Rev Cytol*, 1996; 165:159–175
114. Ong A, Maines-Bandiera SL, Roskelley CD, Auersperg N., An ovarian adenocarcinoma line derived from SV40/E-cadherin transfected normal human ovarian surface epithelium. *Int J Cancer*, 2000; 85:430–437
115. van der Linden PJQ, Goeij de AFPM, Dunselman GAJ, Arends JW, Evers JLH., P-cadherin expression in human endometrium and endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*, 1994; 38:183–185
116. Hoschnetzky H, Aberle H, Kelmes R.,  $\beta$ -catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*, 1994; 127:1375–1380
117. Brady-Kalnay SM, Rimm DL, Tonks NK., Receptor protein tyrosine phosphatase PTPm associated with cadherins and catenins *in vivo*. *J Cell Biol*, 1995; 130:977–986
118. Gillett WR, Mitchell A, Hurst PR., A scanning electron microscopic study of the human ovarian surface epithelium: characterization of two cell types. *Hum Reprod*, 1991; 6:645–650
119. Blaustein A, Kaganowicz A., Wells J 1982 Tumor markers in inclusion cysts of the ovary. *Cancer* 1982; 49:722–726
120. Mittal KR, Goswami S, Demopoulos RI., Immunohistochemical profile of ovarian inclusion cysts in patients with and without ovarian carcinoma. *Histochem J*, 1995; 27:119–122
121. van Niekerk CC, Boerman OC, Ramaekers FCS, Poels LG., Marker profile of different phases in the transition of normal human ovarian epithelium to ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 1991; 138: 455–463
122. Deligdisch L, Einstein A, Guera D, Gil J., Ovarian dysplasia in epithelial inclusion cysts. *Cancer* 1995; 76:1027–1034
123. Scully RE., Early *de novo* ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian lesions. *Int J Gynecol Obstet*, 1995; 49[Suppl]:9–15
124. Scully RE., Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem*, 1995 [Suppl] 23:208–218

125. Osterholzer H, Streibel EJ, Nicosia SV., Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod*, 1985; 33:247–258
126. Bjersing L, Cajander S., Ovulation and the role of the ovarian surface epithelium. *Experientia*, 1975; 15:605–608
127. Ackerman RC, Murdoch WJ., Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Prostaglandins*, 1993; 45:475–485
128. Murdoch WJ., Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol Reprod*, 1995; 53:8–12
129. Quirk SM, Cowan RG, Huber SH., Fas antigen-mediated apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Endocrinology*, 1997; 138: 4558–4566
130. Baldwin RL, Tran H, Karlan BY., Primary ovarian cancer cultures are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Gynecol Oncol*, 1999; 74:265–271
131. Kruk PA, Auersperg N., A line of rat ovarian surface epithelium provides a continuous source of complex extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1994; 30:217–225
132. Kruk PA, Auersperg N., Human ovarian surface epithelial cells are capable of physically restructuring extracellular matrix. *Am J Obstet Gynecol*, 1992; 167:1437-1443
133. Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR., Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005; 3:17.
134. Virant- Klun I, Zech N, Rozman P, Vogler A, Cvjeticanin B, Klemenc P, Malicev E, Meden- Vrtovec H Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*. 2008; 76:843- 856.
135. Kucia M, Wysoczynski M, Ratajczak J, Ratajczak MZ., Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res*, 2008; 331:125- 134
136. Ratajczak MZ, Zuba- Surma EK, Shin DM, Ratajczak J, Kucia M., Very small embryonic- like (VSEL) stem cells in adult organs and their potential role in rejuvenation of tissues and longevity. *Exp Gerontol*, 2008; 43:1009- 101

