



**T.C**  
**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VİTRİFİKASYON VE OTOTRANSPLANTASYON SONRASINDA**  
**FARE OVARYUM DOKUSUNUN MORFOLOJİ VE ÜREME**  
**POTANSİYELİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ERKAN GÜMÜŞ**

**DOKTORA TEZİ**  
**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİVAS**

**2014**

**T.C**  
**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VİTRİFİKASYON VE OTOTRANSPLANTASYON SONRASINDA**  
**FARE OVARYUM DOKUSUNUN MORFOLOJİ VE ÜREME**  
**POTANSİYELİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ERKAN GÜMÜŞ**

**DOKTORA TEZİ**

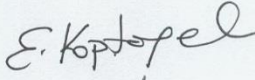


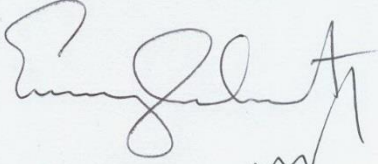
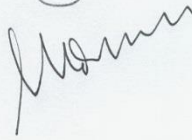
**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. CELAL KALOĞLU**

**SİVAS**

**2014**

Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof.Dr. Emel KOPTAGEL	
Üye	Doç.Dr. Cem KORKMAZ	
Üye	Prof.Dr. Celal KALOĞLU	
Üye	Prof.Dr. H.Eray BULUT	
Üye	Prof.Dr. Muhittin SÖNMEZ	

ONAY

Bu tez çalışması, 27.11.2014 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

---

Prof.Dr. Ali ÇELİKSÖZ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

“Küp içindekini sızdırır”

*Mevlana*

***CANIM AİLEM'E***

## ÖZET

### VİTRİFİKASYON VE OTOTRANSPLANTASYON SONRASINDA FARE OVARYUM DOKUSUNUN MORFOLOJİ VE ÜREME POTANSİYELİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

**Erkan GÜMÜŞ**

**Doktora Tezi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Celal KALOĞLU**

**2014**

İnfertiliteye neden olan çok sayıda faktör mevcuttur. Bunlardan birisi de kanser tedavisidir. Bu hastalarda fertilitiyi korumak için oosit, embriyo ve ovaryum dokusu dondurulması yöntemleri kullanılabilir. Ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonu, pre-pubertal kız, genç kadınlar ve partneri olmayan kadınlar için günümüzde uygulanabilir tek yöntemdir. Ovaryum dokusu, yavaş dondurma (slow freezing) ve hızlı dondurma (vitrifikasyon) yöntemleriyle dondurulmaktadır.

Bu çalışmada, vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan fare ovaryum dokularının bir kısmı, çözüldükten sonra aynı hayvanların böbrek kapsülü altına transplante edildi. Kontrol, dondurulup-çözülmüş ve dondurulup çözüldükten sonra transplante edilen çalışma gruplarında; folliküllerin morfolojileri ve follikülogenezde, proliferasyonda ve anjiyogenezde etkin olan Ephrin B1, PDGF- $\alpha$ , GDF-9, Ve-kaderin ve Pecam-1 genlerinin ve gen ürünlerinin ekspresyonları RT-PCR ve immünohistokimyasal yöntemlerle belirlendi.

Kontrol ve çalışma gruplarında folliküller ışık mikroskobu kullanılarak sayıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Vitrifiye edilen ovaryum dokularında primordiyal ve primer folliküllerin korunduğu ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir farkın olmadığını tespit ettik ( $p>0,05$ ). Dondurulup-çözüldükten sonra transplante edilen ovaryum dokuları, sham grupla karşılaştırıldığında primordiyal ve sekonder folliküllerin daha iyi korunduğu ve anlamlı bir farkın olmadığını tespit ettik ( $p>0,05$ ). Tüm folliküller açısından değerlendirildiğinde, folliküllerin dondurulup-çözüldükten sonra transplante edilen ovaryum dokularında sham grubundan yaklaşık %9 daha az olduğunu tespit ettik. Kontrol ve çalışma grupları arasında ekspresyonları

incelenen genlerin, gen ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan değişiklikler tespit ettik. Bu genlerin ürünlerinin hem kontrol hem de çalışma gruplarında eksprese olduklarını gösterdik.

Sonuç olarak, gerek morfolojik değerlendirmelerle, gerekse PDGF- $\alpha$ , GDF-9, Ephrin B1, Ve-Cadherin ve Pecam-1 genlerinin değerlendirilmesiyle ovaryum dokusunun başarılı şekilde vitrifiye edildiği ve seçilen genler açısından korunduğu tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** Kriyoprezervasyon, vitrifikasyon, ovaryum, ototransplantasyon, Ephrin B1, PDGF-  $\alpha$ , GDF-9, Ve-kaderin, Pecam-1, immünohistokimya, RT-PCR.

**ABSTRACT****EVALUATION OF MORPHOLOGY AND REPRODUCTIVE POTENTIAL  
OF MOUSE OVARY TISSUE AFTER VITRIFICATION AND  
AUTOTRANSPLANTATION****Erkan GÜMÜŞ****PhD Thesis, Department of Histology-Embriyology****Supervisor: Prof. Dr. Celal KALOĞLU****2014**

There are many factors that cause infertility. One of them is the cancer treatment. Oocyte, embryo and ovary tissues cryopreservation techniques can be used for fertility preservation. Cryopreservation of ovarian tissue is the most essential technique for prepubertal girls, young women and women without a partner. Ovarian tissue have been cryopreserved by using slow freezing and vitrification techniques.

In this study, some of the vitrified-warmed mouse ovarian tissues were transplanted under the kidney capsule of the same recipients. The morphology of the follicles and the expression of the gens (Ephrin B1, PDGF- $\alpha$ , GDF-9, Ve-kaderin and Pecam-1) that play key roles in folliculogenesis, proliferation and angiogenesis, were determined by RT-PCR and immunohistochemistry in control, vitrified-warmed and vitrified-warmed grafted tissues groups.

The tissue sections were analyzed by using light microscopy and was considered statistically in control and experiment groups. We determined that primordial and primary follicles have been preserved in vitrified ovarian tissues and was no significant difference between vitrified-warmed and control groups ( $p>0,05$ ). We detected that primordial and secondary follicles have been preserved better in vitrified-warmed ovarian grafts. There was no significant difference between transplanted of fresh (non-vitrified) and vitrified-warmed ovarian tissue grafts ( $p>0,05$ ). In vitrified-warmed ovarian grafts, the follicular content was approximately 9% lower than that of fresh (non-vitrified) grafted ovaries.

The expression levels of examined genes were detected difference between control and experiment groups but there was no significant differences between groups ( $p>0,05$ ). The expression of genes products were showed both control and experiment



groups as well.

In conclusion, evaluation of morphologic and genes expression showed that mouse ovarian tissues were successfully vitrified and it was found that the selected genes were protected.

**Key words:** Cryopreservation, vitrification, ovary, autotransplantation, Ephrin B1, PDGF-  $\alpha$ , GDF-9, Ve-Cadherin, Pecam-1, immunohistochemistry, RT-PCR.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince verdiği destek ve gösterdiği sabırla her zaman önümü açan ve bana iyi bir rehber olan danışman hocam Prof. Dr. Celal KALOĞLU'na destek ve anlayışından dolayı teşekkür ederim.

Asistanlığım ve doktora eğitimim süresince bilgi birikimlerinden yararlandığım ve üzerimde çokça emekleri olan başta Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Emel KOPTAGEL, Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. H. Eray BULUT ve Prof. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN, Anabilim Dalımız asistan ve yüksek lisans öğrencilerine ayrıca katkılarından dolayı Biyoistatistik A.D. öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan, beraber çalışmaktan her zaman mutlu olduğum, benden desteğini esirgemeyen dostlarım Meral YILMAZ, Gonca DÖNMEZ, İsmail SARI ve Ayça TAŞ'a ayrıca Sivasta aile sıcaklığını tekrar yaşamamı sağlayan GÜLSOY ailesi fertlerine destek ve varlıklarından dolayı teşekkür ederim.

Varlık ve hiçlik sınırını sorgulamam konusunda beni yüreklendirerek hayata bakışımı değiştiren, hayret etmektense öğrenilecek ne çok şey olduğunu kendisi yaşayarak bana anlatan, her vazgeçişimde umut olan saygı değer dostum Nihat ÇELİKTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında benim için iyi bir rol model olan, çok çalışmayı, ahlaklı olmayı ve hakka riayet etmeyi öğrendiğim sevgili babam Yaşar GÜMÜŞ'e, yaşantısıyla bana sevgiyi, teslimiyeti ve sabretmeyi öğreten canım annem Sevim GÜMÜŞ'e ve varlıklarıyla bana paylaşmayı, merak etmeyi, koruma ve korunmayı öğreten sevgili kardeşlerim Emine ve Nida GÜMÜŞ'e varlıkları, destekleri ve sevgileri için çok teşekkür ederim. Ayrıca yolculuğum süresince benim ben olmamda doğrudan ya da dolaylı, ismini andığım ya da anmadığım herkese minnettarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kriyobiyojoloji.....	4
2.1.1. Dondurma Sırasında Oluşabilecek Hasarlar.....	4
2.1.2. Doku ve Hücrelerin Donma Sürecinde Hasardan Korunması.....	6
2.1.3. Kriyoprotektan Ajanlar (KPA).....	7
2.1.4. Tampon Çözeltiler ve Makromoleküller.....	8
2.1.4.1. Disakkaridler.....	8
2.1.4.2. Makromoleküller ve Proteinler.....	8
2.1.5. Dondurma.....	9
2.1.5.1. Slow Freezing (Yavaş Dondurma).....	9
2.1.5.2. Vitrifikasyon.....	10
2.1.6. Çözülme ve Kriyoprotektanların Uzaklaştırılması.....	11
2.2. Ovaryum.....	11
2.2.1. Oositlerin Doğum Öncesi Olgunlaşması (Prenatal Maturasyon).....	14
2.2.2. Oositlerin Doğum Sonrası Olgunlaşması (Postnatal Maturasyon).....	15
2.2.3. Follikülogenez.....	15
2.3. Doğurganlığın/Fertilitenin Korunması.....	16
2.3.1. Kanser Tedavisi ve Ovaryum Toksisitesi.....	16
2.4. Fertilitenin Korunmasında Kullanılan Metodlar.....	17
2.4.1. Embriyo Kriyoprezervasyonu.....	18
2.4.2. Oositlerin Kriyoprezervasyonu.....	19
2.4.3. Ovaryum Dokusunun Kriyoprezervasyonu.....	20
2.4.4. Ovaryum Dokusunun Transplantasyonu.....	21
2.5. Follikül Gelişimi ve Anjiyogenez Sürecinde Rol Alan Çalışılan Moleküller.....	23
2.5.1. Ephrin B1.....	23
2.5.2. GDF-9.....	24
2.5.3. PDGF-A.....	25
2.5.4. Trombosit endotelial hücre adezyon molekülü (Pecam-1, CD31).....	27

2.5.5. Vasküler Endotelyal Kaderin (VE-Cadherin-CD5).....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	30
3.1. Kullanılan cihazlar .....	30
3.2. Kullanılan plastik malzemeler .....	30
3.3. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	31
3.4. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar .....	32
3.4.1. Bouin Çözeltisi:.....	32
3.4.2. % 10'luk Tamponlanmış Nötral Formalin (pH=7.0).....	32
3.4.3. Na-Sitrat Tamponu .....	32
3.4.4. Tris EDTA Tamponu .....	33
3.4.5. Peroksidad Bloklama Çözeltisi .....	33
3.4.6. Yıkama Çözeltisi .....	33
3.4.7. Normal Keçi Serumı .....	33
3.5. Ovaryum Dokusunun Elde Edilmesi ve Deney İçin Hazırlanması.....	33
3.5.1. Vitrifikasyon Yöntemi ile Ovaryum Dokusunun Dondurulması .....	35
3.5.2. Vitrifikasyon Yöntemi İçin Çözme İşlemi (Warming).....	35
3.5.3. Ovaryum Dokusunun Ototransplantasyonu .....	36
3.6. Histolojik Değerlendirme.....	36
3.6.1. Hematoksilen ve Eosin (HE) Boyanma Protokolü .....	37
3.7. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan Boyama .....	38
3.7.1. İmmünohistokimya Boyama Protokolü .....	38
3.7.2. İmmünofloresan Boyama Protokolü .....	40
3.8. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Yöntemi .....	41
3.9. Real Time PCR.....	41
3.9.1. Kontrol ve Çalışma Gruplarında RNA İzolasyonu .....	41
3.9.2. cDNA Sentezi.....	42
3.9.3. Eş zamanlı PCR .....	43
3.9.4. Primerler.....	44
3.9.5. RT- PCR Ürünlerinin Özgüllüğünün Belirlenmesi .....	44
3.9.6. Verilerin Analizi .....	45
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	46
5. BULGULAR.....	47
5.1. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR.....	47
5.1.1. Kontrol Grubu (Grup I) Bulguları.....	47
5.1.2. Vitrifikasyon Yöntemiyle Dondurulup-Çözülmüş Çalışma Grubu (Grup II) Bulguları.....	49

5.1.3 Heterotopik Transplantasyon Yöntemi ile Ovaryum Restorasyonunun Işık Mikroskopik Bulguları .....	52
5.1.3.1. Vitriyifiye Edilen Ovaryum Dokularının Heterotopik Transplantasyonu Çalışma Grubu (Grup III) ve Sham Grubu Bulguları.....	52
5. 2. İSTATİSTİKSEL BULGULAR .....	60
5. 3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	65
5.3.1. Kontrol ve Deney Gruplarında Ephrin B1 Bulguları .....	65
5.3.1.1 Kontrol Grubu Ephrin B1 Bulguları .....	65
5.3.1.2. Grup II Ephrin B1 Bulguları .....	68
5.3.1.3. Grup III Ephrin B1 Bulguları .....	71
5.3.2. Kontrol ve Deney Gruplarında PDGF- $\alpha$ Bulguları .....	75
5.3.2.1 Kontrol Grubu PDGF- $\alpha$ Bulguları .....	75
5.3.2.2. Grup II PDGF- $\alpha$ Bulguları .....	78
5.3.2.3. Grup III PDGF- $\alpha$ Bulguları.....	81
5.3.3. Kontrol ve Deney Gruplarında GDF-9 Bulguları .....	85
5.3.3.1. Kontrol Grubunda GDF-9 Bulguları.....	85
5.3.3.2. Grup II GDF-9 Bulguları .....	85
5.3.3.3. Grup III GDF-9 Bulguları .....	85
5.3.4. Kontrol ve Deney Gruplarında Ve-kaderin Bulguları .....	89
5.3.4.1. Kontrol Grubu Ve-kaderin Bulguları .....	89
5.3.4.2. Grup II Ve-kaderin Bulguları .....	89
5.3.4.3. Grup III Ve-kaderin Bulguları .....	89
5.3.5. Kontrol ve Deney Gruplarında Pecam-1 Bulguları.....	92
5.3.5.1. Kontrol Grubu Pecam-1 Bulguları .....	92
5.3.5.2. Grup II Pecam-1 Bulguları.....	92
5.3.5.3. Grup III Pecam-1 Bulguları .....	93
5.4. REAL TIME PCR .....	95
5.4.1. Real Time-PCR sonuçlarının istatistiksel analizi.....	99
6. TARTIŞMA .....	103
7. SONUÇLAR .....	125
8. KAYNAKLAR.....	129
9. ÖZGEÇMİŞ .....	143
EK-1 .....	144
ETİK KURUL KARARI.....	144

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Ovaryumda farklı gelişim evrelerindeki folliküllerin ışık mikroskopik görünümü. ....	14
<b>Şekil 2.2.</b> Ephrin reseptör ve domain yapıları .....	24
<b>Şekil 2.3.</b> TGF- $\beta$ sinyal iletimi ve GDF-9'nin oositler üzerine etkisi. ....	25
<b>Şekil 2.4.</b> PGDF reseptör ve ligandları. ....	26
<b>Şekil 2.5.</b> VE-kaderin aktivasyonu ve diğer moleküllerle olan etkileşimi ....	29
<b>Şekil 5.1.</b> Kontrol grubu ovaryum doku kesitleri.....	48
<b>Şekil 5.2.</b> Grup II ovaryum doku kesitleri. ....	50
<b>Şekil 5.3</b> Grup III ve Sham grubuna ait ovaryum dokularının heterotopik transplantasyonu. ....	54
<b>Şekil 5.4.</b> Grup III' e ait ovaryum doku kesitleri. ....	56
<b>Şekil 5.5.</b> Sham grubuna ait ovaryum doku kesitleri. ....	58
<b>Şekil 5.6.</b> Kontrol grubu ovaryum doku kesitlerinde Ephrin B1 immünolokalizasyonu. ....	66
<b>Şekil 5.7.</b> Grup II ovaryum doku kesitlerinde Ephrin B1 immünolokalizasyonu. ....	69
<b>Şekil 5.8.</b> Grup III ovaryum doku kesitlerinde Ephrin B1 immünolokalizasyonu. ....	72
<b>Şekil 5.9.</b> Kontrol grubu ovaryum doku kesitlerinde PDGF- $\alpha$ immünolokalizasyonu. ....	76
<b>Şekil 5.10.</b> Grup II ovaryum doku kesitlerinde PDGF- $\alpha$ immünolokalizasyonu. ....	79
<b>Şekil 5.11.</b> Grup III ovaryum doku grubu kesitlerinde PDGF- $\alpha$ immünolokalizasyonu. ....	82
<b>Şekil 5.12.</b> Kontrol ve çalışma gruplarında GDF-9 immünolokalizasyonu. ....	86
<b>Şekil 5.13.</b> Kontrol, Grup II ve Grup III' de Ve-kaderin	

immünolokalizasyonu. ....	90
<b>Şekil 5.14.</b> Kontrol, Grup II ve Grup III' de Pecam-1 immünolokalizasyonu.....	94
<b>Şekil 5.15.</b> Ephrin B1 geninin amplifikasyon ve erime eğrisi .....	95
<b>Şekil 5.16.</b> PDGF- $\alpha$ geninin amplifikasyon ve erime eğrisi .....	96
<b>Şekil 5.17.</b> GDF-9 geninin amplifikasyon ve erime eğrisi .....	96
<b>Şekil 5.18.</b> Ve-kaderin geninin amplifikasyon ve erime eğrisi .....	97
<b>Şekil 5.19.</b> Pecam-1 geninin amplifikasyon ve erime eğrisi.....	97
<b>Şekil 5.20.</b> GapDh geninin amplifikasyon ve erime eğrisi .....	98
<b>Şekil 5.21.</b> Ephrin B1, GDF-9 ve Pecam-1 ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.....	99
<b>Şekil 5.22.</b> Ephrin B1, Pdgf- $\alpha$ , GDF-9, Ve-kaderin ve Pecam-1 genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması. ....	102

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Real Time PCR yönteminde kullanılan primerler, üretici firma ve katalog numaraları. ....	44
<b>Çizelge 5.1.</b> Kontrol ve grup II ovaryum dokularında Ki-kare testi sonuçları. ....	61
<b>Çizelge 5.2.</b> Grup I, sham ve grup III'te sayılan canlı folliküllerin istatistiksel olarak karşılaştırılması. ....	63
<b>Çizelge 5.3.</b> Grup I, sham ve grup III'te toplam canlı folliküllerin istatistiksel analizi. ....	64
<b>Çizelge 5.4.</b> Kontrol ve çalışma gruplarında Ephrin B1 ekspresyonları.....	74
<b>Çizelge 5.5.</b> Kontrol ve çalışma gruplarında PDGF- $\alpha$ ekspresyonları. ....	84
<b>Çizelge 5.6.</b> Kontrol ve çalışma gruplarında GDF-9 ekspresyonları. ....	88
<b>Çizelge 5.7.</b> Kontrol ve çalışma gruplarında V $\alpha$ -kaderin ekspresyonları.....	92
<b>Çizelge 5.8.</b> Kontrol ve çalışma gruplarında Pecam-1 ekspresyonları. ....	93
<b>Çizelge 5.9.</b> RT-PCR verilerinin kontrol ve çalışma gruplarında istatistiksel analizi. ....	101



## KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Bovine Serum Albümin
cDNA	Complementary DNA
DMSO	Dimetil Sülfoksid
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EG	Etilen Glikol
FBS	Fetal Bovine Serum
GapDh	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GDF-9	Growth Differentiation Factor-9
IVF	In Vitro Fertilizasyon
KPA	Kriyoprotektan Ajanlar
L	Litre
ml	Mililitre
$\mu$ l	Mikrolitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
PDGF- A	Platelet-Derived Growth Factor Alpha
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha
PDGFRB	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PrOH	1,2 propanediol
PVP	Polivinilpirolidone
SCID	Severe Combined İmmunodeficiency
TBE	Tris Borat EDTA
TGF $\beta$	Transforming Growth Faktör Beta
VE-kaderin-CD5	Vasküler Endotelial Kaderin

## 1. GİRİŞ

İnfertilite, dünya genelinde üreme dönemindeki çiftlerin yaklaşık %15'ini etkileyen önemli bir sağlık problemidir (1). İnfertiliteye neden olan çok sayıda faktör mevcuttur. Bunlardan birisi de kanser tedavisidir. Günümüzde gelişen onkolojik tedavi yöntemlerine bağlı malign kanserli hastalarının yaşam oranlarının giderek arttığı rapor edilmektedir (2, 3). Ancak kemoterapi ve radyoterapi gören kadın ve prepubertel dönemdeki kızlar, bu terapilerin yan etkileri nedeniyle çoğunlukla üreme hücrelerini kaybedecek şekilde ovaryum hasarına maruz kalmaktadırlar. Germ hücreleri kalıcı olarak zarar görmüş bu hastalarda subfertilite (fertilite oranında azalma) veya kısırlık gelişmektedir (4-6). Kanser hastalarının yanısıra, lupus, glomerülonefrit ve miyelodisplasya gibi hastalıkların tedavisinde de benzer sonuçlar yaşanabilmektedir. Bu nedenle birçok klinikte, klinisyenler terapiye başlamadan önce gerekli gördükleri hastaları üreme ve kadın sağlığı kliniklerine yönlendirmektedirler (6, 7).