137. Ratajczak MZ, Kucia M, Ratajczak J, Zuba- Surma EK., A multi- instrumental approach to identify and purify very small embryonic like stem cells (VSELs) from adult tissues. *Micron*, 2009; 40:386- 393
138. Zuba- Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ., "Small stem cells" in adult tissues: very small embryonic- like stem cells stand up! *Cytometry*, 2009; 75:4- 13
139. Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, Boiani M, Schöler HR., Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 2003; 300:1251- 1256
140. Lacham- Kaplan O, Chy H, Trounson A., Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells*, 2006; 24:266- 273
141. Novak I, Lightfoot DA, Wang H, Eriksson A, Mahdy E, Höög C., Mouse embryonic stem cells form follicle- like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells*, 2006; 24:1931- 1936
142. Qing T, Shi Y, Qin H, Ye X, Wei W, Liu H, Ding M, Deng H., Induction of oocyte- like cells from mouse embryonic stem cells by co- culture with ovarian granulosa cells. *Differentiation*, 2007; 75:902- 911
143. Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, Xiang J, Shi L, Yu Q, Zhang Y, Hou R, Wu J., Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol*, 2009; 11:631–636
144. Niikura Y, Niikura T, Tilly JL., Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging*, 2009; 1:971- 978
145. Liu, Y., Wu, C., Lyu, Q., Yang, D., Albertini, D.F., Keefe, D.L. & Liu, L., Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol*, 2007; 306, 112–120.
146. Tres, L.L., XY chromosomal bivalent: Nucleolar attraction. *Mol Reprod Dev*, 2005; 72:1–6

147. Bukovsky, A, Caudle, M.R. & Svetlikova, M., Steroidmediated differentiation of neural/neuronal cells from epithelial ovarian precursors in vitro. *Cell Cycle*, 2008; 22:3577–3583
148. Johnson, J., Stem cell support of ovary function and fertility. In *Stem Cells in Reproductive Medicine: Basic Science & Therapeutic Potential*, Simon, C. & Pellicer, A. Eds 2006; 31–44. London: Informa Healthcare.
149. Romeu, M., Simon, C. & Pellicer, A., Adult stem cells in the human ovary: Hope or fiction? In *Stem Cells in Reproductive Medicine: Basic Science & Therapeutic Potential*, Simon, C. & Pellicer, A. Eds 2006; 45–52. London: Informa Healthcare.
150. M. Z. Ratajczak, M. Kucia, M. Majka, R. Reca, and J. Ratajczak, “Heterogeneous populations of bone marrow stem cells—are we spotting on the same cells from the different angles?” *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2004; 42:139–146
151. M. Z. Ratajczak, E. Zuba-Surma, M. Kucia, A. Poniewierska, M. Suszynska, and J. Ratajczak, “Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues,” *Advances in Medical Sciences*, 2012; 57:1–17
152. Bhartiya D, Unni S, Parte S and Anand S., Very Small Embryonic-Like Stem Cells: Implications in Reproductive Biology *BioMed Research International*, 2013
153. E. K. Zuba-Surma, M. Kucia, W. Wu et al., “Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: imageStream-based morphological analysis and distribution studies,” *Cytometry Part A*, 2008; 73:1116–1127
154. E. K. Zuba-Surma, W. Wu, J. Ratajczak, M. Kucia, and M. Z. Ratajczak, “Very small embryonic-like stem cells in adult tissues-Potential implications for aging,” *Mechanisms of Ageing and Development*, 2009; 130:58–66.
155. D. M. Shin, E. K. Zuba-Surma, W. Wu et al., “Novel epigenetic mechanisms that control pluripotency and quiescence of adult bone marrow-derived Oct4+ very small embryonic-like stem cells,” *Leukemia*, 2009; 23:2042–2051

156. M. Z. Ratajczak, B. Machalinski, W. Wojakowski, J. Ratajczak, and M. Kucia, "A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4+ stem cells in adult bone marrow and other tissues," *Leukemia*, 2007; 21:860–867
157. D. Bhartiya, "Pluripotent very small embryonic-like stem cells get discarded during cord blood and bone marrow processing," *Stem Cells and Development*, 2012; 21:2563–2564
158. D. Bhartiya, A. Shaikh, P. Nagvenkar et al., "Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy," *Stem Cells and Development*, 2012; 21:1–6.
159. Li L and Clevers H., "Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals," *Science*, 2010; 327:542–545
160. M. Z. Ratajczak, D. M. Shin, and M. Kucia., "Very small embryonic/epiblast-like stem cells: a missing link to support the germ line hypothesis of cancer development?" *American Journal of Pathology*, 2009; 174:1985–1992
161. D. Bhartiya, K. Sriraman, and S. Parte., "Stem cell interaction with somatic niche may hold the key to fertility restoration in cancer patients," *Obstetrics and Gynecology International*, 2012
162. D. Bhartiya, S. Kasiviswanathan, and A. Shaikh., "Cellular origin of testis-derived pluripotent stem cells: a case for very small embryonic-like stem cells," *Stem Cells and Development*, 2012; 21:670–674
163. D. Bhartiya, K. Sriraman, and S. Parte., "Stem cell interaction with somatic niche may hold the key to fertility restoration in cancer patients," *Obstetrics and Gynecology International*, 2012
164. D. C.Woods and J. L. Tilly., "The next (re)generation of ovarian biology and fertility in women: is current science tomorrow's practice?" *Fertility and Sterility*, 2012; 98:3–10
165. E. Notarianni., "Reinterpretation of evidence advanced for neoogenesis in mammals, in terms of a finite oocyte reserve," *Journal of Ovarian Research*, 2011; 4.

166. P. P. Szotek, H. L. Chang, K. Brennand., “Normal ovarian surface epithelial label-retaining cells exhibit stem/progenitor cell characteristics,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008; 105:12469–12473
167. A. G. Byskov, P. E. Høyer, C. Yding Andersen, S. G. Kristensen, A. Jespersen, and K. Møllgard., “No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life,” *Human Reproduction*, 2011; 26:2129–2139
168. A. G. Byskov., “Reply: the continued presence of stem cells and oogonia in the adult mammalian ovary *Human Reproduction*, 2012; 27: 938–939
169. D. Bhartiya, S. Kasiviswanathan, S. K. Unni et al., Newer insights into premeiotic development of germ cells in adult human testis using Oct-4 as a stem cell marker,” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2010; 58:1093–1106
170. S. K. Unni, D. N. Modi, S. G. Pathak, J. V. Dhabalia, and D. Bhartiya., “Stage-specific localization and expression of ckit in the adult human testis,” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2009; 57:861–869.
171. H. Zhang, W. Zheng, Y. Shen, D. Adhikari, H. Ueno, and K. Liu., Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012; 109:12580–12585.
172. D. H. Castrillon, B. J. Quade, T. Y. Wang, C. Quigley, and C. P. Crum., “The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000; 97:9585–9590
173. Y. Fujiwara, T. Komiya, H. Kawabata et al., “Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germcell lineage,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994; 91:12258–12262
174. Y. Liu, C. Wu, Q. Lyu et al., “Germline stem cells and neoogenesis in the adult human ovary,” *Developmental Biology*, 2007; 306:112–120

175. M. Pesce and H. R. Schöler., “Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development,” *StemCells*, 2001; 19:271–278
176. J.Kehler, E. Tolkunova, B. Koschorz et al., “Oct4 is required for primordial germ cell survival,” *EMBO Reports*, 2004; 5:1078–1083
177. J. Lee, H. K. Kim, J. Y. Rho, Y. M. Han, and J. Kim., “The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal,” *The Journal of Biological Chemistry*, 2006; 281:33554– 33565
178. Y. Atlasi, S. J. Mowla, S. A. M. Ziaee, P. J. Gokhale, and P.W. Andrews, “OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells,” *StemCells*, 2008; 26:3068–3074
179. S. Liedtke, J. Enczmann, S. Waclawczyk, P. Wernet, and G. Kögler, “Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research,” *Cell Stem Cell*, 2007; 1:364–366
180. S. Liedtke, M. Stephan, and G. Kögler, “Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research,” *Biological Chemistry*, 2008; 389:845–850
181. X. Wang and J. Dai, “Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology,” *Stem Cells*, 2010; 28:885–893
182. R. Kannagi, N.A. Cochran, F. Ishigami, S. Hakomori, P.W. Andrews, B.B. Knowles, D. Solter, Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells, *EMBO J. 2*, 1983; 2355–2361
183. J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, J.M. Jones, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 1998; 1145–1147.
184. Y. Zhao, H. Wang, T. Mazzone, Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics, *Exp. Cell Res*, 2006; 2454–2464.
185. V.L. Battula, P.M. Bareiss, S. Treml, S. Conrad, I. Albert, S. Hojak, H. Abele, B. Schewe, L. Just, T. Skutella, H.J. Bühring, Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell



- surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation, *Differentiation*, 75 2007; 75:279–291.
186. U. Riekstina, I. Cakstina, V. Parfejevs, M. Hoogduijn, G. Jankovskis, I. Muiznieks, R. Muceniece, J. Ancans, Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis, *Stem Cell Rev*, 2009; 5:378–386.
  187. Virant-Klun I, Skutella T, Hren M, Gruden M, Cvjeticanin B, Vogler A and Sinkovec J., Isolation of Small SSEA-4-Positive Putative Stem Cells from the Ovarian Surface Epithelium of Adult Human Ovaries by Two Different Methods *BioMed Research International*, 2013
  188. Forbes A, Lehmann R. Nanos and Pumilio., have critical roles in the development and function of Drosophila germline stem cells. *Development*. 1998; 125:679-90
  189. Tomancak P, Guichet A, Zavorszky P, Ephrussi A., Oocyte polarity dependson regulation of gurken by Vasa. *Development*, 1998; 125:1723–1732.
  190. Stoop H, Honecker F, Cools M, de Krijger R, Bokemeyer C, Looijenga LH., Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical Study. *Hum Reprod*, 2005; 20:1466-76.
  191. Pennetier S, Uzbekova S, Perreau C, Papillier P, Mermillod P, Dalbiès-Tran R., Spatio-Temporal Expression of the Germ Cell Marker Genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in Adult Bovine Tissues, Oocytes, and Preimplantation Embryos *Biol Reprod*, 2004; 71:1359-66
  192. Hashimoto H, Sudo T, Mikami Y, Otani M, Takano M, Tsuda H, Itamochi H, Katabuchi H, Ito M, Nishimura R. Germ cell specific protein VASA is over-expressed in epithelial ovarian cancer and disrupts DNA damage-induced G2 checkpoint *Gynecol Oncol*, 2008; 111:312-9

193. Markku Miettinen, M.D., Maarit Sarlomo-Rikala, M.D., Jerzy Lasota, M.D., KIT Expression in Angiosarcomas and Fetal Endothelial Cells: Lack of Mutations of Exon 11 and Exon 17 of C-kit. 2000; 13:536
194. <http://en.wikipedia.org/wiki/C-kit>.
195. Yashpal NK, Li J, Wang R., Characterization of c-Kit and nestin expression during islet cell development in the prenatal and postnatal rat pancreas. *Dev Dyn*, 2004; 229:813-825.
196. Li J, Quirt J, Do HQ, et al. Expression of c-Kit receptor tyrosine kinase and effect on beta-cell development in the human fetal pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007; 293: E475-483
197. Leong KG, Wang BE, Johnson L, Gao WQ., Generation of a prostate from a single adult stem cell". *Nature* 2008; 456:804–8
198. Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, et al., SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J*, 2001; 15:645-58
199. Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y, et al., Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am J Pathol*. 2004; 165:2099–109.
200. Entrez Gene: KIT v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
201. Gurzu S, Ciortea D, Munteanu T, Kezdi-Zaharia I, Jung I., Mesenchymal-to-Endothelial Transition in Kaposi Sarcoma: A Histogenetic Hypothesis Based on a Case Series and Literature Review *Plos one* 2013
202. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A., Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*, 1987; 6:3341-51
203. Gurzu S, Bara T, Jung I., Inflammatory myofibroblastic tumor in the colon. Case report and hypothesis about its histogenesis. *J Clin Oncol*, 2013
204. Weng YR, Cui Y and Fang JY., Biological Functions of Cytokeratin 18 in Cancer *Mol Cancer Res*, 2012; 10:485-493.

205. Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC and Sacco AG., Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* 1994; 4:361-93
206. Lefievre L, Conner S.J, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis I.A, Monk M, Hughes D.C and Barrat C.L.R., Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the Human. *Human Reproduction*, 2004; 19:1580±1586
207. [http://en.wikipedia.org/wiki/PTEN\\_\(gene\)](http://en.wikipedia.org/wiki/PTEN_(gene))
208. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., et al., PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275:1943–1947
209. Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, et al. (2008) Oocyte specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 319: 611–613.
210. Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D, Reddy P, Idahl A, et al., Oocyte specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. *PLoS One*, 2009; 4
211. Adhikari, D., Gorre, N., Risal, S., Zhao, Z., Zhang, H., Shen, Y., Liu, K., The safe use of a PTEN inhibitor for the activation of dormant mouse primordial follicles and generation of fertilizable eggs. *PLoS One*, 2012; 7
212. Salmena L, Carracedo A and Pandolfi P.P., Tenets of PTEN Tumor Suppression. *Cell* 2008; 133
213. Ozgur Oktem and Bulent Urman., Understanding follicle growth in vivo. *Human Reproduction*, 2010; 25:2944–2954
214. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV., Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.*, 1997; 15:356–362

215. Iqbal Unnisa, Lynn M. Schriml, Michael Dean., I.U Mutational Spectra of PTEN/MMAC1 Gene: a Tumor Suppressor With Lipid Phosphatase Activity. 1999
216. Saal, L.H., Gruvberger-Saal, S.K., Persson, C., Lovgren, K., Jumppanen, M., Staaf, J., Jonsson, G., Pires, M.M., Maurer, M., Holm, K., et al., Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nat. Genet*, 2008; 40:102–107
217. <http://en.wikipedia.org/wiki/PI3K>
218. Giese N., Cell pathway on overdrive prevents cancer response to dietary restriction". *PhysOrg.com* Retrieved 2009.
219. Kalaany NY, Sabatini DM., "Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction". *Nature*, 2009; 458:725–31
220. Okkenhaug K., "Signaling by the Phosphoinositide 3-kinase Family in Immune Cells.". *Annu. Rev. Immunol*, 2003; 17:675–699
221. Leever SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD., "Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage". *Current Opinion in Cell Biology* 1999; 11:219–25
222. Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:444–51.
223. Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, Sellers WR., "Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96 :2110–5
224. Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Feliciano CS, Gartel A, Hay N., "Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage". *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22:7831–41.
225. Chen J, Somanath PR, Razorenova O, Chen WS, Hay N, Bornstein P, Byzova TV., "Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo". *Nat. Med*, 2005; 11: 1188–96.
226. Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV., "Akt1 in endothelial cell and angiogenesis". *Cell Cycle*, 2006; 5:512–8

227. Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dümmler B, Hynx D, Hemmings BA., "Physiological functions of protein kinase B/Akt". *Biochem. Soc. Trans*, 2004; 32:350–4
228. <http://en.wikipedia.org/wiki/AKT>
229. Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC., "Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily". *Genomics*, 1998; 47:187–99
230. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME., "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor". *Cell* 1999; 96:857–68
231. Skurk C, Maatz H, Kim HS, Yang J, Abid MR, Aird WC, Walsh K "The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP". *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:1513–25
232. Ekoff M, Kaufmann T, Engström M, Motoyama N, Villunger A, Jönsson JI, Strasser A, Nilsson G., "The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells". *Blood*, 2007; 110:3209–173
233. Gopinath S. D. , Webb A. E. , Brunet A., Rando T. A., FOXO3 Promotes Quiescence in Adult Muscle Stem Cells during the Process of Self-Renewal. *Stem Cell Reports* ,2014
234. Myatt SS, Lam EW., "The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer". *Nat. Rev. Cancer* 2007; 7:847–59
235. Felici M De., Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Mol Hum Reprod*, 2010 16:632–636.
236. Kirilly D and T Xie. The Drosophila ovary: an active stem cell community. *Cell Res*, 2007; 17:15–25
237. Pearl R and WF Schoppe., Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. *J Exp Zool*, 1921; 34:101–118.