Ergenlik öncesi dönemde erkek hastalarda, radyoterapi süresince gonadların radyasyon koruma malzemeleri ile korunması (*shielding*) sağlanabilmektedir. Ancak bu yöntem seçilen bölgeyle sınırlı bir koruma sağlamaktadır. Testiküler dokunun kriyoprezervasyonu bazı merkezlerce önerilmekle birlikte bu uygulamanın hala deneysel olduğu gözardı edilmemelidir. Gelecekte bu uygulama, spermatogoninin *in vitro* matürasyonu veya germ hücrelerinin testiküler dokuya transplantasyonu ile infertiliteye alternatif bir tedavi yöntemi olacağı düşünülmektedir. Postpubertal erkekler için, mastürbasyon sonrasında sperm kriyoprezervasyonu günümüzde fertilitenin korunması için oldukça etkili bir yöntemdir. İnsanda sperm dondurma yöntemi ile ilk başarılı gebelik 1953 yılında gerçekleştirilmiştir (6, 8).

Ovaryum doku kriyoprezervasyonu ise 1996 yılından beri uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntem, Turner sendromluları da içeren genç kadınlarda uygulanmaktadır (9, 10). Bu tekniğin kullanımında yaşanan en büyük sorun oositlerin minimum hasarla elde edilmesi ve immatür oositlerin kullanılmasındaki zorluklardır. Dondurulup çözülen dokunun yeniden olog transplantasyonu ile ilk sağlıklı doğum 2004 yılında gerçekleşmiş (11) ve 2004 yılından günümüze kadar ovaryum dokusunun dondurulup yeniden hastalara transplantasyonu yoluyla 26 sağlıklı çocuk doğumu rapor edilmiştir (12). Ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonunun, *in vitro*

fertilizasyon (IVF) için henüz olgun oositleri olmayan pre-pubertal kız, genç kadınlar ve partneri olmayan kadınlar için günümüz koşullarında en uygun yöntem olduğu görülmektedir.

Kullanılacak olan dondurma yönteminin, follüküllerin hayatta kalmasını sağlamanın yanısıra hücrelerin gerek morfolojisinde gerekse ince yapısında minimum düzeyde değişikliğe neden olması önemlidir. Hücreler, dondurma ve ısıtma sırasında gelişen buz kristalleri nedeniyle çeşitli streslere maruz kalırlar. Bu stresler kullanılan kriyoprezervasyon tekniklerine; yavaş dondurma veya vitrifikasyon yöntemlerine bağlı olarak değişebilir (13, 14). Günümüzde yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleriyle sperm ve oositlerin dondurularak saklanması kliniklerde başarı ile uygulanmaktadır. Ancak halen deneysel bir yöntem olan ovaryum dokusunun vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması sağladığı avantajlar nedeniyle henüz yeni ancak gelecek vaat eden bir yöntemdir. Bu nedenle günümüzde ovaryum dokusunun vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir (15, 16).

Bu çalışmada, vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan fare ovaryum dokusunun çözünmesi ardından follüküllerin hayatta kalma oranlarının ve böbrek kapsülü altına transplante edilen doku parçalarında follükülerin sağkalımlarının ve gelişimlerinin ışık mikroskopik gözlemlerle morfolojik olarak belirlenmesi amaçlandı. Kontrol ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan ovaryum dokularında ve dondurulup-çözülmüş ovaryum dokusunun transplante edildiği grupta, follükülogenez ve fertilité için gerekli parakrin bir faktör olan GDF-9 (*Growth Differentiation Factor-9*), hücre çoğalması, göçü, farklılaşması ve anjiogenezde görev alan büyüme faktörlerinden PDGF- $\alpha$  (*Platelet-Derived Growth Factor*), yeni damar ağının kurulumunda ve korpus luteum oluşumu gibi dokunun yeniden modellenmesinde düzenleyici olabileceği düşünülen Ephrin B1, damar bütünselliğinin devam etmesinde ve anjiogenezde görev alan Vc-Kaderin (Vasküler Endotelial Kaderin) ve trombosit agregasyonu ve anjiogenezde görev alan PECAM-1 (Trombosit endotelial Hücre Adezyon Molekülü) ekspresyonlarının immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlandı. Bu çalışmanın son aşamasında; kontrol, vitrifiye edilerek dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularında ve dondurulup-çözülmüş ovaryum dokusunun böbrek kapsülü altına transplantasyonu sonrasında elde edilen ovaryum dokularında yukarıda bahsedilen

moleküllerin ekspresyonlarının RT-PCR yöntemleriyle belirlenmesi amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kriyobioloji

Kriyobioloji, yaşayan organizmalara düşük sıcaklıkların etkisini araştıran ve uygun dondurma yöntemlerini geliştirmeye çalışan bilim dalıdır. Yunanca '*Kryos*' kelimesinden köken alan kriyoprezervasyon soğutma veya dondurma anlamına gelmektedir. Kriyoprezervasyon doku veya hücrelerin sıvı azot içinde (-196 °C) saklanmasıdır. Kriyobioloji bilimi ve IVF (in vitro fertilizasyon) yöntemi geçtiğimiz 50 yıl içinde paralel gelişme göstermiştir. Bu süre boyunca edinilen bilimsel gelişmeler eşliğinde -150 °C'nin altında soğutulan canlı organizmaların biyolojik saatinin durdurulabileceği ve dondurulan hücre ve dokuların çok uzun yıllar saklanabileceği ileri sürülmüştür (17). 1949 yılında gliserolün sperm hücrelerini donma sırasında oluşacak hasarlara karşı koruduğunun farkedilmesinin ardından, geliştirilen tekniklerle birçok alanda özellikle de üreme tıbbında geniş bir kullanım alanı bulmuştur (18). İlerleyen yıllarda gelişen teknoloji ve bilimsel veriler eşliğinde kriyoprezervasyon yönteminin organ nakli operasyonlarında rutinde kullanılması da olasıdır.

Kriyoprezervasyon tekniklerinin, düşük sıcaklıkta hücre ve dokularda oluşturduğu etkiyi anlamak için sıcaklığa bağlı birçok yapı ve sürecin varlığı dikkate alınmalıdır. Bu tezin konusunu oluşturan ovaryum kriyoprezervasyonu için günümüzde iki farklı kriyoprezervasyon yöntemi; slow freezing - yavaş dondurma - ve vitrifikasyon yöntemleri uygulanmaktadır. Her iki yöntemde de düşük sıcaklıklarda metabolik aktiviteyi durdurarak hücreleri süresiz olarak saklamak olasıdır. Bu düşük sıcaklıklarda hücrelerde meydana gelebilecek olası hasarların önüne geçmek için ise her iki yöntemde de kriyoprotektan ajanlar (KPA) kullanılır. Hem yavaş dondurma hemde vitrifikasyon yöntemi, örneklerin kriyoprotektanlara maruz kalması, örneklerin dondurulması/soğutulması (-196°C'de saklanması), çözme/thawing ve kriyoprotektanlardan arındırılması olmak üzere 4 temel basamaktan oluşur (19).

#### 2.1.1. Dondurma Sırasında Oluşabilecek Hasarlar

Kriyoprezervasyon işlemi uygulanan hücreler, hücre içi buz kristallerinin oluşumu ve hücrede oluşan dehidrasyon nedeniyle ekstraselüler tuzların artmasına bağlı olarak

hasara uğrar. Hücre bileşenlerinin temelini oluşturan ve canlı hücrelerin stabilitesi için eşsiz özelliklere sahip olan su, hücre hacminin yaklaşık %60-85'nini oluşturur (20, 21). Donma, suyun buz kristallerine dönmesiyle gerçekleşir. Herhangi bir koruyucu kullanılmadan hücreler sıfırın altında soğutulduğunda hücre oluşun hücre içi buz kristalleri nedeniyle zarar görür. Sıcaklığın düşmesiyle oluşun mikroskobik buz odaklarının yüzeyine su moleküllerinin bağlanmasıyla buz kristalleri giderek büyür (19). Hücre içi su moleküllerinin yanı sıra, biyolojik sistemlerde bağlı su olarak da adlandırılan hidrojen bağlanmış yapılarda bulunmaktadır. Hücre bütünlüğü ve işlevi için gerekli olan membran fosfolipidleri, DNA, RNA gibi moleküller hidrojen bağlanmış yapılardır. Bu nedenle kriyoprezervasyon işlemi sırasında, bağlı suyu uzaklaştırmadan hücre hasarını minimuma indirmek için hücre içindeki suyu uzaklaştırmak gerekmektedir (19).

Ozmotik stres, hücrenin içi ve dışı arasındaki osmotik farklılıktan dolayı hücrelerin şişmesi ya da büzüşmesidir. Osmotik stres arttıkça hücrelerde geri dönüşümsüz değişiklikler oluşur ve ölüme giderler. Sıcaklık 0 °C'nin altına düştüğünde doku içindeki su donar. Kriyoprezervasyon çözeltilerinde kullanılan kriyoprotektif ajanlar dondurma ve çözme sürecinde hücre hasarını engellerler. KPA' lar, bir taraftan osmotik gradient oluşturarak hücreleri dehidre ederken, diğer taraftan ekstraselüler sıvının donma noktasını düşürürler. Böylece sıcaklık, sitoplazmanın donma noktasına ulaşmadan önce hücreler dehidrasyon için yeterli zamana sahip olur (22).

Buz kristallerini önlemenin en iyi yolu yüksek derişimlerde kriyoprotektan çözeltisi kullanmaktır. Ancak yüksek derişimlerdeki kriyoprotektan ajanlar ya osmotik gradientini arttırarak hücrelerin büzüşmesine ya da kimyasal toksisiteye sebep olurlar. Bu durumdan kurtulmak için iki yol izlenebilir. Ya kullanılan toksik kriyoprotektanları azaltmak için çözelti içine hücre zarından geçemeyen kriyoprotektan maddeler yani ekstraselüler bölgede kalan polimerler eklenir ya da hücre ve dokular önceden soğutulmuş derişik çözeltilere kademeli olarak maruz bırakılır (23).

Dondurma süresince hücrelerin hayatta kalmasında etkili olan diğer bir faktör de soğutma ve ısıtma dereceleridir. Sıcaklık derişim oranının, suyun hücre zarı boyunca hareketinde etkili olduğu fark edilince sıcaklığın hücre içi dondurmadaki önemi anlaşıldı. Dondurma ve çözme derecelerini arttırmak, kriyoprotektan çözeltilerin derişimini azaltır ve böylece bu çözeltilerin yarattığı osmotik hasarlar ve toksisite riski

azalır. Sıcaklık değişim oranı, suyun soğutma esnasında hücrelerin dışına veya ısıtma esnasında hücrelerin içine olan hareket hızını etkiler. Optimum soğutma derecesi, suyun önemli oranda hücre dışına çıkışına izin verir. Soğutma çok hızlı yapılırsa, suyun hücre dışına transportu gerçekleşmiyecek ve hücrenin sitoplazması da donacaktır (20, 24).

Doku ve hücreler sıvı azot içine daldırıldığında, sıvı azot ısınır, kaynamaya neden olur ve azot gazı üretilir. Bu esnada buharlaşma olur ve hücreler etrafında buhar zonu oluşur. Sonuç olarak, hücreleri çevreleyen buhar ısı transferini keser, etkili bir yalıtım alanı oluşturur ve böylece azalmış bir soğutma derecesiyle sonuçlanır. Bu durum doku ya da hücreleri çevreleyen çözelti hacminin minimize edilmesi ve sıvı azot buharının önlenmesiyle giderilebilir (23).

Buz kristalleri ısıtma sürecinde yeniden şekillenebilir. Bu durum genelde vitrifikasyon prosedürü ile ilişkilidir (19). Isınma derecesine bağlı olarak, bu küçük buz kristallerinin davranışı farklıdır. Yavaş ısıtma süresince (*slow warming*), buz kristalleri yeniden kristalize olur ve birlikte büyür fakat hızlı ısıtma süresince (*rapid warming*) yeniden kristalize olmak için yeterli zaman yoktur ve buz hızlıca çözünür (25).

### **2.1.2. Doku ve Hücrelerin Donma Sürecinde Hasardan Korunması**

Kriyobiyoloji alanındaki gelişmeler gerek hücreler gerekse daha kompleks yapıların dondurularak saklanması olası hale getirmiştir. Eğer dondurulacak biyolojik yapıların özellikleri biliniyorsa bu hücreleri canlı kalacak şekilde dondurmak için metotlar da geliştirilebilir.

Ancak çeşitli hücre tipleri ve moleküllerin biraraya gelmesi ile oluşan biyolojik sistemlerde hücre ve bazal membran arasındaki normal ilişkinin devam ettirilmesi ve ekstraselüler yapıların hasardan korunması önemlidir (26). Ekstraselüler buz kalıntıları doku yapısına ve hücre-bazal membran arasındaki ilişkiye ciddi hasar verebilir (26). Dolayısıyla dondurma sırasında oluşan hasarın miktarı buzun şekillediği alanla da yakın ilişkilidir (27). Ayrıca kompleks biyolojik sistemlerde hayati görev üstlenen damarların korunması da çok önemlidir. Çünkü, büzüşen damarlar organ ve dokular için ölümcüldür. Bu nedenlerden dolayı, hassas bölgelerde donmayı engellemek veya en azından buz kristallerinin varlığını azaltmak bu problemlerin giderilmesini

sağlayabilir (26).

### 2.1.3. Kriyoprotektan Ajanlar (KPA)

Dondurma-çözme sürecinde hücre içinde buz kristallerinin oluşumu, hücrelerin zarar görmesi ve ölümleriyle sonuçlanır. İyi bir dondurma yöntemi, hücre içinde bulunan suyun donma işlemi öncesinde hücrenin hayatta kalacak şekilde mümkün olduğunca uzaklaştırılmasını amaçlar. Aşırı miktarda suyun uzaklaştırılması, hücre bileşenlerinde özellikle de hücre membranında oluşturacakları etkilerden dolayı hücre hasarına ve olasılıkla ölüme sebep olur. Bu nedenle ozmos ve difüzyon süreçlerinin her ikisi de hücre ve/veya doku dondurma yöntemlerinde oldukça önemlidir (28). Genel anlamda kriyoprotektanlar, hücre içi dehidrasyonunda kullanılan bileşenlerdir. Bu maddeler, dondurma süresince donmanın vereceği hasardan doku ve/veya hücreleri korumak amacıyla çözültüye eklenen ajanlardır. KPA'lar, sistemdeki tüm çözünen maddelerin toplam derişimini arttırarak buz kristallerinin oluşumunu azaltır. Kriyoprotektanlar ya hücre içine girerek su moleküllerini hücre dışına çıkarırlar (hücre içine nüfuz eden/permeabl kriyoprotektanlar) ya da hücre içine giremeyecek kadar büyük olup ozmoz gradienti oluşturarak suyun hücre dışına çıkarılmasını sağlarlar (hücre içine nüfuz etmeyen/non-permeabl kriyoprotektanlar). Çalışmalarda genellikle her iki tip kriyoprotektan ajan birlikte kullanılır (23). Hücre içine nüfuz eden kriyoprotektanlar, toksisitesi az, suda iyi çözünen, küçük ve iyonik olmayan moleküllerdir. Dimetil sülfoksid (dimethyl sulphoxide-DMSO), 1,2 propanediol (PrOH) ve etilen glikol (ethylene glycol-EG) en yaygın kullanılan hücre içine nüfuz eden kriyoprotektanlardır. Yüksek derişimlerde kullanıldıklarında toksiktirler ve ozmotik şoka neden olurlar. Hücre içine nüfuz eden kriyoprotektanlar donma noktasını düşürerek hücre içindeki bağlı su moleküllerinin yerini alır (19). Hücre içine nüfuz etmeyen kriyoprotektanlar ise hücre içine girmeyen ve böylece su moleküllerinin hücrenin dışına doğru hareket etmesini sağlayacak ozmotik gradient oluşturan ajanlardır. Ayrıca membran fosfolipidleri üzerine etki ederek hücre membranını stabilize ederler (19). Disakkaridler (sukroz, glukoz, fruktoz, sorbitol, sakkaroz), makromoleküller (polivinilpirolidone-PVP, polivinil alkol, fikor) ve proteinler (bovine serum albumin; BSA) en yaygın kullanılan, hücre içine nüfuz etmeyen kriyoprotektanlardır (23).



#### **2.1.4. Tampon Çözeltiler ve Makromoleküller**

Dondurma için hazırlanan çözeltiler, hücrelerin donma ve çözünme süresince karşılaşacakları etkilere karşı koruyucu birtakım maddeler içerirler. Kriyoprezervasyon çözeltileri genellikle fizyolojik çözeltilere sitrat ve yumurta sarısı (egg yolk) içeren bazı bileşiklerin uygun miktarları eklenerek yapılır ve çözelti gamet veya embriyo kültür ortamına benzer. Çözeltinin pH'sı ise fosfat tamponlar ya da HEPES kullanılarak sağlanır (23).

##### **2.1.4.1. Disakkaritler**

Vitrifikasyon yöntemi için hazırlanan çözeltilere eklenen disakkaritler (sukroz, glukoz, fruktoz, sorbitol, sakkaroz, trehaloz veya rafinoz) çözeltinin genel özelliklerini etkilerler (34). Büyük moleküler ağırlıklara sahip olan disakkaritler, hücre zarından geçemez ve dolayısıyla gerekli kriyoprotektan miktarını azaltarak dolaylı yoldan toksisiteyi azaltır. Hücre ve dokuların disakkarit eklenmiş dondurma çözeltilerinde inkübasyonu, hücrelerden ozmoz yoluyla daha fazla su çekilmesine yardım eder ve böylece hücrelerin kriyoprotektanların toksik etkilerine maruz kalma zamanı azalır (23).

Hücre içine nüfuz edemeyen sukroz aynı zamanda ozmotik şoku azaltacak ozmotik tampon görevi de görür (23, 29).

##### **2.1.4.2. Makromoleküller ve Proteinler**

Makromoleküller (polivinilpirolidone (PVP), polivinil alkol, ficol) ve proteinler (bovine serum albumin; BSA) yüksek moleküler ağırlığa sahip maddelerdir. Dondurma için gerekli kriyoprotektan ajanların miktarını önemli ölçüde azaltırlar. Aynı zamanda çözeltinin yoğunluğuna -vizkozitesine- etki ederek kriyoprotektanların daha düşük derişimlerde kullanımını, dolayısıyla toksisitelerini azaltılmış olurlar. Aynı zamanda bu moleküller hücre ve dokuları bir kapsül gibi sararak vizkoz yapıda bir matriks oluşturup soğuma ve ısınma süresince kristalizasyonu önlerler (23, 30, 31).

### 2.1.5. Dondurma

Günümüzde genel anlamda kullanılan iki farklı kriyoprezervasyon yöntemi vardır; kontrollü yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri. Her iki prosedürde de, doku ve hücrelerin kriyoprotektan ajanlara maruz bırakılması, dondurulması, sıvı azot içinde (-196 °C) depolanması, örneklerin çözdürülmesi ve kriyoprotektan ajanların uzaklaştırılması işlemleri sırasıyla gerçekleştirilmektedir. Dondurma ve çözdürme (*freezing* ve *thawing*) terimleri yavaş dondurma yöntemleri için kullanılırken, soğutma ve ısıtma (*cooling* ve *warming*) daha çok vitrifikasyon yöntemleri için kullanılmaktadır (19).

#### 2.1.5.1. Slow Freezing (Yavaş Dondurma)

Yavaş dondurma yöntemi 1970'lerden günümüze gelişen ve dünya genelinde insan ve hayvan örneklerinin dondurulmasında yararlanılan bir yöntemdir. Yavaş dondurma yöntemiyle dondurulmuş insan embriyolarından ilk canlı doğum 1984'de gerçekleştirilmiştir (8). Dondurma süresince hücreler, hacimleri ve membran geçirgenliklerinde meydana gelen değişiklikler ve özellikle oluşan buz kristalleri nedeniyle ölüme sonuçlanabilecek ağır fizyolojik strese maruz kalırlar. Kriyoprotektan içeren çözeltilere maruz bırakılan hücre ve dokularda, hücre içi buz kristali oluşumu ozmoz ile engellenir. Ancak yüksek derişimlerde kullanılan kriyoprotektanlar osmozun fazla olmasına dolayısıyla hücre içi tuz ve bileşiklerin derişimindeki artışına ve sitotoksisiteye neden olurlar. Bu nedenle hücreler optimum su kaybı için öngörülen süre boyunca kriyoprotektanlara maruz bırakılmalıdır. Ancak sitotoksisiteye maruz kalmaması için yüksek derişimden etkilenmeyecek şekilde hızlı soğutulmalıdır. Soğutma hızı, hücrelerin büyüklüğüne, hücre zarına ve difüzyon geçirgenliğine bağlı olarak farklılık göstermektedir.