238. Underwood JL, RS Hestand III and BZ Thompson., Gonad regeneration in grass carp following bilateral gonodectomy. *Prog Fish Cult*, 1986; 48:54–56.
239. Draper BW, CM McCallum and CB Moens., Nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. *Dev Biol*, 2007; 305:589–598
240. Ratajczak MZ, EK Zuba-Surma, J Ratajczak, M Wysoczynski and M Kucia. Very small embryonic like (VSEL) stem cells- characterization, developmental origin and biological significance. *Exp Hematol*, 2008; 36:742–751.
241. Bhartiya D, Sriraman K, Parte S, Patel H., Ovarian stem cells: absence of evidence is not evidence of absence. *J Ovarian Res*, 2013; 17:65.
242. Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. & Smith, A., Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998; 95:379–391.
243. Adams IR, McLaren A: Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 2002; 129:1155-1164.
244. Turnpenny L, Spalluto CM, Perrett RM, O'Shea M, Hanley KP, Cameron IT, Wilson DI, Hanley NA., Evaluating human embryonic germ cells: concord and conflict as pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:212-220.
245. Zayed AE, Abd-Elnaeim MM, Abd-Elghaffar SK, Hild A, Brehm R, Steger K., Prenatal development of murine gonads with special reference to germ cell differentiation: a morphological and immunohistochemical study. *Andrologia* 2007; 39:93-100.
247. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG., Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 2000; 24:372-6
248. Lengner CJ, FD Camargo, K Hochedlinger, GG Welstead, S Zaidi, S Gokhale, HR Scholer, A Tomilin and R Jaenisch., Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 2007; 1:403–415.
249. 37. Lengner CJ, GG Welstead and R Jaenisch., The pluripotency

- regulator Oct4. A role in somatic stem cells? *Cell Cycle* 2008; 7:725–728.
250. Gong SP, JH Lee and JM Lim., Derivation of histocompatible stem cells from ovarian tissue. *J Reprod Dev*, 2010 56:481–494.
251. Motta PM, SA Nottola, S Makabe and R Heyn., Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Rep*, 2000; 15:129–147.
252. I. Virant-Klun, T. Skutella, M. Stimpfel, and J. Sinkovec., “Ovarian surface epithelium in patients with severe ovarian infertility: a potential source of cells expressing markers of pluripotent/multipotent stem cells,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011
253. Zuba-Surma EK, Y Guo, H Taher, SK Sanganalmath, G Hunt, RJ Vincent, M Kucia, A Abdel-Latif, XL Tang, MZ Ratajczak, B Dawn and R Bolli., Transplantation of expanded bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells (VSEL-SCs) improves left ventricular function and remodeling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*, 2010
254. Huang Y, M Kucia, LR Hussain, Y Wen, H Xu, J Yan, MZ Ratajczak and ST Ildstad., Bone marrow transplantation temporarily improves pancreatic function in streptozotocin-induced diabetes: potential involvement of very small embryonic-like cells. *Transplantation*, 2010; 89:677–685.
255. Wojakowski W, M Tendera, M Kucia, E Zuba-Surma, E Paczkowska, J Ciosek, M Halasa, M Krol, M Kazmierski, P Buszman, A Ochala, J Ratajczak, B Machalinski and M Ratajczak., Mobilization of bone marrow derived Oct- 4 + SSEA-4 + very small embryonic like stem cells in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1–9.
256. Lasko PF, Ashburner M: The product of the *Drosophila* gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature*, 1988, 335(6191):611-617.
257. Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T: Expression and intracellular localization of mouse Vasa homologue protein during germ cell development. *Mech Dev*, 2000; 93:139-149
- 258 Carrera, P., Johnstone, O., Nakamura, A., Casanova, J., Jackle, H. & Lasko, P., VASA mediates translation through interaction with a *Drosophila* yIF2 homolog *Mol. Cel*, 2000; 5:181–187.

259. Saffman, E. E. & Lasko, P., Germline development in vertebrates and invertebrates *Cell. Mol. Life Sci.* 1999; 55:1141–1163
260. Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, Chris Lau YF, Bokemeyer C, Looijenga LH., Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol*, 2004; 203:849-857.
261. Abban G, Johnson J., Stem cell support of oogenesis in the human. *Hum Reprod.* 2009; 24:2974-8.
262. Stimpfel M, Skutella T, Cvjeticanin B, Meznaric M, Dovc P, Novakovic S, Cerkovnik P, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I., Isolation, characterization and differentiation of cells expressing pluripotent/multipotent markers from adult human ovaries. *Cell Tissue Res.* 2013; 354:593-607
263. Y. A. White, D. C. Woods, Y. Takai, O. Ishihara, H. Seki, and J. L. Tilly., “Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women,” *Nature Medicine*, 2012; 18:413–421
264. Inoue M, Kyo S, Fujita M, Enomoto T, Kondoh G. Coexpression of the *c-kit* receptor and the stem cell factor in gynecological tumors, *Cancer Res* 1994; 54:3049–3053.
265. Fridmacher V, Locquet O, Magre S., Differential expression of acidic cytokeratins 18 and 19 during sexual differentiation of the rat gonad. *Development.* 1992; 115:503-7
266. Paranko J, Kallajoki M, Pelliniemi LJ, Lehto VP, Virtanen I., Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Dev Biol*, 1986; 117:35-44
267. Fröjdman K<sup>1</sup>, Paranko J, Kuopio T, Pelliniemi LJ. Structural proteins in sexual differentiation of embryonic gonads. *Int J Dev Biol.* 1989; 33:99-103.
268. Geiger S, Czernobilsky B, Marshak G, Geiger B., Embryonal rhabdomyosarcoma: immunohistochemical characterization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60:517-23
269. Townson DH, Putnam AN, Sullivan BT, Guo L, Irving-Rodgers HF., Expression and distribution of cytokeratin 8/18 intermediate filaments in bovine antral



- follicles and corpus luteum: an intrinsic mechanism of resistance to apoptosis? *Histol Histopathol.* 2010; 25:889-900
270. L.Lefieve, S.J.Conner, A.Salpekar, O.Olufowobi, P.Ashton, B.Pavlovic, W.Lenton, M.Afnan, I.A.Brewis, M.Monk, D.C.Hughes and C.L.R.Barratt., Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reprod*, 2004; 19:1580-1586.
271. Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N and Gage DA., Heterooligomerization- dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem*, 1998; 273:7488±7494
272. Bukovsky A, Gupta SK, Bansal P, Chakravarty S, Chaudhary M, Svetlikova M, White RS, Copas P, Upadhyaya NB, Van Meter SE, et al., Production of monoclonal antibodies against recombinant human zona pellucida glycoproteins: utility in immunolocalization of respective zona proteins in ovarian follicles. *Journal of Reproductive Immunology.* 2008; 78:102–114
273. Haines BP, Rathjen PD, Hope RM, Whyatt LM, Holland MK, Breed WG., Isolation and characterisation of a cDNA encoding a zona pellucida protein (ZPB) from the marsupial *Trichosurus vulpecula* (brush-tail possum). *Mol Reprod Dev*, 1999; 52:174-82.
274. Martinez ML, Fontenot GK, Harris JD., The expression and localization of zona pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil Suppl* 1996; 50:35–41.
275. Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M & Soferman N., Proteins of human follicular fluid: the blood–follicle barrier. *Fertility and Sterility*, 1973; 24:429–434.
276. Lan ZJ, Xu X, Cooney AJ., Differential oocyte-specific expression of Cre recombinase activity in GDF-9-iCre, Zp3cre, and Msx2Cre transgenic mice. *Biol Reprod* 2004; 71:1469-74.
277. Reddy P, Zheng W, Liu K., Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab*, 2010;21:96-103.