Vitrifikasyon yöntemiyle karşılaştırıldığında, yavaş dondurma yönteminde daha düşük derişimlerde (1.5 mol/L) ve daha yüksek hacimde (0,3-1.0 ml) kriyoprotektan kullanılır (8). Bu yöntemde, hücre ve dokular ozmotik denge için önce hücre içine girebilen kriyoprotektan maddenin artan derişimlerinde bekletilirler. Bu süre, kullanılan kriyoprotektiv maddenin özelliğine bağlı olarak değişir. Hücre ve dokular programlanabilir kontrollü yavaş dondurma makinesine yerleştirilip genelde -30°C ile -80°C'ler arasındaki bir ısıya ulaşıncaya kadar kademeli olarak soğutulur. Bu

kademeli soğuma hücre ve doku özelliklerine göre değişir. Örneğin insan oosit ve embriyolarında  $0.3-1^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ , sperm hücrelerinde  $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ , kırmızı kan hücrelerinde ise  $>1000^{\circ}\text{C}/\text{dk}$  şeklinde değişiklik göstermektedir. Hücreler istenilen ısı derecesine ulaştıktan sonra, sıvı azot ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) içine alınarak dondurulur (19).

### **2.1.5.2. Vitrifikasyon**

Vitrifikasyon hem intrasellüler hem de ekstrasellüler buz kristalleri şekillenmeden hücre ve dokuların düşük sıcaklıklarda dondurulması yöntemidir. İlk kez 1985 yılında fare embriyolarında başarıyla uygulanan (32) bu yöntem, bu tarihten itibaren yavaş dondurma yöntemine ciddi bir alternatif yaratmıştır. Hücre ve dokuların kriyoprotektanlarda dengelenmesinin ardından hemen sıvı azota daldırıldığı basit, hızlı, düşük maliyetli ve ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir.

Bu yöntem, dondurma sırasında katı buz kristalleri yerine camsı (vitröz) bir madde oluşumuna neden olur. Başarılı vitrifikasyon için yüksek derişimde (3-5 mol/L) kriyoprotektanlara ve dokunun direkt olarak sıvı nitrojene daldırılmasıyla oluşacak yüksek soğutma derecesine ihtiyaç vardır (8, 23). Kriyoprotektan maddelerin yüksek derişimlerde kullanımı sonucu ozmotik ve kimyasal toksisite gelişebilir. Yüksek derişimdeki kriyoprotektanların toksik etkileri; dengeleme zamanı azaltılarak, iki veya daha fazla kriyoprotektan kullanılarak hazırlanmış vitrifikasyon çözeltileri ile aşamalı dengeleme yaparak (33, 34) ve vitrifikasyon çözeltilerinde hücre zarından geçemeyen kriyoprotektanlar kullanılarak en aza indirilebilir. Hücre içine giremeyen kriyoprotektanlar, vitrifikasyon çözeltilisinin akışkanlığını etkiler ve toksisiteyi azaltan vitröz oluşumunu teşvik eder (33). Ficoll, antifriz proteinler, polietilen glikol (PEG) ve polivinilprolidon (PVP) gibi hücre içine girmeyen yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin vitrifikasyon çözeltilisine eklenmesi toksisiteyi azaltmasının yanı sıra çözeltilinin vitrifikasyon başarısını arttırdığı bildirilmiştir (19, 35).

Bugün birçok klinikte oosit ve blastosist vitrifikasyonu başarılı şekilde uygulanmaktadır. Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuş insan blastosistlerden ilk canlı doğum 2001 yılında rapor edilmiştir (36). Ancak ovaryum dokusunun kompleks ve yoğun olması nedeniyle vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması daha zordur.

### 2.1.6. Çözülme ve Kriyoprotektanların Uzaklaştırılması

Hem yavaş dondurma hem de vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan dokuların çözülmesi ve kriyoprotektanlardan uzaklaştırılması aşaması, kullanılan yöntemin başarısı üzerinde oldukça etkilidir. Hücre ve dokular yavaş dondurma protokolünün uygulanması sırasında mutlaka az da olsa su içerirler ve çözülme sırasında bu durum göz önünde tutulmalıdır (22). Donma esnasında oluşan küçük kristaller çözülme süresince birleşme eğilimindedirler ve bu birleşme hücrelere zarar verir. Yapılan çalışmalarda, uygun soğutma derecelerinde soğutulan doku ve hücrelerin hızlı çözülme ile en yüksek oranda canlı kaldıkları bildirilmiştir (23, 37).

Çözme işlemi, sıvı azottan çıkartılan doku ve hücrelerin önceden 37 °C'de ısıtılmış su banyosu içinde ortalama 1 dk yani eriyinceye kadar bekletilmesi ile başlar. Sonrasında donma sırasında hücre içine giren kriyoprotektanların oluşturacakları toksik etki ve ozmotik şoku gidermek için bu maddelerin hızla hücre ve dokulardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Çözme işlemi için hazırlanan çözeltilere sükröz, glukoz, fruktoz, sorbitol, sakkaroz, trehaloz, rafinoz gibi hücre içine giremeyen şekerler eklenmektedir (23). Bu disakkaritler yoğunluk farkı oluşturarak kriyoprotektanların hücre dışına çıkışını sağlar. Genellikle çözme işlemi doku ve hücrelerin 1M, 0,5M, 0,25M, 0,125M ve 0M'lık disakkaritli çözeltilerde 5'er dk. bekletilmeleriyle gerçekleştirilir.

## 2.2. Ovaryum

İnsan ovaryumu, 3-5 cm uzunluğunda, 1,5-3 cm genişliğinde ve 0,5-1,5 cm kalınlığında badem şekilli bir organdır. Tek katlı yassı epitelden kısa kübik epitele kadar değişkenlik gösteren epitel tabakası altında tunika albuginea olarak bilinen ince yoğun bir bağ dokusu ile çevrilidir. Bu tabakanın hemen altında uzanan stroma içi şekilli hücreler ve kan damarlarıyla desteklenen ekstraselüler matriksten oluşmaktadır. Ovaryumda korteks ve medulla olarak adlandırılan kesin sınırlarla birbirinden ayrılamayan tabakalanma izlenir. Korteks oldukça yoğun bağ dokusu içerir. Organın stromasında, primordiyal follüküller (testisteki seminifer tübüllerin homologu) ve interstisyel bezler (testisteki Leydig hücrelerinin homologu) bulunur. Kortikal tabakanın altında ise kan ve lenf damarları, sinirleri ve interstisyel hücreleri içeren gevşek bağ dokusundan zengin medulla bulunur (38, 39).

Ovaryumlar dişide, gametlerin üretilmesi, depolanması ve folliküllerin matürasyonunun gerçekleştiği yer olmasının yanı sıra sekonder seks karakterlerinin ortaya çıkmasından sorumlu hormon üretiminde de görev alırlar. Ovaryum, follikül olarak adlandırılan somatik teka ve granülosa hücrelerince çevrelenmiş çok sayıda oosit içerir. Fötal yaşamda ovaryum geliştikten sonra dişi germ hücreleri oogonia olarak adlandırılırlar ve mitozla çoğalarak her ovaryumda yaklaşık 500 bin primordiyal follikül içinde diktiat faza girerler. Primordiyal folliküller ovaryumda fibröz doku yani stroma içinde gömülü durumdadır. Bir kadında üreme dönemi boyunca sadece 400-500 follikül ovule olurken geri kalan folliküller gelişimin çeşitli dönemlerinde dejenere olur (40, 41). Ovaryumda yaklaşık %88 oranında primordiyal folliküller, %8 oranında primer folliküller ve %4 oranında ise sekonder folliküller bulunur (42). Ovaryum folliküllerinin gelişim safhaları oositi çevreleyen granülosa hücrelerinin sayı ve şekliyle sınıflandırılmaktadır. Primordiyal folliküller, histolojik olarak yaklaşık 25-30 µm çapında küçük bir primer oositi çevreleyen tek katlı yassı veya kolumnar dizilmiş granülosa hücreleri ve ince bir bazal laminadan oluşur. Bazal lamina gerek oositin gerekse oositi çevreleyen granülosa hücrelerinin diğer hücrelerle doğrudan temasını engeller (40, 43).

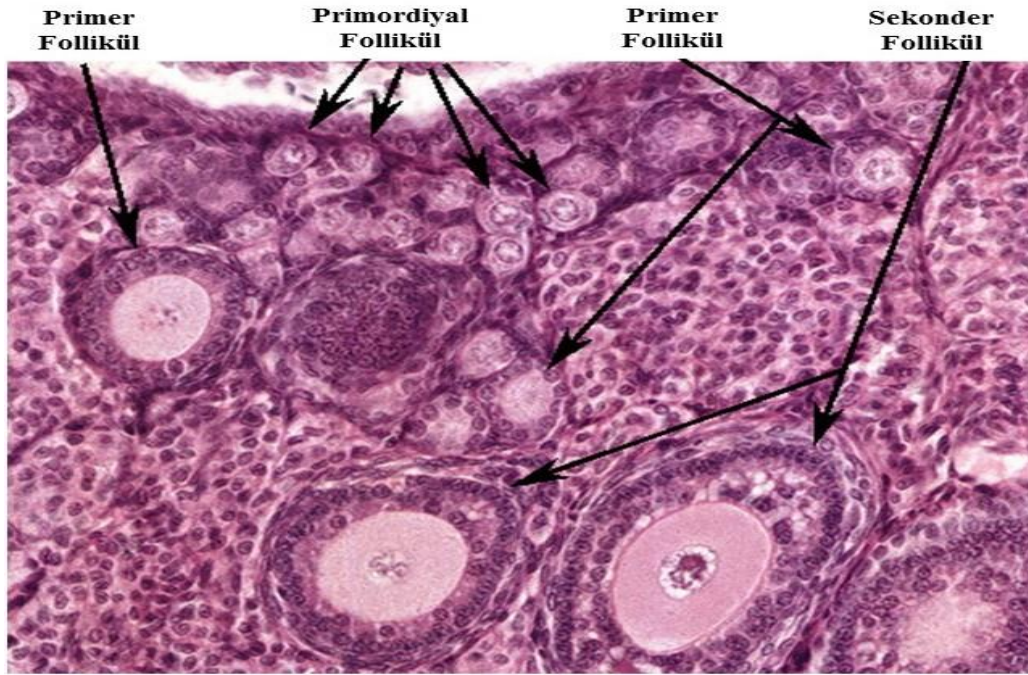
Primer follikül büyür, 30-60 µm çapına ulaşır ve etrafındaki tek katlı yassı follikül epiteli tek katlı kübik granülosa hücreleriyle çevrilir. Granülosa hücrelerinin mitotik aktivite kazanması ve şekillerinin yassıdan kübik epitele dönüşmesi o follikülün seçildiğini gösterir. Bunu gen aktivasyonu ve oositin gelişimi takip eder. Yapılan çalışmalarda oosit mRNA'larının translasyonu ile oluşan bazı proteinlerin (ZP1, ZP2, ZP3, BMP-15, GDF-9) insanda preantral follikül gelişimini uyardığı gösterilmiştir (44, 45). Hayvanlarda ise kit ligand, kemik morfogenetik protein (BMP-7), yüksek FSH ve Mülleriyan inhibe edici madde (MIS) primordiyal folliküllerin seçilmesi sürecini negatif veya pozitif yönde kontrol ettiği bilinmektedir (43).

Sekonder follikül, zona pellucida ile çevrelenmiş bir oosit, yaklaşık 9 katlı granülosa hücre tabakası, bazal lamina, teka eksterna, teka interna ve teka içerisinde konumlanan damarlarla karakterizedir ve follikül çapı yaklaşık 100-200 µm'ye ulaşmıştır (39, 43).

Gelişimin ilerleyen dönemlerinde, interstisyel hücrelerden köken alan teka interna ve düz kas hücrelerinin değişmesiyle teka eksterna tabakası şekillenir. Teka

interna hücreleri lüteinleştirici hormon (LH) için reseptörler eksprese ederek androstenedion üretimine katkıda bulunurlar ve granülosa hücrelerine östrojen üretimi için uyarıcı olurlar (46). Teka eksterna tabakası ise follikülü dıştan saran bol miktarda kollajen içeren ve temel olarak destekleyici fonksiyon üstlenen tabakadır (46).

Granülosa hücreleri büyümeye devam eder, çoğalır ve çevrelerinde sıvı salgılamaya başlarlar. İçi sıvı ile dolu, antrum olarak adlandırılan bir boşluk şekillendiği bu aşamada folliküller tersiyer veya antral olarak adlandırılırlar ve çapları yaklaşık 500 µm'ye ulaşır. Bu aşamada follikülde iki tip granülosa hücresi vardır. Follikülü çevreleyen ince bir tabaka mural granülosa hücreleri ve oositi çevreleyen kumulus hücreleri. Graaf follikül gelişimi ve büyümesi boyutlarına göre dört evreye ayrılır. Küçük Graaf follikülü 1-6 mm çapına sahipken, orta Graaf follikülü 7-11 mm, büyük Graaf follikülü 12-17 mm ve preovulatar Graaf follikülü 18-23 mm çapa sahiptir. Atreziye uğrayacak folliküller küçük ve orta (1-10 mm) evredeki Graaf folliküllerinden seçilir (43). Gerek hiyaluronik asitce zengin folliküler sıvı birikimi nedeniyle ve gerekse hücre çoğalması nedeniyle dominant follikül aşırı derecede büyür (47). Preovulatar oositte mayoz yeniden aktive olur. Follikülün LH ile uyarılmasının ardından birkaç saat içinde nükleer membranla çevrili diktiat kromozomlar mayozu kaldıkları yerden devam ederler. Bu aşamaya germinal vezikül bozulumu adı verilir ve kromozomlar profazı tamamlayarak I. mayotik iğipliklerinde düzenlenirler (39).



**Şekil 2.1.** Ovaryumda farklı gelişim evrelerindeki follüküllerin ışık mikroskopik görünümü (48).

İlkel dişi germ hücrelerinin gelişip olgunlaşması yani oogenez, doğum öncesi ve doğum sonrası olarak ikiye ayrılabilir (39, 47).

### **2.2.1. Oositlerin Doğum Öncesi Olgunlaşması (Prenatal Maturasyon)**

Dişi germ hücreleri, primordiyal germ hücrelerinden şekillenirler. Primordiyal germ hücreleri, embriyonik gelişimin 21. gününde vitellus kesesinin kaudal duvarındaki endormal kökenli hücrelerden gelişir. Primordiyal germ hücreleri gebeliğin beşinci haftasının başında sonbağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal çıkıntılar içine doğru göç ederler. Beşinci haftanın sonunda gonodal çıkıntılar bu hücrelerce tamamen istila edilirler (49). Mitozla sayıları artan ve somatik hücre kordonlarınca çevrelenen primordiyal germ hücreleri oogoniumlara farklılaşırlar. Primordiyal oositler gelişimin 11-12. haftalarında birinci mayotik bölünmenin profazında arest olurlar ve primer oositlere değişirler. Bu aşamada ortada primer oosit, çevrede tek sıra follükül epitel hücreleri ile çevrelenmiş primordiyal follüküller şekillenir (50, 51).

Dişi fetüslerde gebeliğin 16-20. haftalarında yaklaşık 7 milyonu bulan germ hücreleri

bu aydan sonra gerilemeye başlar. Gebeliğin yaklaşık 32. haftasında oogoniumların neredeyse tamamı apoptoz ile dejenere olur (42).

### **2.2.2. Oositlerin Doğum Sonrası Olgunlaşması (Postnatal Maturasyon)**

Doğuma yakın tüm primer oositler I. mayoz bölünmenin profaz evresini bitirip, mayozun dinlenme 'diktat' evresine girerler. Primer oositler, pubertede, ovulasyondan kısa bir süre önce I. mayoz bölünmeyi tamamlarlar.

Doğumda follikül sayısı 700.000 ila 2.000.000 arasında değişir. Puberteye erişildiğinde bir genç kızda her iki ovaryumda follikül sayısı toplam 300-400 binlere kadar düşer (47, 52). Erkeklerde sperm üretimi devam eden bir süreçken, post natal dönemde oositler yenilenebilir değildir (53). Doğum sonrası memelilerin ovaryumunda oosit ve follikül oluşumunu destekleyen proliferatif germ hücrelerinin varlığı iddia edilmiş olsa da sonuçlar ikna edici bulunmamış ve ovaryum stromasında kök hücrelerden oosit kültürü gerçekleştirilememiştir (53).

Pübertenin başlamasıyla beraber hipotalamus, hipofiz bezi ve overler tarafından salgılanan hormonların etkileşimiyle ovaryum döngüsü başlar. Adet döngüsü olarak da adlandırılan bu döngü folliküler (proliferatif) faz ve luteal (sekretuar) faz olarak ikiye ayrılır. İnsanda ortalama menstrual döngü süresi 28 gündür ve genellikle 25 ila 30 gün arasında farklılık gösterebilir. Folliküler faz süresince görülen değişiklikler tüm döngü süresince değişiklikler yaratır ve folliküler faz genellikle 10-16 gün içerisinde sonuçlanır. Luteal faz ise sabittir ve 14 gün sürer (43, 47).

### **2.2.3. Follikülogenez**

Follikülogenez, primordiyal germ hücrelerinden şekillenen folliküllerin gelişim sürecidir. Puberte ile birlikte dinlenme döneminde olan primordiyal folliküller aktive olarak primer, sekonder ve antral folliküler safhaları ve nihayet oosit matürasyonu ve ovulasyonla sonuçlanan döngülerini tamamlarlar. Gelişen folliküller ovaryum korteksi içinde lokalize olmuştur ve her aşama kritik birçok moleküler etkileşimi içerir. Ovaryum korteksinde gerçekleşen follikülogenez 4 temel olay içerir. Bu olaylar; gelişecek folliküllerin seçilimi, preantral follikül büyümesi, dominant follikülün belirlenmesi ve preovulatar follikülün matürasyonudur (54).



Puberte ile birlikte, menstrüasyonun 1. ve 4. günleri arasında bazı primordiyal follüküller gonadotropinlerin etkisi altında gelişim için uyarılırlar. Döngünün 5. ve 7. günleri arasında, gelişim için seçilen follüküllerden birinin ovule olabilmesi için seçilmesi gerçekleşir. Diğer follüküller atreziye uğrarlar. Lutein hormon (LH)'nun pik yapmasına yanıt olarak, bir dominant follükülden döllenmeye hazır bir olgun oosit ovule olur (40, 43).

### **2.3. Doğurganlığın/Fertilitenin Korunması**

Son yıllarda klinikte her geçen gün gelişen tekniklere bağlı olarak birçok kanser tipinde hastaların hayatta kalma yüzdesi artmıştır. Kanser hastalarına uygulanan bu hayat kurtaran tedaviler birçok kadında erken menapoz veya infertiliteye yol açar. Amerikada 2010 yılında tahmini 1,5 milyon kadın ve erkeğe kanser tanısı konulmuş ve bunların yaklaşık %10'unun 45 yaşından daha genç olduğu rapor edilmiştir. Bu hastalar için kanser tedavisi hayat kurtarıcı olabilmekte ancak tedavi, üreme kapasitelerini de kalıcı olarak etkileyebilmektedir (55). Tedavinin bu yan etkileri özellikle ileriki yıllarda çocuk sahibi olmak isteyen genç hastaları etkilemekte ve erişkin dönemlerinde psikolojik ve toplumsal sorunlara neden olmaktadır.

Kanserin yanı sıra, Turner, Fragile X sendromu gibi genetik hastalıklar (56), tekrarlı seyreden ovaryum kistleri, ovaryum kıvrımları/torsiyonu (57) ve endokrin bozukluklar, FSH reseptör mutasyonu (58) fertilite problemlerine sebep olabilmektedir. Bu nedenle klinikte bu tip hastaların doğurganlıklarının korunması için çeşitli yaklaşımlar denenmektedir.

#### **2.3.1. Kanser Tedavisi ve Ovaryum Toksisitesi**

Malign hastalığı olan kadınlar ve genç kızlar için kemoterapi ve radyoterapi kombinasyonları içeren tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinin ardından kardiyak ve pulmoner bozuklukların oluşma olasılığının yanısıra, yaşam kalitesini etkileyen bir diğer önemli etki ovaryumlardaki follüküler birikiminin yok olmasıdır. Gonadotoksik olan bu ilaçlar temel olarak hücrenin bölünmesini engelleyip DNA'yı inhibe ederek hücrelere ciddi hasarlar vermektedir. Bu durum ovaryumun steroid salgısının yok olmasına, follükül ve oositlerin geri dönüşümsüz bir biçimde hasara uğramasına, menarş yokluğuna, erken over

yetmezliğine (premature ovarian failure) ve kısırlığa sebep olur (59).