278. Adhikari D, Risal S, Liu K, Shen Y., Pharmacological inhibition of mTORC1 prevents over-activation of the primordial follicle pool in response to elevated PI3K signaling. *PLoS One*, 2013; 8
279. Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, LanZJ, Liu K., Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet*, 2010; 19:397-9.
280. Adhikari, D., Flohr, G., Gorre, N., Shen, Y., Yang, H., Lundin, E., Lan, Z., Gambello, M.J., Liu, K., Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *Mol. Hum. Reprod*, 2009; 15:765–770
281. Andersen CB, Roth RA, Conti M.J., Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Biol Chem*, 1998; 24:18705-8
282. Fan, H.Y., Liu, Z., Cahill, N., Richards, J.S., Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. *Mol. Endocrinol*, 2008; 22:2128–2140.
283. Toyofuku A, Hara T, Taguchi T, Katsura Y, Ohama K and Kudo Y., Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells *in vivo* and *in vitro*. *Human Reproduction*, 2006; 21:1122–1128
284. Dahmoun M, Odmark IS, Risberg B, Karlsson MG, Pavlenko T, Backstrom T. Apoptosis, proliferation, and sex steroid receptors in postmenopausal endometrium before and during HRT. *Maturitas*, 2004;49:114–23.
285. Sivridis E, Giatromanolaki A. Proliferative activity in postmenopausal endometrium: the lurking potential for giving rise to an endometrial adenocarcinoma. *J Clin Pathol*, 2004;57:840–4.
286. Guzeloglu Kayisli O, Kayisli UA, Luleci G, Arici A., In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent. *Biol Reprod*, 2004;71:714–21.
287. Feng, C, Yu, A., Liu, Y., Zhang, J., Zong, Z., Su, W., Zhang, Z., Yu, D., Sun, Q.Y. & Yu, B., Involvement of protein kinase B/AKT in early development of mouse fertilized eggs. *Biol. Reprod*, 2007; 77:560–8.

288. Kim AH<sup>1</sup>, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV., Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*, 2001; 21:893-901
289. Tong Y, Li F, Lu Y, Cao Y, Gao J and Liu J., Rapamycin-sensitive mTORC1 signaling is involved in physiological primordial follicle activation in mouse ovary *Molecular Reproduction and Development* 2013; 80:1018–1034
290. Okumura E., Fukuhara T., Yoshida H., Hanada S., Koyutsumi R., Mori M., Tachibana K. & Kishimoto T., Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nature Cell Biol.* 2002; 4:111–6.
291. Kalous J., Solc P., Baran V., Kubelka M., Schultz R.M. & Motli, J., PKB/Akt is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. *J. Biol. Cell* 2006; 98: 111–23.
292. Riley, J.K., Carayannopoulos, M.O., Wyman, A.H., Chi, M., Ratajczak, C.K. & Moley, K.H., The Akt/PKB pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* 2005; 284:377– 86.
293. Baran V, Fabian D and Rehak P., Akt/PKB plays role of apoptosis relay on entry into first mitosis of mouse embryo *Zygote* 2013; 21:406–416
294. Wang Y, Tian C, Zheng JC., FoxO3a contributes to the reprogramming process and the differentiation of induced pluripotent stem cells *Stem Cells Dev*, 2013; 22:2954-63
295. Warr MR, Binnewies M, Flach J, Reynaud D, Garg T, Malhotra R, Debnath J, Passegué E., FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature*, 2013; 21:323-7
296. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM., The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocr Rev* 2009, 30:624-712
297. Liu K., Stem cell factor (SCF)-Kit mediated phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase signaling during mammalian oocyte growth and early follicular development. *Front Biosci*, 2006; 11:126-135

298. Sui X.X, Luo L.L, Xu J.J, and Fu Y.C., Evidence that FOXO3a is involved in oocyte apoptosis in the neonatal rat ovary. *Biochem Cell Bio.* 2010; 88:621-8