Genç kızlar ovaryumlarında çok daha fazla sayıda folliküle sahip olmaları nedeniyle yaşlı kadınlara nazaran kemoterapiden daha az etkilenirler. Gonadotoksik olan bu ilaçların kullanımı sonrasında kalıcı kısırlık veya doğurganlığın tehlikeye girmesi, kanser tipine, tedavinin süresine, hastanın yaşına, malignansi tipine ve ilaç dozuna bağlı olarak değişir (60). Kemoterapide kullanılan ilaçların folliküllerin granülosa hücrelerini etkilediği, primordiyal folliküllerin bazal membranlarında kalınlaşmaya neden olduğu, apoptozu indükleyerek primordiyal follikül sayısını azalttığı (61), ovaryum kan damarlarında hasara sebep olduğu ve ovaryum korteksinde fibrozise yol açtığı rapor edilmiştir (60). Ovaryum içinde folliküller aynı zamanda farklı gelişim safhaları içinde olduklarından bazı folliküllerin kemoterapinin toksik etkisinden daha fazla zarar görmeleri olasılık dahilindedir. Ancak kemoterapi ile tedavi sonrasında primordiyal folliküllerin sayısında azalma olduğu insanda (61, 62), farelerde (63) ve ratlarda (64) çeşitli araştırma gruplarınca rapor edilmiştir.

Radyoterapi yöntemi hücre döngüsünü kesintiye uğratarak ciddi hücre hasarlarına neden olur. Hastanın yaşı, radyasyona maruz kalan alanın boyutu ve radyasyon dozuna bağlı olarak hasarın boyutu değişir. Birçok malignansi tipinde yüksek doz radyasyon kullanılmaktadır (62). Ancak oositlerin radyasyona oldukça duyarlı oldukları ve çok minimal dozlarda bile kullanıldığında (2-4 Gy) follikül rezervinin büyük bir kısmının yok olduğu bilinmektedir (65). Bu nedenle radyasyon uygulanacak bölge pelvik bölgeyi de içinde bulunduruyorsa ovaryumun hasar görmemesi zor bir ihtimal olarak değerlendirilmektedir.

#### **2.4. Fertilitenin Korunmasında Kullanılan Metodlar**

Kriyoprezervasyon teknikleri yardımcı üreme yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Sperm hücrelerinin düşük sıcaklıklarda soğutulduktan sonra canlı kalabileceğinin rapor edilmesinin ardından, 1949 yılında ilk kez spermatozoa'nın başarılı şekilde dondurulduğu bildirilmiştir. Dondurulup çözülmüş sperm hücrelerinin inseminasyonu sonrasında canlı doğumun rapor edilmesinin ardından klinikteki uygulamaları hızla gelişmiş ve 1970'li yıllardan beri rutinde başarıyla uygulanan bir yöntem olarak günümüze kadar gelmiştir (66, 67). Erkek hastalarda kemoterapi ile tedavi sonrasında yapılan semen analiz bulgularına göre bu hastaların %12-46 oranında azospermi

gelişeceği ileri sürülmektedir (68). Kanser hastası erkeklerde fertilitenin korunması spermatozoa ve testis dokusunun kriyoprezervasyonu ile gerçekleştirilir. Özellikle testis dokusunun kriyoprezervasyonu pre-pubertal erkek hastalar için uygulanabilen tek yöntemdir (66).

Dişi doğurganlığının korunmasında, başarı oranı yüksek ve birçok klinikte rutinde kullanılan yöntem embriyo kriyoprezervasyonudur. Bu yöntemin dışında, oosit kriyoprezervasyonu, ovaryum doku bankası -ki bu dokudan elde edilen folliküllerin *in vitro* kültürü veya ovaryum dokusunun ototransplantasyonu- gibi yöntemler hala deneysel olsa da umut verici yöntemlerdir (69). Bu yöntemler dışında kanser hastası kadınlarda tedavi esnasında, ovaryumların laparotomik, laparoskopik veya robotik cerrahi yoluyla radyasyon alanından uzaklaştırılması esasına dayanan ovaryum transpozisyonu yöntemi mevcuttur. Genelde en basit ve efektif metod ovaryumların laparoskopik olarak lateral transpozisyonudur (59). Cerrahi olmayan bir diğer yöntem ise, hipofiz üzerine etki eden ve gonadotropin sekresyonunu, dolayısıyla ovaryumları baskılayan GnRH analoglarının kullanılması esasına dayanan yöntemdir. Baskılanmış ovaryumlar varsayımsal olarak sitotoksik uygulamalara daha az hassastır. Ancak sonuçlar ve tekrarlanabilirliği hala çelişkilidir (59).

#### **2.4.1. Embriyo Kriyoprezervasyonu**

Embriyo kriyoprezervasyonu, dondurulmuş embriyo transferi sonrasında ilk canlı doğum gerçekleştiği (70) 1984 yılından günümüze klinik uygulamada gerçekleşen gelişmeler eşliğinde rutinde sıkça başvuru olan bir yöntem olmuştur. Dondurulmuş embriyoların çözünme sonrası hayatta kalma oranlarının %35-90, dondurulmuş-çözülmüş embriyo başına canlı doğum oranının ise %27,7 olduğu bildirilmiştir (59). Dondurulmuş embriyo transferi sonrası doğan çocuklar ile normal yollarla gerçekleşen gebelik sonrası doğan çocuklar arasında doğum defekti riski açısından bir farklılık olmadığı bildirilmiştir (71).

Embriyo kriyoprezervasyonu yöntemi kadın kanser hastaları için tedavi öncesi uygulanabilecek en uygun yöntemdir. Embriyo dondurma yöntemi, olgun oosit elde edebilmek için ovaryumun uyarılmasını gerektirmektedir. Toplanan oositler, hastanın eşinden veya donörden elde edilecek spermle *in vitro* fertilize edilmesi sonrasında embriyoların çeşitli safhalarda dondurulması esasına dayanmaktadır. Ancak,

ovaryumun uyarımı için iki-üç hafta gibi bir süre gerekmektedir. Lösemi, lenfoma ve sarkoma gibi oldukça agresif seyreden malignansi tiplerinde kanser tedavisi hemen başlaması gerektiğinden embriyo kriyoprezervasyonu tercih edilen bir yöntem olmaktan çıkmaktadır (72). Ovaryumun uyarımı prosedürü aynı zamanda serumdaki östrojen konsantrasyonunda artışa sebep olarak ovaryum hipersitimülasyon sendromuna neden olabilir. Bu nedenle ovaryum stimülasyon prosedürü, göğüs ve endometrial kanser tipleri gibi hormon duyarlı tümörlere sahip kadın kanser hastaları için uygun bir yöntem değildir. Ayrıca, birçok kanser hastasının over stimülasyon oranları oldukça düşüktür ve döngü sırasında toplanan oositler düşük kalitededir. Stimülasyon sonrası toplanan oosit miktarı yaşa bağlı olarak da değişkenlik gösterir (73).

Sonuç olarak, embriyo kriyoprezervasyonu, IVF prosedürü için sperm gerektirdiğinden pre-pubertel veya ergenlik dönemindeki kız çocukları ile etik, kanuni veya dini sebepler nedeniyle sperm donasyonunu reddeden bekar kadınlar için uygun bir yöntem değildir (59).

#### **2.4.2. Oositlerin Kriyoprezervasyonu**

Oosit kriyoprezervasyonu, etik, kanuni veya dini sebepler nedeniyle sperm donasyonunu kullanmak istemeyen kadın hastalar için alternatif bir yöntemdir. Bu yöntem, GnRH antagonisti uygulanarak ovaryumun hiperstimülasyon döngüsü sonrası veya doğal döngü sonrası elde edilen olgun oositlerin dondurulması esasına dayanır (74). Dondurulmuş oosit başına düşen canlı doğum oranının %2 civarında olduğu ve dondurulmuş embriyolarla karşılaştırıldığında bu oranın düşük olduğu hatta herhangi bir işleme tabi tutulmamış yeni toplanan oositlerle karşılaştırıldığında ise doğum oranının çok daha düşük olduğu rapor edilmiştir (59). Olgun oositlerin kriyoprezervasyonu embriyo kriyoprezervasyonundan çok daha zordur. Olgun oositlerin büyüklükleri, fazla su ve lipid içeriği ve sahip oldukları hassas iç iplikcikleri nedeni ile kriyoprezervasyon sırasında meydana gelebilecek hasarlara daha duyarlıdır (75). Buna rağmen, kriyobiyolojideki ilerlemelere bağlı olarak başarı oranı giderek artmaktadır. Oosit dondurma işleminde hem yavaş dondurma hem de günümüzde giderek artan oranda vitrifikasyon yöntemleri uygulanmaktadır. Ancak bu iki yöntem karşılaştırıldığında vitrifikasyon yönteminde oositlerin hayatta kalma

oranının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (59).

Oosit kriyoprezervasyonu, yalnız kadınlar, oositlerin toplandığı anda sperme sahip olmayan çiftler ve adet gören genç kızlar için uygulanabilir bir yöntemdir. Olgunlaşmamış oositlerin *in vitro* matürasyonu sonrası dondurulması da bu tip hastalar için koruyucu bir yöntem olarak kullanılabilir. Ovaryum stimülasyonu sonrası, stimüle edilmemiş ovaryumlardan ve ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonu metodu için alınan biyopsi örneklerinden olgunlaşmamış oositler elde edilebilir. Böylece kanser tedavisinin gecikmesinin ve yüksek hormonal seviyeye maruz kalmanın önüne geçilebilir. Olgunlaşmamış oositlerin dondurulması, düşük hücre hacimleri ve metefaz I iplikciklerinin henüz oluşmaması nedeniyle dondurma sırasında oluşabilecek hasarlar için daha korunaklı görünse de çözünme sonrası matürasyonu ve hayatta kalma oranı çok düşük olduğundan tercih edilmemektedir (2).

### 2.4.3. Ovaryum Dokusunun Kriyoprezervasyonu

Ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonu ve ototransplantasyonu kanser hastası kadınların üreme potansiyellerinin korunmasında yararlanılabilecek bir diğer yöntemdir. Sperm gerekliliğinin olmaması ve ovaryum stimülasyonuna ihtiyaç duyulmaması nedeniyle, pre-pubertel kız çocuklarının, agresif seyreden malignansi nedeniyle acil kemoterapiye ihtiyacı olan ve hormon duyarlı tümörleri olan kadın kanser hastaları için olası tek seçenektir. Bugüne kadar dondurulmuş çözülmüş ovaryum dokusunun transplantasyonu neticesinde 26 canlı doğum gerçekleşmiştir ve her geçen gün farklı kliniklerden yeni canlı doğumlar rapor edilmektedir (12, 76).

Ovaryum dokusu kanser tedavisinin başlangıcından hemen önce veya hemen sonra laparoskopisi veya laparotomi yoluyla alınır. Ovaryum dokusu genelde %50 oranında alınır. Ancak yüksek doz kemoterapi alması planlanan hastalarda veya radyasyonun olası etkilerinin ovaryuma fazla zarar vereceği düşünülen vakalarda ovaryumun tamamı/tek taraflı overektomi ile alınabilir. Bu değişken oran, kanser tedavisi sonrasında tahmin edilen ovaryum folliküllerinin hasarına bağlı olarak değişmektedir (59).

İnsan ovaryum korteksi folliküllerin çok büyük kısmını içerir. Primordiyal folliküller ovaryumdaki folliküllerin yaklaşık %70-90 gibi çok büyük bir kısmını oluşturur. Dolayısıyla ovaryum kortikal parçalarının dondurulması yoluyla yüzlerce

primordiyal follikül korunmuş olur. Primordiyal folliküller, küçük boyutları, kortikal granülleri ve zona pellusidanın olmaması ve düşük metabolik aktiviteleri nedeniyle dondurma-çözme sırasında oluşabilecek hasarlardan çok daha iyi korunurlar (9, 22).

#### **2.4.4. Ovaryum Dokusunun Transplantasyonu**

Dondurulmuş ovaryum dokusu, çözülme ardından ya *in vitro* kültürü ya da transplantasyonu yapılarak kullanılabilir. Ovaryum dokusu vasküler ve vasküler olmayan yollardan transplante edilmektedir. Farelerde vasküler transplantasyon, ovaryum damarlarının küçük olması nedeniyle oldukça zordur. Vasküler olmayan ovaryum dokusu transplantasyonu yaklaşık 50 yıl önce ilk kez farelerde gerçekleştirilmiştir (77).

Ksenotransplantasyon, ovaryum dokusunun bir türden başka bir türe transplantasyonudur. Bu yöntem, ovaryum dokusundaki dondurup çözüldükten sonra folliküllerin gelişim potansiyelleri ve hayatta kalma oranlarını belirlemek için mükemmel bir yöntemdir. Ancak, ksenotransplantasyon klinik çalışmalarda hayvan patojenlerin olası bulaşma riski nedeniyle tercih edilen bir yöntem değildir (78).

Ototransplantasyon ise ovaryum dokusunun aynı canlıya transplantasyonudur. Over dokusunun transplantasyonu ya ortotopik ya da heterotopik olarak yapılır. Heterotopik transplantasyon, dokunun aynı vücutta bir yerden başka bir yere transplante edilmesidir. Fare deneylerinde heterotopik transplantasyon alanları böbrek kapsülü altı ve kas içine yapılmaktadır (29, 79). Ortotopik transplantasyon ise dokunun orjinal bölgesine transplante edilmesidir. Ortotopik transplantasyon, folliküllerin ve oositlerin gelişimi için daha uygun bir fizyolojik ortam sağlar. Aynı zamanda doğal gebelik olasılığının bulunması nedeniyle de daha başarılı sonuçlar vermekte ve klinikte daha çok tercih edilmektedir (80). Ortotopik veya heterotopik transplantasyon sonrasında ovaryumun endokrin fonksiyonlarını yeniden kazandığı birçok çalışmada gösterilmiş olmasına rağmen, folliküler gelişim ve oositin fertilizasyonu sanıldığı kadar kolay olmamaktadır.

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan ve işlem görmemiş ovaryum dokularının gerek ortotopik gerekse heterotopik transplantasyonları sonrasında fonksiyonel açıdan karşılaştırılmaları yapılmıştır. Bu tekniklerle dondurulan ovaryum dokusunun

dondurma ve çözürme süresince %7, transplantasyon sonrasında damar gelişimi süresince ise, oosit miktarının %65 oranında azaldığı deney modellerde bildirilmiştir (81). Ortotopik transplantasyonu yapılan dondurulmuş ve işlem uygulanmamış fare ovaryumlarının fonksiyonel açıdan karşılaştırıldığı bir çalışmada, östrus döngülerinin işlem yapılmamış grupta %80 oranında yeniden kazanıldığı, dondurulmuş grupta ise bu oranın %75 olduğu görülmüştür (81). Liu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, yeni doğmuş farelerden alınan ovaryum dokuları yavaş dondurma yöntemiyle dondurulmuş ve bilateral overektomize edilmiş alıcı farelerin böbrek kapsülü altına transplante edilmiştir. Dondurulup çözülme ardından transplante edilen ovaryum doku parçalarıyla işlem görmeden transplante edilen doku parçaları yaşayan folliküller açısından karşılaştırılmış ve sonuçta folliküler kaybın dondurulmuş doku parçalarında yaklaşık %9 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmadan yola çıkılarak folliküler kaybın dondurma protokolünden ziyade iskemiye bağlı olarak geliştiği düşünülmüştür (82).

Başka bir çalışmada ise vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan fare ovaryum doku parçalarının ortotopik transplantasyonu ile folliküllerin hayatta kaldığı rapor edilmiş ve hem dondurulmuş hem de işlem görmemiş ovaryum dokularından canlı doğum elde edilmiştir (83).

İnsanda kriyoprezerve edilmiş ovaryum dokusunun ototransplantasyonu ile fertilitenin ve ovaryum fonksiyonunun yeniden kazanıldığı gösterilmiştir.

2004 yılında primatlarda yapılan bir çalışmada, ortotopik transplantasyonu yapılan işlem görmemiş ovaryum dokusundan canlı doğum gerçekleşmiştir. Aynı yılda Donnez ve ekibi, dondurulmuş insan ovaryum dokusunun ortotopik transplantasyonu yoluyla ilk canlı doğumu rapor etmişlerdir (11). İnsanlarda ovaryum dokusunun dondurulması ve sonrasında transplantasyonu kanser tedavisi görecektir kadınlarda, evli olmayan genç kadınlarda ve prepubertal kız çocuklarında uygulanabilecek, halen deneysel bir yöntemdir. Başarılı raporlara rağmen, dondurulmuş ovaryum dokusunun ototransplantasyonu yoluyla metastatik hücrelerin hastaya yeniden bulaşması riski vardır (59). Bu nedenle, dokunun transplantasyonu öncesinde kanser hücrelerini içerip içermediğinin, dolayısıyla ovaryum metastaz riskinin minimuma indirilmesi hasta güvenliği açısından zorunluluktur.

Bugünkü teknoloji ve bilgiler doğrultusunda, ovaryum dokusunun

kriyoprezervasyonu ve sonrasında saklanması fertilitenin korunmasında oldukça etkili bir yöntem olmasına rağmen dondurulmuş ovaryum dokusunun ototransplantasyonu konusunda hassas davranılmalıdır. Çünkü, transplante edilecek parçalarda hastalık kalıntılarını güvenilir biçimde ve eksiksiz tespit edecek yöntemler henüz geliştirememiştir.

## **2.5. Follikül Gelişimi ve Anjiyogenez Sürecinde Rol Alan Çalışılan Moleküller**

### **2.5.1. Ephrin B1**

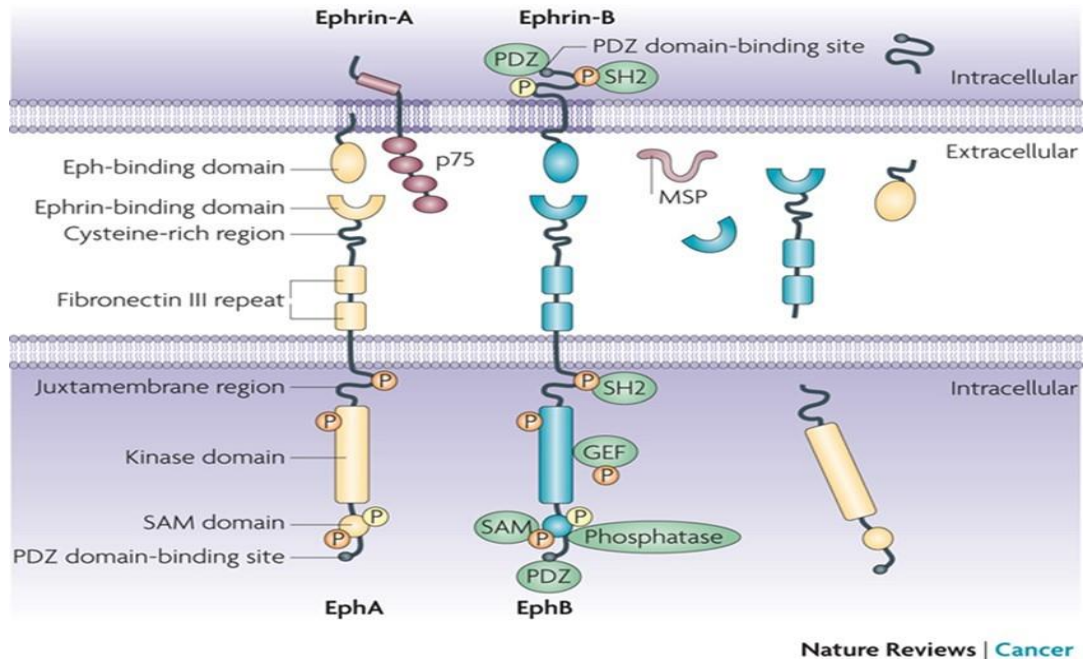
Ephrinler, reseptör tirozin kinazların en büyük ailesini oluşturan Eph reseptörlerinin ligandlarıdır. Ephrinler ve reseptörleri, reseptör ligand çiftleri halinde membran bağlı proteinlerdir. Memelilerde 8 ephrin ve bunların reseptörleri saptanmıştır (84). Ephrinler hücre membranına bağlanma özelliklerine göre iki alt gruba ayrılırlar. Beş ephrin tipi, membrana glikosil - fosfatidil inositol zinciri ile bağlıdır ve topluca Ephrin A grubu (eph A1–A5) olarak adlandırılırlar. Diğer üç ephrin grubuysa transmembrandır, hücre içi domainleri mevcuttur ve Ephrin B grubu (ephrin B1–B3) olarak adlandırılırlar (Şekil 2.2). Ephrin reseptörleri ise ephrinlerin A ve B alt gruplarına bağlanma özelliklerine göre iki alt gruba ayrılırlar (Eph A1-A8 ve Eph B1-B6) (84). Ephrinler ve reseptörlerinin sinyal mekanizmaları karışıktır. Genelde birkaç örnek dışında bir ligand birden fazla reseptöre bağlanır ve bir reseptör de aynı alt gruplardaki birden fazla liganda bağlanır. Bu nedenle reseptör ligand ilişkisinin spesifikliği bu moleküllerin hücre içindeki lokalizasyonu ile doğrudan ilişkilidir (85).

Ephrin-ephrin reseptörleri arasındaki ilişki, integrin fonksiyonları veya hücre iskeletinin modifikasyonu yoluyla hücreler arasında itici bir güç yaratmasıyla düzenlenir. Böylece iki hücre topluluğu arasındaki sınırın şekillenmesinde veya hücrelerin belirli hedeflere taşınımında düzenleyici görevleri vardır (86). Embriyonik gelişim sürecinde, aksonal yönlendirmenin kontrolü, doku morfogenezinde boyutsal sınırların düzenlenmesi, nöral krista hücre göçü ve segmentasyon (84) gibi olaylarda görev almasının yanısıra hem embriyonik dönemde hem de olgun dönemde neovaskülarizasyonda görev aldığı bilinmektedir (87, 88).

B tipi ephrin-ephrin reseptör sistemi integrin aracılı hücre göçü ve arteriyo venöz anastomozun indüklenmesinde de görev üstlenir. Ephrin B1 ligandlarının embriyonik gelişim sürecinde arteriyel ve venöz damarların endotelial hücrelerinde



eksprese edildikleri ve anjiyogenetik aktivasyonları *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (87, 88). Ayrıca insanlarda yapılan bir çalışmada ephrin B1 ligandının, granüloza hücrelerindeki ekspresyonlarının LH'nin pik yaptığı dönemde veya ovulasyon sonrasında hızla arttığı gözlenmiştir. Damar gelişimi süresince vasküler endotelial hücreler arasındaki iletişimin B tipi Ephrin-ephrin reseptör ilişkisi yoluyla kurulduğu dikkate alındığında, Ephrin-ephrin reseptör sisteminin yeni damar ağının kurulumunda ve korpus luteum oluşumu gibi dokunun yeniden modellenmesinde önemli bir düzenleyici olabileceği düşünülmektedir (86).



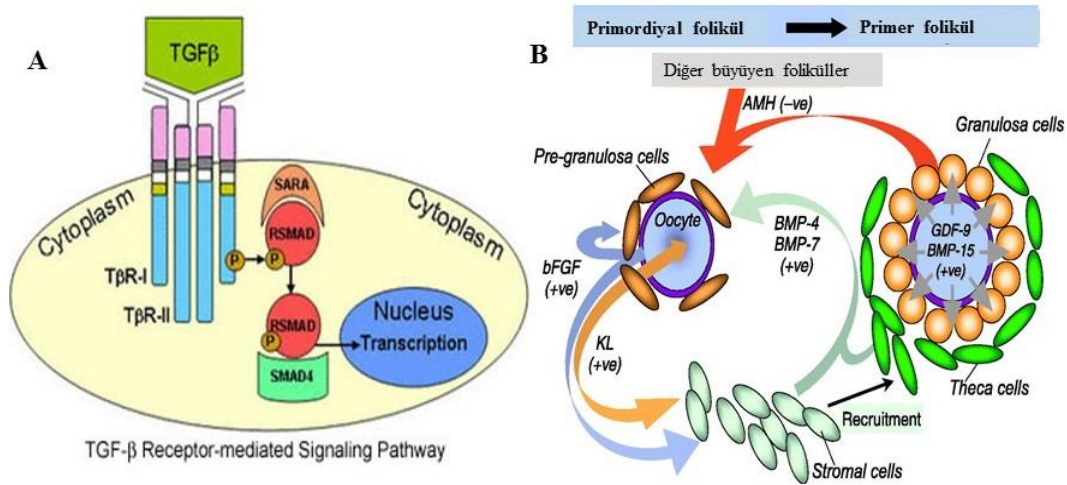
Şekil 2.2. Ephrin reseptör ve domain yapıları (89).

### 2.5.2. GDF-9

Transforming growth faktör beta (TGF $\beta$ ) gerek embriyonik gerekse doğum sonrası gelişim sürecinde programlı hücre ölümünde (apoptozda), hücre çoğalmasında, hücre farklılaşması ve özelleşmesinde, ekstraselüler matris oluşumunda görev alan geniş bir sitokin ailesinin başlıca üyesidir (90). Memelilerde 40 tan fazla TGF $\beta$  tespit edilmiştir. TGF $\beta$  ligandları ya homodimerik ya da heterodimerik moleküllerdir ve serin treonin kinaz reseptörlerine bağlanmasıyla sinyal başlatırlar. TGF $\beta$ 'nın tip I ve tip II olmak üzere fonksiyonel ve yapısal özelliklerine göre ayrılmış iki reseptörü vardır (91). TGF $\beta$ 'nın tip II reseptörüne bağlanması, bu reseptörün kinaz aktivitesinin ortaya çıkmasına ve tip I'in fosforilasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.3 A). TGF $\beta$  üst

ailesinin bir üyesi olan Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9), memeli ovaryumunda follikülogenez ve fertilite için gerekli parakrin faktörlerden biridir. Ovaryumun somatik hücrelerince sentezlenen GDF-9 direkt olarak oosit büyümesi ve fonksiyonunu etkiler (Şekil 2.3 B) (90).

GDF-9, ovaryumda primer folliküllerin gelişiminde ve farklılaşmasında, granülosa ve teka hücrelerinin büyümesinde, oositin olgunlaşması ve farklılaşmasında önemli roller üstlenir (90, 92). GDF-9 varlığında primordiyal folliküllerin gelişiminin belirgin şekilde arttığı ve ikinci safhaya geçtikleri, ekspresyonun az olması durumunda folliküllerin gelişmediği, intraovaryan hiperandrojenizmin şekillendiği düşünülmektedir (90).



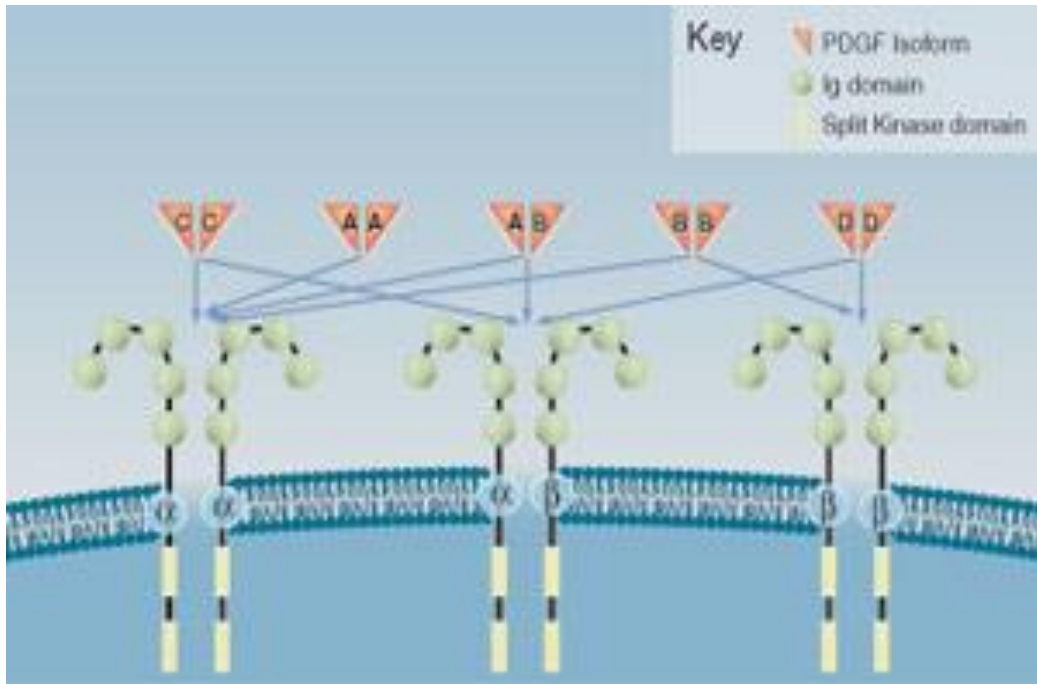
Şekil 2.3. TGF-β sinyal iletimi (A, 93) ve GDF-9'nin oositler üzerine etkisi (B, 90).

### 2.5.3. PDGF-A

Büyüme faktörleri ailesinin bir üyesi olan PDGF (platelet-derived growth factor) disülfid bağları ile bağlanan dört farklı polipeptid zincirinden oluşan, 30 kDa ağırlığında dimerik glikoproteinlerdir. PDGF zincirleri homodimer ve heterodimer alt ünitelerinden oluşmuştur ve beş izoformu: PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, ve -DD vardır (Şekil 2.4). PDGF ligandları, tirozin kinaz aktivitesi gösteren iki farklı PDGF reseptörüne, reseptör alfa (PDGFRA) ve reseptör beta (PDGFRB) bağlanır ve aktif hale gelirler (94).

Yapılan birçok çalışmada PDGF'lerin çeşitli hücrelerce üretildiği gösterilmiştir.

PDGF'ler, hücre büyümesi ve bölünmesini düzenleyen sayısız büyüme faktörlerinden biridir. Özellikle, kan damarlarının oluşumu (anjyogenez) ve hali hazırda damar bulunan dokularda kan damarlarının gelişiminden sorumludur. PDGF'ler, hücre çoğalmasında, göçünde, farklılaşmasında ve kemotaksiste, embriyogenez ve organogeneze, yara iyileşmesi, anjyogenez ve iskelet kas rejenerasyonları gibi birçok önemli fonksiyonda görev alırlar. Ayrıca nöral kista ve merkezi sinir sistemi gelişiminde de rol oynamaktadırlar (94, 95). Potansiyel mitojenik ajanlar olduğu düşünülen PDGF'ler farklılaşmamış mezenşim hücrelerinin ve bazı progenitör hücrelerin çoğalmasını sağlayarak mitojenler gibi davranırlar. Sonraki dönemlerde ise, doku şekillenmesi ve hücrelerin farklılaşmasında etkindirler (95). Ayrıca yapılan çalışmalarda, PDGF'lerin kemirgenlerde preantral folliküllerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. PDGF izoformları ve reseptörlerinin farelerde ve ratlarda primordiyal folliküllerden itibaren eksprese edildiği bildirilmiştir (95). *In vitro* olarak uygulanan PDGF-A izoformunun primordiyal ve sekonder folliküllerin gelişimini uyardığı bildirilmiştir (95).



Şekil 2.4. PGDF reseptör ve ligandları (96).

#### 2.5.4. Trombosit endotel hücre adezyon molekülü (Pecam-1, CD31)

Trombosit endotel adezyon molekülü-1 (Pecam-1); CD31 olarak da bilinen, 130 kD ağırlığında immünglobulin (Ig) süperaillesinden bir moleküldür. Altı adet Ig benzeri domain içerir. Pecam-1 birçok hücre ve dokuda eksprese edilir (97, 98). Özellikle endotel hücreleri üzerinde bulunan hücre-hücre adezyon molekülüdür. Monosit, trombosit, nötrofil, ve endotel hücresi üzerinden eksprese olurlar ve endotel hücre göçünde görev yaparlar. Endotel hücreleri üzerinde bağlantıyı sağlayan en önemli bileşendir (99). Pecam-1 mRNA'larının akciğer, beyin, böbrek ve karaciğer gibi dokularda da bulunduğu gösterilmiştir (100).

Pecam-1'ler en çok endotel hücrelerin lateral sınırlarında yani hücre-hücre temas bölgelerinde eksprese olurlar. Böylece hücre-hücre teması ve damar geçirgenliğinde bariyer oluşturarak lökositlerin göçünde hayati bir görev üstlenirler. Pecam-1'ler normalde endotel hücrelerinde hücre-hücre temas bölgelerinde eksprese olsalar da, hücre göçü süresince hücrede diffüz şekilde dağılır. Endotel hücre göçü vaskülogenez, anjiyogenez ve yara iyileşmesi için gereklidir (97, 99).

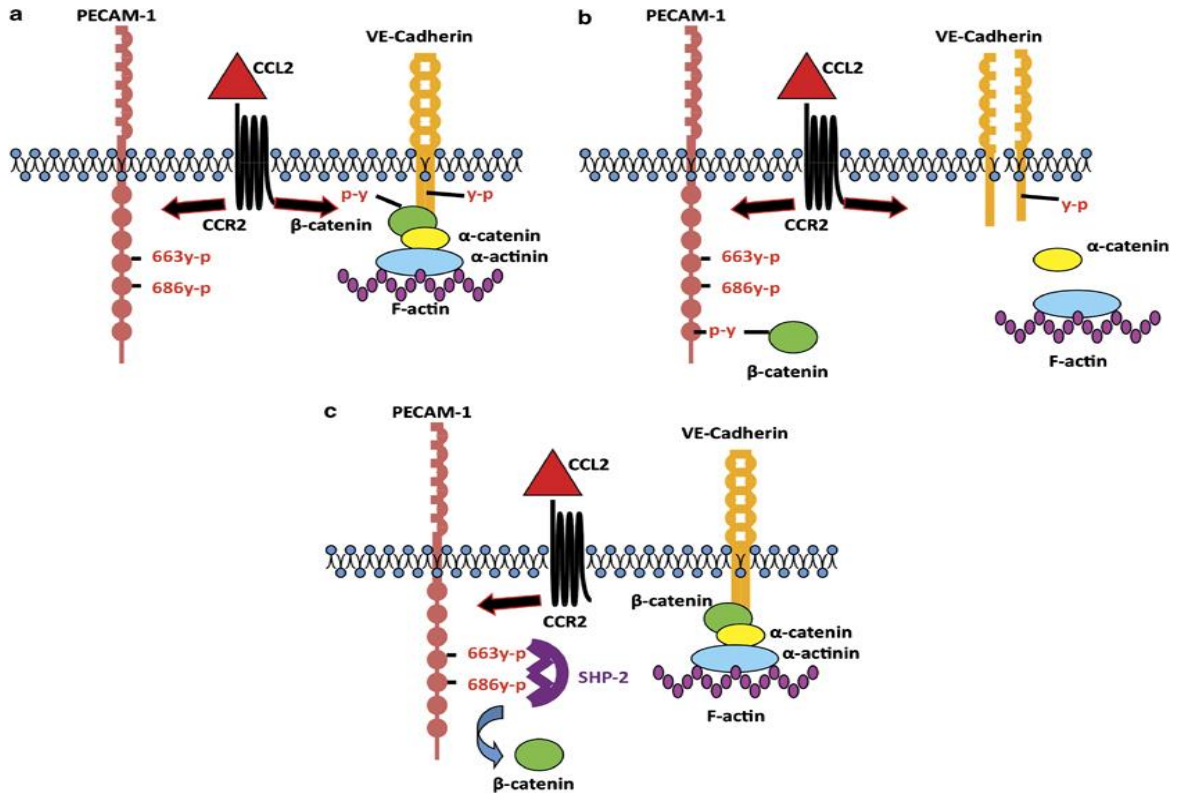
Pecam-1'in en karakteristik hücreyel rolü trombositler ve bazı immün bağışıklık hücrelerinde inhibitör sinyal oluşturmasıdır. Bir diğer önemli görevi ise, hücre adezyonu ve göçüdür. Adhesive özelliği bulunan Pecam-1'ler diğer reseptörlerin adhesive özelliklerini de etkileyebilirler (100). İntegrin aktivitesi ve hücre iskeletindeki etkileri ile ekstraselüler matriks üzerinde adezyon ve hücre motilitesine katılırlar. İntegrinler ekstraselüler matriks bileşenleri reseptörleridir ve Pecam-1 ile ilişkisi bilinmektedir (99).

Pecam-1'ler nötrofil ve makrofajların damar endotelinden geçişi için gereklidirler. Pecam-1'in gelişen fare embriyolarında eksprese edildiği bilinmektedir. Bu nedenle Pecam-1'in endotel hücrelerinden eksprese edilen ilk adezyon molekül olduğu düşünülmektedir. Yani, Pecam-1 trombosit agregasyonu, apoptoz, anjiyogenez gibi birçok biyolojik süreçle ilişkilidir. Pecam-1 birçok çalışmada anjiyogenezin belirlenmesinde kullanılan endotel hücrelerine özgü spesifik belirteçlerden biri olarak kullanılmıştır (101).

### 2.5.5. Vasküler Endotelyal Kaderin (VE-Cadherin-CD5)

Kaderinler, kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyonundan sorumlu transmembran glikoproteinlerdir. Buldukları dokulara göre isimlendirilirler. Endotel hücrelerinde, vasküler endotelyal kaderin (VE-kaderin) ve nöronal kaderin (N-kaderin) yüksek seviyede eksprese edilirler. Ancak N-kaderin nöral hücrelerde ve kas hücrelerinde daha fazla eksprese edilirler (102). E-kaderinler epitel hücrelerinde eksprese olurlarken, P-kaderinlerin, plasentada eksprese oldukları ancak belirli dönemlerde diğer dokularda da buldukları bildirilmiştir (102). Kaderinler yapısal olarak birbirleri ile benzerlik gösterirler. Sitoplazmik kısmı üç sitoplazmik protein ile ilişkilidir; bunlar  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  katenindir (Şekil 2.5). Böylece kaderinler hücre iskelet ağına sabitlenirler (102, 103).

VE-kaderin, CD144/cadherin-5 olarak da bilinir. VE-kaderinler, 125 kDa ağırlığında transmembran glikoproteindir. Hücredeki ekstraselüler kısımları cis-dimerleri yoluyla hücreler arası aderens tipi bağlantı oluşumunu sağlarlar (103, 104). Sitoplazmik kısımları ise  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  kateninler yoluyla aktin hücre iskeleti ile ilişkidir (102, 103). VE-kaderinin kateninlerle olan ilişkisi, adherens tipi bağlantıların stabilizasyonunun yanı sıra endotel geçirgenliğinin hücresel kontrolü için de gereklidir. Yani VE-kaderinler, damar bütünselliğinin devam etmesinde endotelyal bariyer görevi de görürler. VE-kaderinler, hücre döngüsü ve hücre dinamiklerinin kontrolünde görev alan hücre içi sinyal yolağının doğrudan ve dolaylı olarak katılımcıdırlar. VE-kaderin işlevi, bloklanmış deney modellerinde hücre-hücre adezyonunda bozulmalar, damar geçirgenliğinde artış, lökosit trans-göçünde artış, damarlarda kırılabilirlik ve kanamalar olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (104). Bu veriler, VE-kaderinlerin ekspresyonlarının endotel hücre biyolojisinde dolayısıyla anjiyogenez sürecinde vazgeçilmez moleküller olduğuna işaret etmektedir. Farelerde anti-VE-kaderin antikorunun damar geçirgenliğinde artışa, damarlarda kırılabilirliğe ve kanamalara neden olduğu rapor edilmiştir (103).



Şekil 2.5. VE-kaderin aktivasyonu ve diğer moleküllerle olan etkileşimi (105).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan cihazlar

- Masaüstü mikro santrifüj (Msc Micro Centaur, UK)
- Hassas tartı (Denver Instrument Company, USA)
- Manyetik karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- Vorteks (Clifton Cyclone, UK)
- PH metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- Mikrodalga fırını (Arçelik MD 554 Intellwave, Türkiye)
- Mikropipetler -10 µl, 20 µl, 200 µl ve 1000 µl- (Gilson, USA)
- Thermal cycler (Gen Amplifikasyon PCR 9700 applied biosystems, USA)
- Elektroforez güç kaynağı (EC 1000-90)
- Yatay elektroforez sistemi (Whatman Biometra, Germany)
- Jel görüntüleme (Vilber lourmat photodocumentation and video graphic printer UP-895CE)
- Laminar flow kabin (Steril-Vbh)
- Ben Mari (Leica, Germany)
- Doku Takip Cihazı (Leica, Germany)
- Gömme Fırını (MKN Taab, UK)
- Floresan Mikroskop (Olympus BX51, Japan)
- Mikrotom (Leica, Germany)
- Rotor Gene 6000 (Qiagen, Germany)
- Maestro Nanodrop ( Green Bioreserch, USA)

#### 3.2. Kullanılan plastik malzemeler

- 0,2 ml ve 2,0 ml mikro santrifüj tüpleri (Axygen)
- 100 µl PCR tüpleri (Qiagen)
- 15 ml ve 50 ml konik uçlu falkon tüpleri (LP's)
- 0,5–10 µl, 1–200 µl, 100–1000 µl mikropipet uçları (Axygen)
- 5 ml, 10 ml, 25 ml plastik pipetler (LP Italiana SPA)

### 3.3. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

- Etil Alkol (Merck, Germany)
- Ksilol (Merck, Germany)
- Formaldehit (Merck, Germany)
- Hematoksilen (Biooptica, Italy)
- Eozin-Y (Biooptica, Italy)
- Pikrik Asit (Merck, Germany)
- Sodyum dihidrojen fosfat (Merck, Germany)
- Di sodyum hidrojen fosfat (Merck, Germany)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- Sodyum sitrat (Merck, Germany)
- Triton® X-100 ( Biotech, Canada)
- Tween-20 (Merck, Germany)
- Hidrojen peroksit (Merck, Germany)
- BSA (Sigma, USA)
- DAPI (Fluka, USA)
- EFN B1 (Santa Cruz, USA)
- GDF9 (Bioss, USA)
- PDGF-A (Santa Cruz, USA)
- VE-Cad/CD5 (Abcam, UK)
- CD31 (Bioss, USA)
- Normal Goat Serum (Invitrogen, USA)
- Goat anti rabbit IgG-CY3 (Invitrogen, USA)
- HRP-Streptavidin (Thermo scientific, USA)
- Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Thermo scientific, USA)
- Plus Substrate (Thermo scientific, USA)
- Plus Chromogen (Thermo scientific, USA)
- AEC (Invitrogen, USA)
- DMSO (Sigma, USA)
- PrOH (Sigma, USA)
- EG (Sigma, USA)



- PVP (Sigma, USA)
- RPIM 1640 ( Gibco, USA)
- FBS (Gibco, USA)
- Penisilin Streptomisin (Sigma, USA)
- Crystal Mount Aqueous Mounting
- Entellan (Merck, Germany)
- RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)
- RT First cDNA synthes kit (Qiagen, Germany)
- RT<sup>2</sup> SYBR Green FAST Mastermix (Qiagen, Germany)
- RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assay (Qiagen, Germany)
- RNAlater (Qiagen, Germany)
- Proteinaz K (Fermentas, USA)
- Tris (Merck, Germany)
- EDTA (Merck, Germany)

### 3.4. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

#### 3.4.1. Bouin Çözeltisi:

- Suda doyurulmuş pikrik asit      300 cc
- %40 Formalin                              100 cc
- Glasiyal asitik asit                        20 cc

#### 3.4.2. % 10'luk Tamponlanmış Nötral Formalin (pH=7.0)

- Formaldehit                                100 cc
- Distile su                                      900 cc
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O                                4 g
- Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>                                        6.5 g

#### 3.4.3. Na-Sitrat Tamponu

- Tri Na- Sitrat (dihidrat) 2,94 g
- Distile su                                      1000 ml
- pH=6.0 olacak biçimde hazırlandı ve çözeltiliye 0,5 ml Tween-20 eklendi.

#### 3.4.4. Tris EDTA Tamponu

- Tris 1.211 g
- EDTA 0,372 g
- Distile su 1000 cc
- pH=9.0 olacak biçimde hazırlandı ve çözeltiliye 0,5 ml Tween-20 eklendi.

#### 3.4.5. Peroksidaz Bloklama Çözeltisi

- %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 ml
- Metanol 90 ml

#### 3.4.6. Yıkama Çözeltisi

- 1000 ml PBS içinde 5 ml Tween-20 çözünerek hazırlandı.

#### 3.4.7. Normal Keçi Serumumu

- PBS
- %3'lük keçi serumu
- %1'lik BSA
- %0,1'lik Triton X-100
- %0,05'lik Tween-20

### 3.5. Ovaryum Dokusunun Elde Edilmesi ve Deney İçin Hazırlanması

Bu çalışma için, Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 30.03.2012 tarih ve 2012/315 karar numarası ile onay alınmıştır. Çalışmamızda, Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvar'ında normal diyetle beslenen, oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık periyotlar oluşturularak östrus evresine girmeleri sağlanmış 16 adet 8-10 haftalık Swiss albino türü dişi fareler kullanıldı. 5mg/kg Diazepam intraperitoneal ve 200 mg/kg Ketamine HCl intramüsküler yoldan verilerek uyutulan hayvanların ovaryumları cerrahi müdahale (laparotomi) ile çıkartıldı. Ovaryum dokuları içinde vitrifikasyon işlemi de kullanılan ve % 0,1 (v/v) penisilin streptomisin içeren RPMI 1640 medyumu bulunan steril petrilere transfer edilip çevre bağ ve yağ dokuları disekte edilerek temizlendi.

Ovaryum dokuları 3 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu (Grup I) için 5 ovaryum dokusu hiçbir işlem yapılmadan tespit edildi. Işık mikroskopisi için Bouin çözeltisi, immünohistokimyasal inceleme için %10'luk tamponlanmış nötral formalin çözeltisi içinde tespit edildi.

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup-çözölmüş çalışma grubu (Grup II) için 5 ovaryum dokusu ayrıldı. Dokular vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup-çözöldükten sonra ışık mikroskopisi için Bouin çözeltisi, immünohistokimyasal inceleme için %10'luk tamponlanmış nötral formalin çözeltisine alınarak tespit edildi.

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan dokularda follüköllerin canlılığını test etmek için dokuların böbrek kapsülü altına transplantasyonu yöntemi uygulandı. Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup-çözöldükten sonra transplantasyonu yapılan grup (Grup III) için alıcı hayvanların 5 ovaryum dokusu ayrıldı. Ovaryum dokuları vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup-çözöldükten sonra alındıkları hayvanların böbrek kapsülü altına transplante edildi. Vitrifikasyon yönteminin, follüköller havuzdaki olumsuz etkisini morfolojik olarak belirlemek amacıyla grup III içinde sham (kontrol) grup olarak diğer 5 ovaryum dokusu ayrıldı. Ovaryum dokuları alındıkları hayvanların böbrek kapsülü altına dondurulmuş dokularla eşzamanlı hiçbir işlem yapılmadan (taze) transplante edildi. Transplantasyondan 17 gün sonra dokular alıcı hayvanların böbrek dokularıyla beraber çıkarılarak morfolojik çalışma için Bouin çözeltisi, immünohistokimyasal inceleme için %10'luk tamponlanmış nötral formalin çözeltisine alınarak tespit edildi.

Kontrol ve tüm çalışma gruplarında, follüköller ışık mikroskopik yöntemlerle morfolojik olarak değerlendirildi. Kontrol, grup II ve grup III çalışma gruplarında ovaryum dokuları, Ephrin B1, GDF-9, PDGF- $\alpha$ , Ve-cadherin ve Pecam-1 molekülleri açısından immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi. Bu moleköllerin, kontrol ve çalışma gruplarında ekspresyon analizleri ise toplamda 10 ayrı ovaryumda RT-PCR yöntemiyle belirlendi. RT-PCR yöntemi için ovaryum dokularından mRNA elde edildi.

### 3.5.1. Vitrifikasyon Yöntemi ile Ovaryum Dokusunun Dondurulması

Ovaryum dokuları, steril petriyer içinde steril bistüri uçları yardımıyla iki parçaya ayrıldıktan sonra, artan konsantrasyonlarda DMSO, 1,2 propandiol ve EG içeren üç inkübasyon basamağında inkübe edildi ve kriyo tüplere alınıp ağzı sıkıca kapatılmış olarak -196 °C sıvı azot bulunan tankların içine daldırılarak dondurulma işlemi tamamlandı. Doku parçaları kullanılıncaya kadar en az 1 hafta boyunca sıvı azot tanklarında saklandı (16).

Vitrifikasyon protokolü, daha önce Keros ve ark. 2009, yılında tanımladıkları protokolün kısmen modifiye edilmesiyle oluşturuldu (106). Ovaryum doku parçaları, ilk olarak %10'luk fetal bovine serum (FBS) içeren HEPES tamponlu RPMI 1640 medyumunda oda ısısında 5 dakika yıkandı. Doku parçaları daha sonra artan derişimlerde (%2,5, %5 ve %10) DMSO, PrOH, EG ve %10'luk FBS içeren HEPES tamponlu RPMI 1640 medyumunda içinde ilk iki basamakta 10 dakika oda ısısında, son basamakta ise 10 dakika +4 °C inkübe edildi. %10 w/v PVP içeren son vitrifikasyon çözeltisinden dokular steril elektron mikroskobu gridleri üzerine alındı ve steril sargı bezi üzerinde kalan vitrifikasyon çözeltileri mümkün olduğunca alınarak 1,8 ml'lik kriyo tüplere alınıp ağzı sıkıca kapatılmış olarak -196 °C sıvı azot bulunan tanklar içine daldırılarak dondurulma işlemi tamamlandı.

### 3.5.2. Vitrifikasyon Yöntemi İçin Çözme İşlemi (Warming)

Sıvı azottan çıkartılan kriyo tüpler 30 saniye oda ısısında bekletildikten sonra %20'lik FBS ve 1 mol/L sükröz içeren 37 °C' de önceden bekletilmiş hepes tamponlu RPMI 1640 medyumunda içine alınıp oda ısısında 2 dakika inkübe edildi. Gridlerden ayrılan ovaryum dokuları, %20'lik FBS ve sırasıyla 0,5 mol/L, 0,25 mol/L, 0,125 mol/L sükröz içeren RPMI medyumunda oda ısısında 5'er dakika inkübe edildikten sonra sükröz içermeyen %20'lik FBS içeren RPMI medyumunda 5 dakika oda ısısında yıkandı. Ovaryum dokuları sonraki işlemlere geçmeden önce %10'luk FBS içeren RPMI medyumunda içine alınıp karbondioksitli etüvde 15 dakika inkübe edildi.

### 3.5.3. Ovaryum Dokusunun Ototransplantasyonu

Gerek taze gerekse vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan ovaryum doku parçaları çözünme ardından aynı farelere heterotopik olarak böbrek kapsülü altına transplante edildi. Böbrek kapsülünde dorsal-horizontal yönde 27 G iğne kullanılarak küçük bir açıklık oluşturuldu. Ovaryum doku parçaları bu açıklıktan dikkatlice böbrek kapsülü altına yerleştirildi. Böbrekler vücut boşluğunda normal pozisyonuna alınarak vücut duvarı ve deri kesileri 7.0 prolene suture ile dikildi. Operasyon steril koşullar altında gerçekleştirildi ve işlem süresi her hayvan için maksimum 30 dakikada tamamlandı. Müdahalelerin ardından deneklere hemen 4 mg/kg Carprofen ağrı kesici olarak verildi. 3 gün süreyle 30 mg/kg seftriakson Na içeren antibiyotik, enfeksiyondan korunma amaçlı olarak müdahale edilmiş hayvanlara intramüsküler yoldan uygulandı. Müdahale edilmiş fareler transplantasyon sonrasında 17 gün ayrı kafeslerde 20-24 °C oda ısısında normal pelet yemle beslendi.

### 3.6. Histolojik Değerlendirme

Kontrol ve çalışma gruplarına ait ovaryum dokuları ışık mikroskopik inceleme için Bouin çözeltilisinde 24 saat tespit edildi.

Tespit işlemi ardından,

#### A) Dehidrasyon

- %70'lik etil alkol 1 gece + 4 °C
- %80'lik etil alkol: 2 saat x 2
- %95'lik etil alkol: 2 saat x 2
- %100'lük etil alkol: 2 saat x 2

#### B) Şeffaflandırma

- Ksilol 2 saat x 2

#### C) İnfiltrasyon (Emdirme)

- Parafin 2 saat x 2
- Parafin 2 saat x 2

#### D) Gömme

- Sert parafine gömülür

Elde edilen parafin bloklar +4 derecede buzdolabında bekletildi. Kesitler alınmadan önce birkaç saat derin dondurucuda bekletilen bloklardan mikrotomla

(Leica, Germany) 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Seri kesitlerin her 11. kesiti değerlendirilmek için lam üzerine alındı. Lam üzerine alınan kesitler 60 °C' lik etüvde en az 1,5 saat bekletildi. Histolojik boyamaya hazır hale getirilen kesitler H&E (Hematoksilen-Eozin) ile boyandı.

### **3.6.1. Hematoksilen ve Eosin (HE) Boyanma Protokolü**

1. Ksilol icinde deparafinizasyon 30 dk
2. Ksilol icinde deparafinizasyon 30 dk
3. % 100'lük etil alkol 2 dk
4. % 100'lük etil alkol 2 dk
5. % 95'lik etil alkol 2 dk.
6. % 80'lik etil alkol 2 dk.
7. % 70'lik etil alkol 2 dk.
8. Distile su 5 dk.
9. Hematoksilen 7 dk.
10. Akarsu 5 dk.
11. Asit Alkol'de çalkalama
12. Akarsuda yıkama
13. Amonyaklı su mor renk olana kadar çalkalama
14. Akarsu yıkama
15. Eozin Y. 4 dk.
16. Akarsu yıkama
17. % 50'lik etil alkol çalkalama
18. % 70'lik etil alkol çalkalama
19. % 96'luk etil alkol çalkalama
20. % 100'lük etil alkol çalkalama
21. % 100'lük etil alkol 1 dk
22. Ksilol I 20 dk
23. Ksilol II bir gece

Boyanmış preparatların üzerine bir damla entellan damlatılarak lameller (Isotherm Cover glass, 24x50 mm, 0.13- 0.17mm kalınlığında) ile doku arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılarak oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kontrol ve çalışma

gruplarında folliküllerin, granülosa hücrelerinin ve ovaryum stromasının morfolojisi Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskobu ile incelendi. Folliküllerin sayımı sırasında çift saymayı engelleme adına her lama 3 kesit alındı. Folliküller komşu kesitlerde takip edilerek sadece çekirdeği gözlenebilen oositlere sahip folliküller sayıldı. Folliküller, primordiyal, primer, sekonder ve antral olarak Gougeon (107) tarafından tanımlanan şekilde sınıflandırıldı ve sayıldı. Primordiyal folliküller, oosit çevresinde yassı folliküler hücrelere sahip, primer folliküller oosit çevresinde tek tabakalı kübik folliküler hücrelere sahip, sekonder folliküller oosit çevresinde iki veya daha fazla kübik folliküler hücrelere sahip ancak antral boşluğu olmayan folliküller olarak tanımlandı. Antral folliküller ise antral boşluğun varlığıyla karakterize olarak tanımlandı (106-108). Eozinofilik sitoplazmaya sahip, piknotik çekirdekli oosit içeren folliküller, kromatin materyalin büzüştüğü oositlere sahip folliküller, zona pellusida'nın düzenli yapısını kaybettiği folliküller ve birbirleriyle bağları kopmuş granülosa hücrelerinin çok görüldüğü folliküller atreziye olmuş folliküller olarak değerlendirildi (16, 106).

### **3.7. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan Boyama**

Kontrol ve çalışma gruplarına ait dokular %10'luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 30-36 saat süre ile tespit edildi. Dokular dehidrasyon, şeffaflandırma ve parafine gömme ardından + 4 °C'ye kaldırıldı. Mikrotomla (Leica Germany) kesit almadan birkaç saat önce bloklar – 20 °C' ye alınıp 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler poli-L-lizin kaplı lam üzerine alındıktan sonra bir gece oda ısısında tespit edilip boyama aşamasına kadar 4°C'de saklandı. Alınan kesitlerde Ephrin B1, GDF-9 ve PDGF-α ekspresyonları immünohistokimya ve immünofloresan işaretleyiciler kullanılarak belirlendi. Ve-Cadherin ve Pecam-1 ekspresyonları ise immünohistokimyasal boyamayla belirlendi. Her boyamada, negatif kontrol için primer antikörlerin uygulanmadığı kontrol kesitleri kullanıldı.

#### **3.7.1. İmmünohistokimya Boyama Protokolü**

1. 10 dk 2 değişim ksilolde deparafinizasyon
2. %100'lük etil alkol 2 dk
3. %100'lük etil alkol 2 dk

4. %95'lik etil alkol 2 dk.
5. %80'lik etil alkol 2 dk.
6. %70'lik etil alkol 2 dk.
7. Distile su 5 dk.
8. Endojen peroksidaz aktivitesi, kesitler hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ , Thermo scientific, USA) çözeltisinde 15 dakika oda ısısında bekletilerek giderildi.
9. Yıkama çözeltisi (PBS-Tween 20) 2 kez 3'er dakika yıkandı.
10. Mikrodalga fırında 2 defa 10'ar dakika sırasıyla maksimum güçte ve 600W'da 10 mM sodyum sitrat tamponu (pH 6) içerisinde epitoplardan açığa çıkarılması gerçekleştirildi. Ve-cadherin antikoru için uygun Tris EDTA tamponu (pH 9) kullanıldı.
11. Pappen (Dako, Glostrup, Denmark) ile örneklerin etrafı çizildi.
12. Yıkama çözeltisi (PBS-Tween 20) 2 kez 3'er dakika yıkandı.
13. Kesitler serum bloklama çözeltisi (Ultra V Block) ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. (Thermo Scientific, USA)
14. Kesitlere uygun primer antikolar ilave edilerek  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 1 gece nemli ortamda inkube edildi. Bu çalışmada kullanılan primer antikoların üretici firma, katalog numaraları ve kullanıldıkları seyreltme oranları;
  - Ephrin B1 (sc-1011, 1:100)
  - GDF-9 (bs-1795R, 1:100)
  - PDGF- $\alpha$  (sc-128, 1:100)
  - Ve-kaderin (ab-33168, 1:50)
  - Pecam-1 (bs-0195R, 1:100)
  - Bütün primer antikolar antibody diluent reagent (Invitrogen) çözeltisiyle seyreltildiler.
15. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
16. Sekonder antikor, biyotinle konjuge keçi anti-polivalent (Thermo scientific, TP-015 BN) ile oda ısısında 20 dakika nemli karanlık ortamda inkube edildi.
17. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 3 kez 2'şer dakika yıkandı.
18. HRP-Streptavidin (Thermo Scientific TS-015 HR) oda ısısında 20 dakika nemli karanlık ortamda inkube edildi.



19. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 3 kez 2'şer dakika yıkandı.
20. AEC (Invitrogen) substrat çözeltisi ile 5-10 dakika (mikroskopik kontrollü gerçekleştirildi). Ve-kaderin antikorunun uygulandığı kontrol ve çalışma gruplarında ve Pecam-1 antikorunun uygulandığı kontrol ve grup III'de DAB (3,3-diaminobenzidine) kromojen boyası uygulandı.
21. Zıt boyama, Mayer's Hematoksilen (Merck) içinde 1,5 dakika yapıldı.
22. Akarsu altında hematoksilenin fazlası yıkandı.
23. Dokular kapatma medyumu (crystal mount aqueous mounting) ile kapatıldı.

### 3.7.2. İmmünofloresan Boyama Protokolü

1. 10 dk 2 değişim ksilolde deparafinizasyon
2. %100 'lük etil alkol 2 dk
3. %100'lük etil alkol 2 dk
4. %95'lik etil alkol 2 dk.
5. %80'lik etil alkol 2 dk.
6. %70'lik etil alkol 2 dk.
7. Distile su 5' dk.
8. Mikrodalga fırında 2 defa 10'ar dakika sırasıyla maksimum güçte ve 600W'da 10 mM sodyum sitrat tamponu (pH 6) içerisinde epitoplara açığa çıkarılması gerçekleştirildi.
9. Pappen (Dako, Glostrup, Denmark) ile örneklerin etrafı çizildi.
10. Yıkama çözeltisi (PBS-Tween 20) 2 kez 3'er dakika yıkandı.
11. %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisiyle oda ısısında 30 dakika nemli karanlık ortamda endojen peroksidaz bloklama.
12. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 2 kez 3'er dakika yıkandı.
13. Serum Bloklama: Kesitlerin immunoglobulinin nonspesifik taşınmasını engellemek için normal keçi serumu bloklama çözeltisinde oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
14. Kesitler primer antikorlarla +4 °C'de nemli karanlık ortamda gece boyu inkübe edildi. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları seyrelme oranları; Ephrin B1 (1:50) GDF-9 (1:50) ve PDGF- $\alpha$  (1:50). Bütün primer antikorlar antibody diluent reagent (Invitrogen, USA) çözeltisiyle

seyreltildiler.

15. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
16. Sekonder antikor (CY3 konjuge keçi anti-tavşan IgG, Invitrogen, A10520) oda ısısında 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.
17. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
18. 0,5 µg/mL DAPI (Fluka, 32670) ile oda ısısında 10 dakika çekirdek boyaması yapıldı.
19. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 2 dakika yıkandı.
20. Kapatma medyumuyla kapatma yapıldı.

### **3.8. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Yöntemi**

Kontrol ve çalışma grupları incelenen her antikor için immunoreaktivite açısından değerlendirildi. Antikorların ekspresyon şiddeti semikantitatif skorlama yoluyla belirlendi ve sonuçlar tablolar halinde bulgular bölümünde gösterildi. Her gruptan denek başına ardışık olmayan ve rastgele seçilmiş ortalama üç histolojik kesit birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından incelendi. Ovaryum dokularında, çalışılan antikorların boyanma derecelerine göre; boyanma olmamış ise negatif (-), çok zayıf boyanma olmuş ise ( $\pm$ ), zayıf boyanma olmuş ise (+), orta derecede boyanma olmuş ise (++) ve kuvvetli boyanma olmuş ise (+++) şeklinde ovaryum dokuları değerlendirildi.

### **3.9. Real Time PCR**

#### **3.9.1. Kontrol ve Çalışma Gruplarında RNA İzolasyonu**

Deney süresince elde edilen dokular, RNAlater (RNA stabilizasyon çözeltisi) içine alınıp 1 gece +4 °C' de çözeltinin doku içine iyice penetre olması için bekletildi. Bir gecenin ardından dokular yeni RNAlater içinde -20 °C' de RT-PCR analizinin yapılacağı güne kadar saklandı.

RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol çerçevesinde yapıldı. Çalışmaya başlanmadan önce RLT tamponu hazırlandı. 1ml RLT tampon içine 10 µl  $\beta$ -merkaptotanol eklendi. Çalışma ve kontrol grubuna ait dokular RNAlater çözeltisi içinden steril RNase free mikrosantrifüj tüplere alındı. Her bir tüpün içine, 310 µl RLT-  $\beta$ -merkaptotanol karışımı ve doku

homejanizasyonu için 40 µl proteinaz K ilave edilerek 70 °C'de benmaride 30 dakika inkübe edildi. Dokunun daha iyi homojen olması için sarı ve sonrasında siyah uçlu iğneler kullanılarak birkaç kez buz üzerinde enjektörlerden geçirildi. Karışım 3 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Çökelti üzerinde kalan sıvı kısım pipetle dikkatlice alınarak yeni steril RNase free mikrosantrifüj tüplere alındı. Üzerine 1 hacim %70'lik etanol eklendi ve pipetleme yoluyla karıştırıldı. 700 µl'lik örnekler RNeasy kolonuna yerleştirildi ve 15 saniye 13000 rpm'de santrifüj edildi. Akışkan kısım atılarak RNeasy kolonuna 700 µl RW1 tampon çözeltisi eklendi ve 15 saniye 13000 rpm'de tekrar santrifüj edildi. Akışkan kısım atıldı ve RNeasy spin membran üzerine 80 µl DNase I eklenip oda ısında 15 dakika bekletildi. Süre sonunda 350 µl RW1 tampon çözeltisi RNeasy kolonuna eklendi. Daha sonra 15 saniye 13000 rpm'de tekrar santrifüj edildi ve akışkan kısım atıldı. 500 µl RPE tampon çözeltisi RNeasy kolonuna eklenip 15 saniye 13000 rpm'de santrifüj edildi. Akışkan kısım atıldı ve üzerine tekrar 500 µl RPE tampon çözeltisi ilave edildikten sonra 15 saniye 13000 rpm'de santrifüj edildi. RNeasy kolonu 2 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp RNeasy Silica Jel Membranın kuruması için 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. RNeasy kolonu 1,5 ml'lik yeni bir tüpe alınıp membran üzerine 30 µl RNasefree su eklendi ve 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilerek yaklaşık 30 µl'lik RNA elde edildi. Elde edilen RNA'lar, nanodrop cihazı (Green Bioreserch, USA) ile kantitatif olarak ölçüldü. RNA'lar ya hemen kullanıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

### **3.9.2. cDNA Sentezi**

cDNA sentezi için First Strand cDNA Sentez Kiti (Qiagen, kat. no: 330411) kullanıldı ve bu kitin standart protokolü takip edilerek cDNA sentez edildi. Kalıp olarak bütün ovaryum örneklerinden 1 µg RNA kullanıldı. Her örnek için, PCR tüplerine 6 µl GE2 tamponu ve 8 µl RNA eklenerek pipetleme yoluyla karıştırıldı. Örnekler 1 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Numuneler 37°C'de 5 dakika primer bağlanması için inkübe edildikten sonra üzerlerine 6 µl BC4 Reverse Transkriptaz Miksi ilave edilip pipetlenerek karıştırıldı. Numuneler 1 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Daha sonra numuneler reverse transkripsiyon prosedürü için Applied Biosystems PCR 9700 marka Thermal Cycler cihazına alınarak aşağıdaki program uygulandı.

42 °C'de 15 dakika cDNA sentezi

95 °C'de 5 dakika denatürasyon gerçekleşti.

Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20 µl cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA'lar RT-PCR için kullanılana kadar -20 °C'de saklandı. RT-PCR öncesinde örnekler buz üzerinde çözüldükten sonra 1 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. cDNA örnekleri yeni bir PCR tüpüne alınarak kitin standart protokolü gereğince üzerlerine 91 µl su ilave edilerek kullanıldı.

### 3.9.3. Eş zamanlı PCR

RT-PCR analizi RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix kiti (Qiagen kat. No.: 330512) kullanılarak gerçekleştirildi. Deneylerde tüm cDNA örnekleri aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez çalışıldı. Bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanıldı. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları en aza indirmektir. Çalışmada *housekeeping* gen (GAPDH) kontrol ve çalışma grupları arasındaki ifade düzeyi farklılıklarını belirlemek amacıyla iç kontrol olarak kullanıldı. Numunelere ait cDNA'lar aşağıda miktarları ve içerikleri belirtilen reaksiyon bileşenleriyle pipetlenerek her numune için toplamda 25 µl'lik reaksiyon karışımları elde edildi.

qRT-PCR koşulları:

- 12,5 µl RT-PCR Master mix
- 6,5 µl dd H<sub>2</sub>O
- 5 µl cDNA
- 1 µl Primer

25 µl'lik reaksiyon karışımları elde edildikten sonra, Real Time-PCR reaksiyonu Rototor Gene 6000 marka cihazda aşağıdaki döngü programı uygulanılarak gerçekleştirildi.

<b><u>Sıcaklık</u></b>	<b><u>Süre</u></b>	<b><u>Döngü</u></b>
95°C	10 dakika <sup>1</sup>	1
95°C	15 saniye	40
60°C	1 dakika <sup>2</sup>	40

<sup>1</sup> HotStart DNA polimerazın aktivasyonu

<sup>2</sup>Her döngünün uzama basamağında her bir örnek için SYBR Green floresans belirlenmesi ve kaydedilmesi.

### 3.9.4. Primerler

Real Time PCR, reaksiyona giren PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan floresan boyadan alınan sinyalin miktarı arasındaki orantı esasına göre çalışır ve sonuçlar PCR analizi sırasında elde edilir. Bu çalışmada floresan boya olarak SYBR-Green kullanıldı. RT PCR tekniğinin sorunsuz çalışması için uygun primer seçimi çok önemlidir. Primerlerin, cDNA'ya özgül olarak bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Bu çalışmada, üretici firmanın daha önceden optimize ettiği primerler kullanıldı. Gen ekspresyonları incelenen genlere ait özgül primerlerin üretildiği firma ve katalog numaraları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Real Time PCR yönteminde kullanılan primerler, üretici firma ve katalog numaraları.

<b>Primerler</b>	<b>Katalog Numarası</b>	<b>Firma</b>
Ephrin B1	PPM05455A-200	Qiagen
GDF-9	PPM04468C-200	Qiagen
PDGF-a	PPM03103E-200	Qiagen
PECAM-1	PPM03802C-200	Qiagen
VE-cadherin	PPM03797C-200	Qiagen
Gapdh	PPM02946E	Qiagen

### 3.9.5. RT- PCR Ürünlerinin Özgüllüğünün Belirlenmesi

Real-Time PCR reaksiyonu sonrasında amplifiye edilen PCR ürünlerinin özgüllüğü RT-PCR cihazında Erime Eğrisi Analizi ve Agaroz Jel Elektroforezi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Amplifikasyon ürünlerinin sadece hedef genlere özgü olup olmadığını tespit etmek amacıyla % 2' lik agaroz jel (1XTBE içerisinde) hazırlanarak jelde yürütüldü. 10 ml PCR ürünü alınıp, üzerine 2,5 ml 6X'lik yükleme tamponundan konarak karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi ve 90 voltta yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alındı.

### **3.9.6. Verilerin Analizi**

Bu çalışma süresince yapılan tüm deneyler, ölçümler, incelemeler ve değerlendirmelerde, RT-PCR sonuçları *Rotor-gene 6000 series software version 1.7* yazılımı ile kantite edilmiştir. Veriler  $\Delta\Delta C_T$  metodu ile istatistiksel analizi RT<sup>2</sup> profiller RT-PCR Array Data Analysis version 3.5 (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

#### 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda istatistiksel analiz, SPSS 14.0 programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesi yapıldı. Normal dağılışa uygunluk gösteren veriler varyans analizi Tukey testi, RT-PCR verileri iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi Student's T-testi ile değerlendirildi. Yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı. Normal dağılıma uygunluk göstermeyen veriler, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U ve  $\chi^2$  testleriyle değerlendirildi. Yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

## 5. BULGULAR

### 5.1. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR

Fare ovaryum dokularında korteks içerisinde yerleşik farklı gelişim aşamalarında folliküller; primordiyal, primer, sekonder ve antral folliküller incelendi. Folliküller, primer oosit, follikülü oluşturan hücreler ve follikül bütünlüğü açısından değerlendirildi.

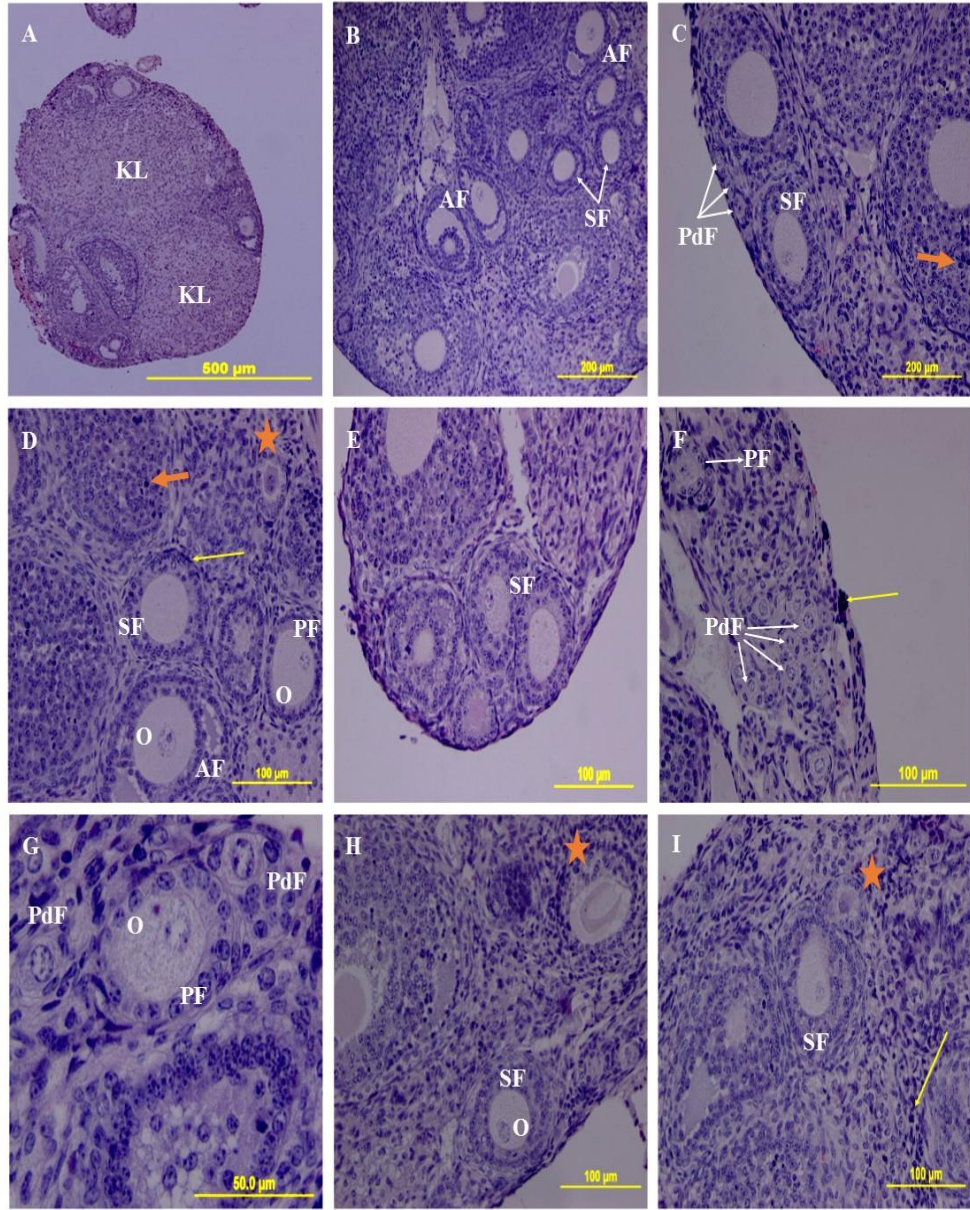
#### 5.1.1. Kontrol Grubu (Grup I) Bulguları

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde, tek katlı yassı epitel hücreleriyle çevrili primordiyal folliküller (Şekil 5.1 F, G), tek katlı kübik epitelle çevrili primer folliküller (Şekil 5.1 D, G), iki veya daha fazla sayıda granülosa hücre tabakası ile çevrili sekonder folliküller (Şekil 5.1 B, C, D, E, H, I) ve antral folliküller (Şekil 5.1 B, D) gözlemlendi.

Morfolojik olarak normal folliküllerde, oosit çekirdeğinin ökromatin yapıda, iri ve çekirdekciğinin genelde belirgin olduğu izlendi (Şekil 5.1 D, G). Oositi çevreleyen granülosa hücreleri ile oosit arasındaki temasın devam ettiği, granülosa hücrelerinin çekirdeklerinin piknotik olmadığı, komşu granülosa hücreleri ile temasın devam ettiği gözlemlendi. Folliküllerin bazal membranlarının bütünlüğünü koruduğu, granülosa hücrelerinin normal morfolojiye sahip olduğu ve oosit zona pellusidası (ZP) ile temasını devam ettirdiği gözlemlendi (Şekil 5.1 B-I).

Kontrol grubu dokularında sağlıklı folliküllerin yanında bazı folliküllerde atrezi de izlendi. Atretik folliküllerde, oosit sitoplazmasının asidofilik olduğu, çekirdeklerinde kromatin yoğunlaşmasının olduğu, zona pellusidanın düzenli seyretmediği (Şekil 5.1 D, H, I) ve piknotik granülosa hücrelerinin varlığı izlendi (Şekil 5.1 C, D).





**Şekil 5. 1:** Kontrol grubu ovaryal dokularda (A-I), farklı gelişim aşamalarında izlenen follüküller (A-G), atretik (turuncu yıldız) follüküller (D, H, I), ovaryal stromada (sarı ok) ve follüküllerin granüloza hücrelerinde (turuncu ok) izlenen piknotik çekirdekli hücreler (D, F, I).Korpus luteum (KL), primordiyal follükül (PdF), primer follükül (PF), sekonder follükül (SF) antral follükü (AF), oosit (O),

Boyama: H+E

### **5.1.2. Vitrifikasyon Yöntemiyle Dondurulup-Çözölmüş Çalışma Grubu (Grup II) Bulguları**

Dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularında, primordiyal, primer, sekonder ve antral follüköllerin vitrifikasyon sonrasında korundukları ve morfolojilerinin iyi olduğu izlendi (Şekil 5.2 A-D). Oosit sitoplazma ve çekirdeklerinin normal olduğu, oositle granuloza hücre tabakası arasındaki birlikteliğin devam ettiği gözlemlendi (Şekil 5.2 D-K). Bu açıdan kontrol dokusuna benzer özellikler göstermesine rağmen dondurma işlemi hasarı nedeniyle medullar stromada düzensiz boşluklar veya ödematöz alanlar izlenirken (Şekil 5.2 B, J, M), follüköllerin granülosa hücrelerinde (Şekil 5.2 F, H, J) ve stroma içerisinde (Şekil 5.2 F, G, I, J) kontrol dokusuyla benzer şekilde, zaman zaman koyu çekirdekli apoptoza giden ya da göç eden hücrelerin yoğunlaştığı alanlar göröldü.

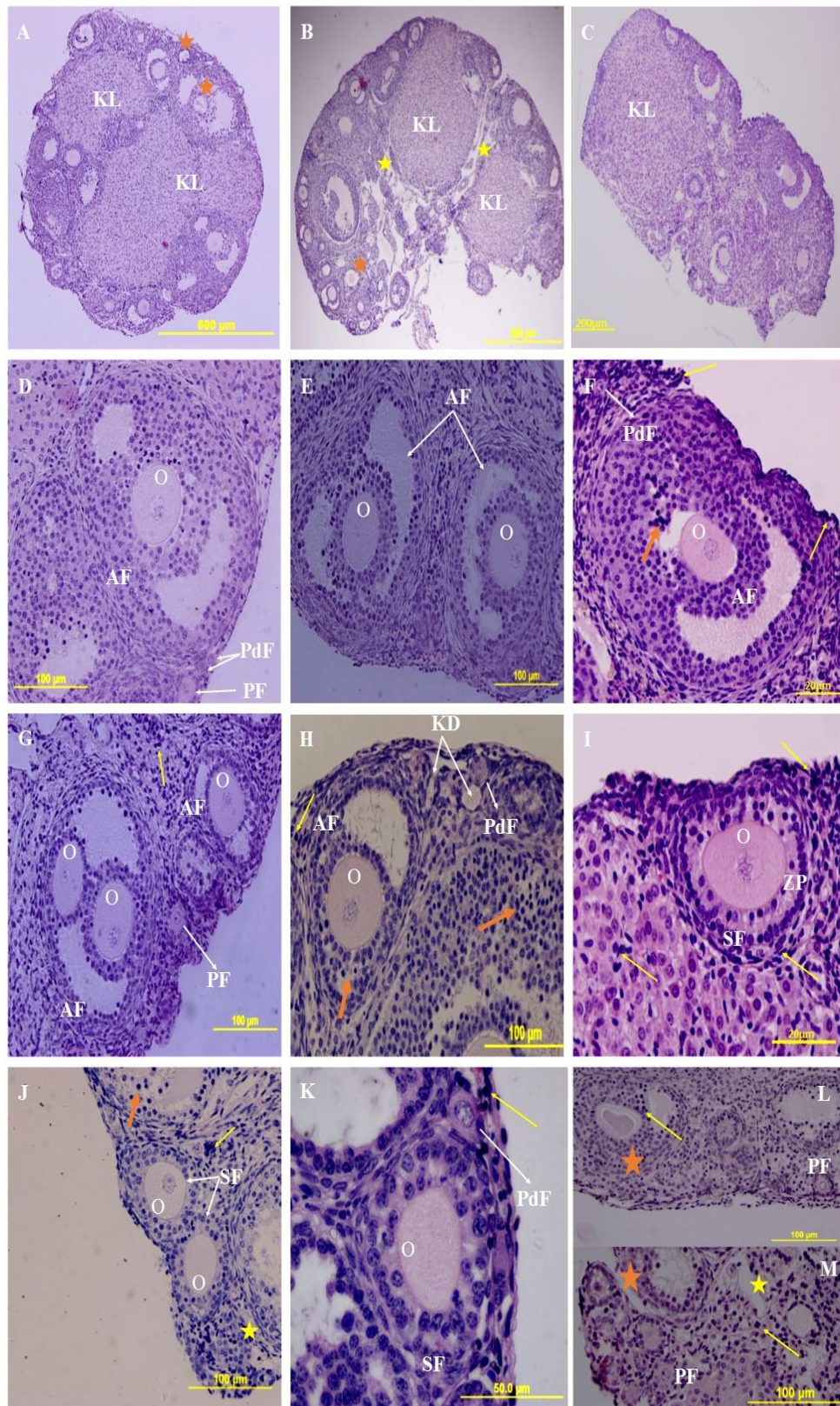
Diğer taraftan, morfolojik olarak normal follüköllerin yanında atretik follüköllere de rastlandı (Şekil 5. A, B, L, M). Follüköllerde gözlenen atrezi kontrol dokularında görölen atreziye benzer şekilde, oosit sitoplazmalarının asidofilik olduğu, çekirdeklerinde kromatin yoğunlaşmasının olduğu, zona pellusidanın düzenli seyretmediği ve granüloza tabakasında bol miktarda piknotik çekirdekli hücrelerin varlığı dikkat çekiciydi (Şekil 5.2 L, M).

**Şekil 5.2.** Grup II ovaryum doku kesitleri.

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan ovaryum dokularında (A-C), morfolojik olarak normal farklı gelişim aşamalarında izlenen folliküller (D-K), morfolojik olarak kontrol dokusuna benzer atretik (turuncu yıldız) folliküller (A, B, L, M), stroma içerisinde izlenen boşluk ve ödematöz (sarı yıldız) alanlar (B, J, M), ovaryum stromasında (sarı ok) ve folliküllerin granüloza hücrelerinde (turuncu ok) izlenen piknotik çekirdekli hücreler (F, H, J). Korpus luteum (KL), primordiyal follikül (PdF), primer follikül (PF), sekonder follikül (SF), antral follikül (AF), oosit (O), zona pellusida (ZP).

Boyama: H+E





### **5.1.3 Heterotopik Transplantasyon Yöntemi ile Ovaryum Restorasyonunun Işık Mikroskopik Bulguları**

Dondurulup çözülmüş ovaryum dokularında, follüküllerin canlılığı ışık mikroskopik yöntemlerle morfolojik olarak değerlendirilmesinin yanısıra, dondurulup-çözülmüş dokuların aynı hayvanlara transplantasyonu yoluyla da değerlendirildi. Grup III' e ait ovaryum doku parçalarının çözüldükten sonra heterotopik ototransplantasyonları yapıldı (Şekil 5.3 E, F). Vitrifikasyon yönteminin follüküler havuz üzerindeki negatif etkisini belirleyebilmek amacıyla farelerin diğer overleri sham grup olarak alıcı hayvanların diğer böbrek kapsülü altına eş zamanlı transplante edildi (Şekil C, D). Transplantasyondan 17 gün sonra ovaryum dokuları böbrek kapsülü altında geniş hacimleriyle kolaylıkla izlendi (Şekil 5.3).

#### **5.1.3.1. Vitrikiye Edilen Ovaryum Dokularının Heterotopik Transplantasyonu Çalışma Grubu (Grup III) ve Sham Grubu Bulguları**

Trasplantasyonun ardından, ovaryum dokularında yapılan histolojik incelemede follüküllerin normal gelişimi gerek grup III ve gerekse sham gruplarında izlenmiştir (Şekil 5.4 ve Şekil 5.5). Grup III ve sham gruplarında, ovaryum dokularında farklı gelişim aşamalarındaki follüküllerin ve gelişen sekonder ve antral follüküllerin sayısı Çizelge 5.2' de gösterildi.

Grup III' e ait ovaryum doku kesitlerinde, yapılan histolojik değerlendirmede, oosit çekirdeğinin iri ve ökromatin yapıda, granülosa hücrelerinin birbirleriyle ve oositle arasındaki bütünlüğünün devam ettiği, follüküllerin bazal membran bütünlüklerinin bozulmamış oldukları izlendi (Şekil 5.4 C-F). Normal morfolojide tek katlı yassı epitel hücreleriyle çevrili primordiyal follüküller (Şekil 5.4 E, F) ve tek katlı kübik epitelle çevrili primer follüküller (Şekil 5.4 D, E), iki veya daha fazla sayıda granülosa hücreleri ile çevrili sekonder follüküller (Şekil 5.4 B, C, F) ve boşluklu antral follüküller (Şekil 5.4 B-D) gözlemlendi. Yapılan histolojik incelemede, sağlam follüküller yanında az sayıda atretik follüküllere de rastlandı.

Kullandığımız vitrifikasyon yönteminin follüküler havuz üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla grup III için kontrol olarak kullanılan sham grupta follüküllerin

canlılık oranlarının daha yüksek olduğu, (Çizelge 5.3) ancak morfolojik olarak grup III' le benzerlik gösterdiği gözlemlendi (Şekil 5.5). Sham grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde, tek katlı yassı epitel hücreleriyle çevrili primordiyal folliküller (Şekil 5.5 D, F), tek katlı kübik epitelle çevrili primer folliküller (Şekil 5.5 C, D), iki veya daha fazla sayıda granüloza hücre tabakası ile çevrili sekonder folliküller (Şekil 5.5 B) ve antral folliküller (Şekil 5.5 B-F) normal yapıda tanımlandı.

Ovaryum dokularının böbrek kapsülü altına transplantasyonu sonrasında böbrek kapsülü altında ve böbrekle komşu alanlarda kan damarlarının yoğunlaştıkları, (Şekil 5.4 C-F ve Şekil 5.5 B-E) ovaryum stromasında ve granüloza hücre tabakasında piknotik çekirdekli hücrelerin varlığı dikkat çekiciydi (Şekil 5.4 E, F ve Şekil 5.5 C, E).

**Şekil 5.3** Grup III ve Sham Grubuna ait ovaryum dokularının heterotopik transplantasyonu.

Sarı yıldız; 27 ga iğne ile açılan böbrek kapsülü.

Anestezi altındaki deneğin heterotopik transplantasyon için hazırlanması (A).

Dondurulup çözülmüş ovaryum dokusunun anestezi altında aynı fareye nakli (B).

Sham grubuna ait böbrek kapsülü altına transplante edilmiş ovaryum dokusu.

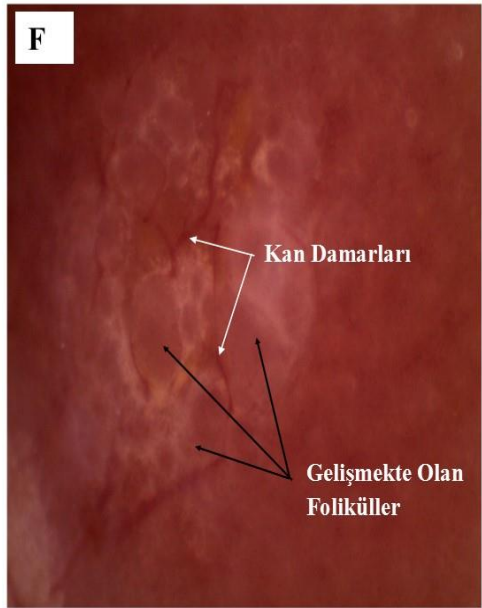
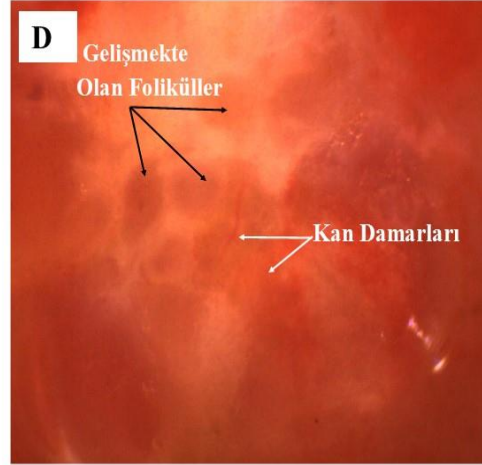
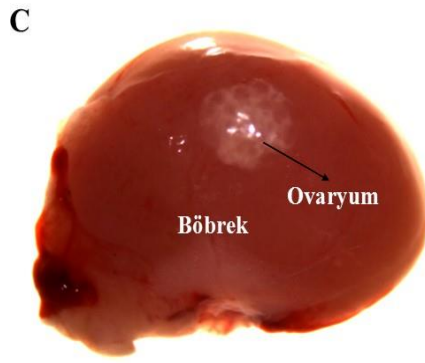
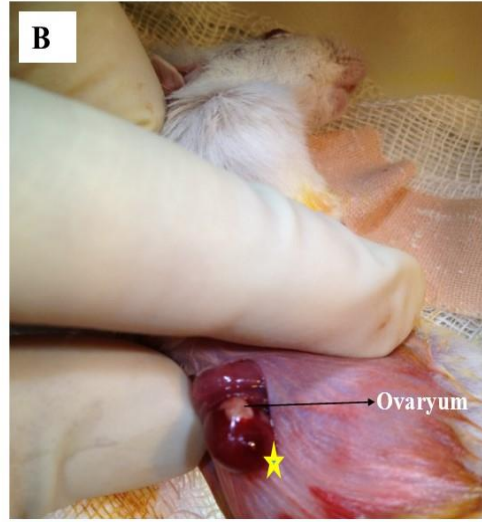
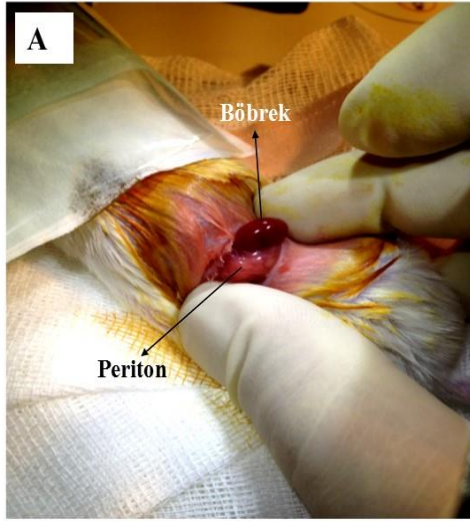
Transplantasyonun ardından 17. gün (C, D).

Grup III'e ait ovaryum dokusunun böbrek kapsülü altına transplante edilmiş ovaryum dokusu. Transplantasyonun ardından 17. gün (E, F).

C, E 16X

D, F 35 X



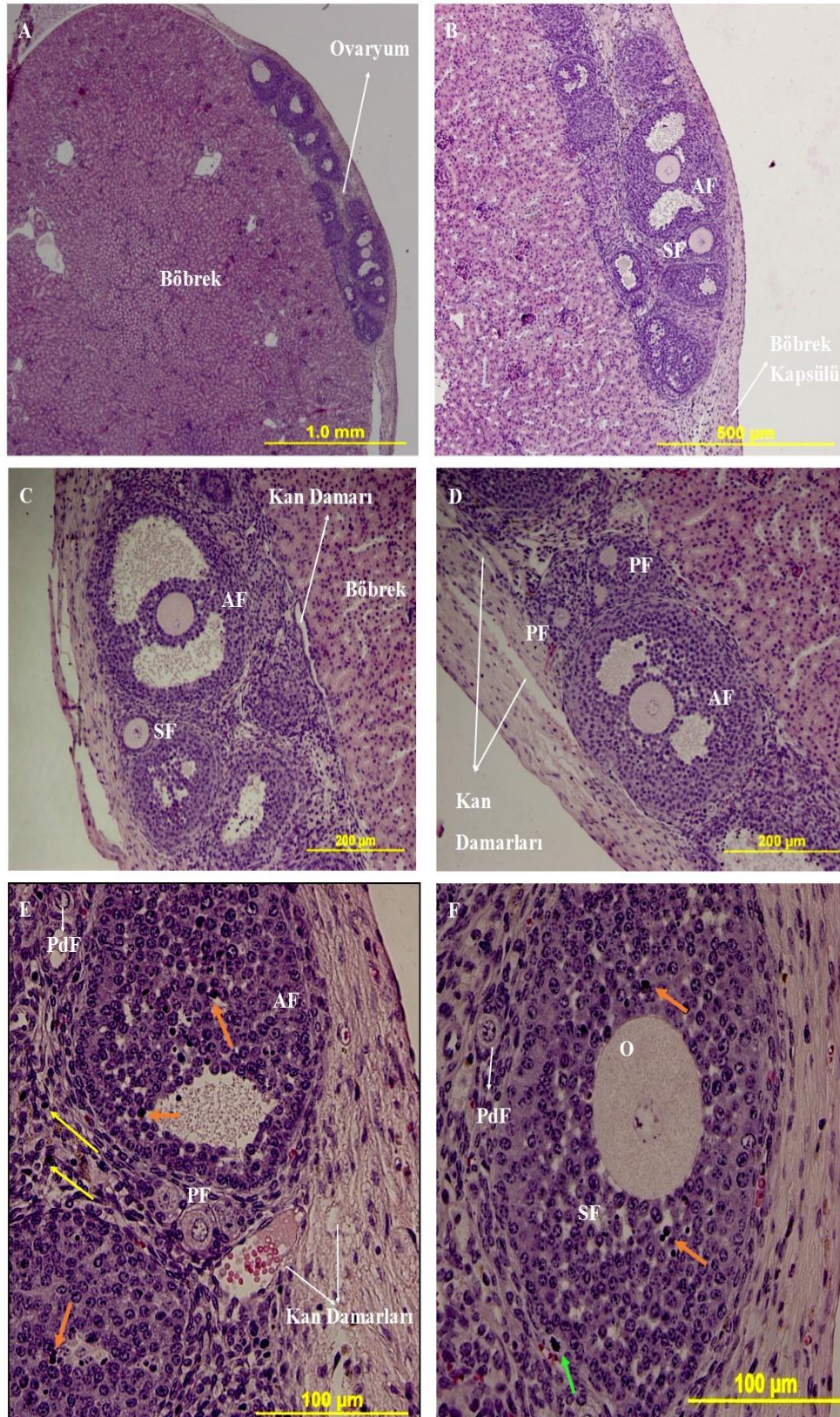




**Şekil 5.4.** Grup III' e ait ovaryum doku kesitleri.

Böbrek kapsülü altına transplante edilen vitrifiye ovaryum dokularında (A, B), normal morfolojiye sahip farklı gelişim aşamalarında izlenen follüküller (C-F), follüküllerin granülosa hücreleriyle (turuncu ok) ve stromal alanlarda (sarı ok) izlenen piknotik çekirdekli hücreler (E, F) gözlenmektedir. Primordiyal follükül (PdF), primer follükül (PF), sekonder follükül (SF), antral follükül (AF), oosit (O), mitoz geçiren granülosa hücresi (Yeşil ok).

Boyama: H+E.

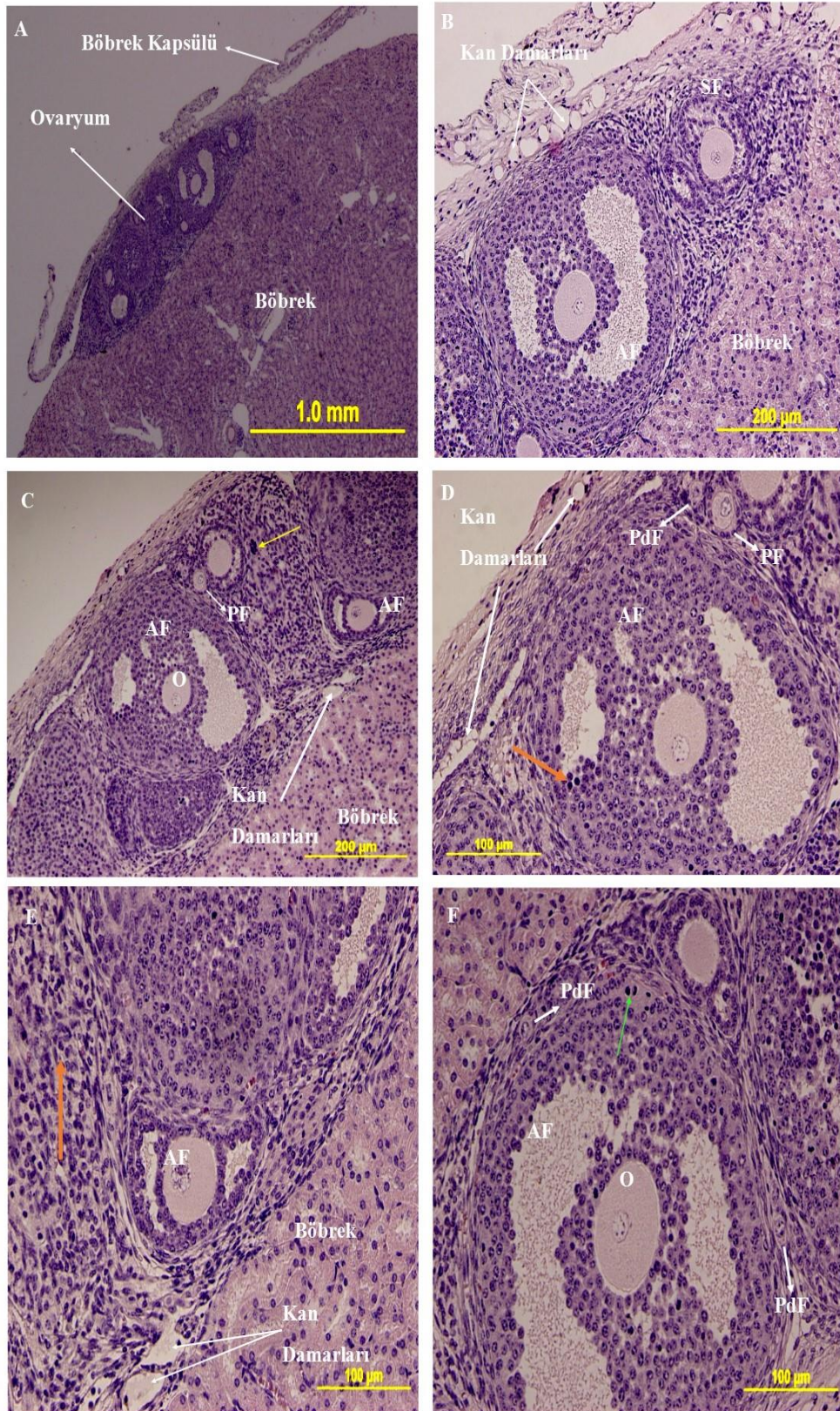


**Şekil 5.5.** Sham grubuna ait ovaryum doku kesitleri.

Böbrek kapsülü altına transplante edilen taze ovaryum dokularında (A), normal morfolojiye sahip farklı gelişim aşamalarında izlenen folliküller (B- F), folliküllerin granülosa hücrelerinde (turuncu ok) ve stromal alanlarda (sarı ok) izlenen piknotik çekirdekli hücreler (D, F) gözlenmektedir. Primordiyal follikül (PdF), primer follikül (PF), sekonder follikül (SF), antral follikül (AF), oosit (O), mitoz geçiren granülosa hücresi (Yeşil ok).

Boyama: H+E.





## 5. 2. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Kontrol ve grup II çalışma gruplarında primordiyal, primer, sekonder ve antral folliküllerin sağ kalım oranlarını belirlemek için hem sağlam hem de atretik folliküller sayıldı. Tersiyer folliküller çalışmaya dahil edilmedi. Sayılan sağlam ve atretik folliküller Ki-kare testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Çizelge 5.1). Kontrol grubunda %98,2 oranında, vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuş grupta %97,4 oranında sağlam primordiyal folliküllere rastlandı. Primer folliküller kontrol ve deney gruplarında değerlendirildiğinde kontrol grubunda %96,8, deney grubunda ise %94,7 oranında sağlam folliküllere rastlandı. Sekonder folliküllerin ise kontrol ve deney grubunda sırasıyla %95,9 ve %89,5 oranında sağlam folliküllere sahip oldukları izlendi. Sağlam antral folliküllerin ise kontrol ve deney gruplarında sırasıyla %95,6 ve %77,1 oranında oldukları tespit edildi. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda primordiyal ve primer folliküllerin sağkalım oranları açısından kontrol ve grup II arasında anlamlı bir fark ( $p>0,05$ ) izlenmedi (Çizelge5.1). Sekonder ve antral folliküllerde ise kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) fark saptandı (Çizelge 5.1).

**Çizelge 5.1.** Kontrol ve grup II ovaryum dokularında sayılan follüküllerin sayısı, yüzde ve Ki-kare testine göre istatistiksel sonuçları.

Follüküller	Gruplar	Sayı/%	Durum		Toplam	Sonuç
			Sağlam	Atretik		
Primordiyal	Grup I	S	1847	33	1880	X <sup>2</sup> =3,61 p=0,060 <b>p&gt;0,05</b>
		%	98,2	1,8	100,0	
	Grup II	S	1824	50	1874	
		%	97,3	2,7	100,0	
	Toplam	S	3671	83	3754	
		%	97,8	2,2	100,0	
Primer	Grup I	S	644	21	665	X <sup>2</sup> =3,69 p=0,055 <b>p&gt;0,05</b>
		%	96,8	3,2	100,0	
	Grup II	S	648	36	684	
		%	94,7	5,3	100,0	
	Toplam	S	1292	57	1349	
		%	95,8	4,2	100,0	
Sekonder	Grup I	S	236	10	246	X <sup>2</sup> =20,97 p=0,001* <b>p&lt;0,05</b>
		%	95,9	4,1	100,0	
	Grup II	S	217	43	260	
		%	83,5	16,5	100,0	
	Toplam	S	453	53	506	
		%	89,5	10,5	100,0	
Antral	Grup I	S	195	9	204	X <sup>2</sup> =29,21 p=0,001* <b>p&lt;0,05</b>
		%	95,6	4,4	100,0	
	Grup II	S	148	44	192	
		%	77,1	22,9	100,0	
	Toplam	S	343	53	396	
		%	86,6	13,4	100,0	

X<sup>2</sup>: Ki-Kare değeri. \* p<0,05 önemli

Ovaryum dokusunun restorasyonunu belirlemek amacıyla, grup III ve hiçbir işlem görmeden taze heterotopik transplantasyonu yapılan (sham) dokular transplantasyonun ardından 17. günde çıkarıldı. Elde edilen ovaryum dokularında sağlam primordiyal, primer, sekonder ve antral folliküller sayıldı. Tersiyer folliküller çalışmaya dahil edilmedi. Sayılan sağlam folliküller grup I' in sayılan sağlam follikülleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Çizelge 5.2).

Canlı primordiyal folliküller açısından gruplar karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında grup I - sham grubu ve grup I - grup III arasındaki farklılık önemli bulunurken ( $p<0,05$ ), sham grubu - grup III arasındaki primordiyal folliküllerin korunması açısından farklılık önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Canlı primer follikül açısından gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında bütün gruplar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Canlı sekonder follikül açısından gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farklılık önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Canlı antral follikül açısından gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında bütün gruplar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

**Çizelge 5.2.** Grup I, hiçbir işlem görmeden taze heterotopik transplantasyonu yapılan doku (Sham) ve grup III'te sayılan canlı folliküllerin follikül tipine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması.

<b>Follikül</b>	<b>Grup (sayı)</b>	<b>Toplam Canlı Follikül</b>	<b>Ortalama Follikül</b>	<b>Standart Sapma</b>	<b>Sonuç</b>
<b>Primordiyal</b>	Grup I (5)	1847	369,40	20,57	F=71,84
	Sham (5)	1399	279,80	10,82	P=0,001*
	Grup III (5)	1282	256,40	12,77	
<b>Primer</b>	Grup I (5)	644	128,80	13,47	F=26,01
	Sham (5)	530	106,00	5,56	P=0,001*
	Grup III (5)	448	89,60	3,28	
<b>Sekonder</b>	Grup I (5)	236	47,20	8,31	F=2,85
	Sham (5)	223	44,60	6,50	P=0,097
	Grup III (5)	184	36,80	6,53	
<b>Antral</b>	Grup I (5)	195	39,00	3,31	F=67,93
	Sham (5)	131	26,20	1,92	P=0,001*
	Grup III (5)	102	20,40	2,30	

\* p<0,05 önemli



Sham ve grup III' te sayılan toplam canlı follikül sayısı grup I' de sayılan toplam canlı follikül sayısı ile Çizelge 5.3' de karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel fark önemsiz bulundu ( $p>0,05$ ). Hiçbir işlem görmeden transplante edilen ovaryum dokusunda (sham) %79,5, dondurulup çözüldükten sonra transplante edilen ovaryum dokusunda (grup III) %69,3 oranında canlı folliküle sahip oldukları tespit edildi.

**Çizelge 5.3.** Grup I, hiçbir işlem görmeden taze heterotopik transplantasyonu yapılan doku (Sham) ve grup III'te toplam canlı folliküllerin istatistiksel analizi.

Gruplar (Sayı)		Ortalama	Standart Sapma	8-10 haftalık fare Toplam Follikül %	Sonuç
Grup I (5)		145,40			
	Min-max	36-399	136,41	100	
Sham (5)		114,15			
	Min-max	24-293	102,89	78,5	KW=3,87 P=0,144
Grup III (5)		100,80			
	Min-max	18-274	96,07	69,3	

KW: Kruskal Wallis değeri \*  $p<0,05$  önemli

### 5. 3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Grup I, grup II ve grup III dokularındaki, Ephrin B1, Pdgf- $\alpha$ , Gdf-9, Ve-kaderin ve Pecam-1'in immünolokalizasyonları semi-kantitatif skorlama yöntemi yardımıyla belirlenerek sırasıyla Çizelge 5.4, Çizelge 5.5, Çizelge 5.6, Çizelge 5.7 ve Çizelge 5.8'te verilmiştir.

#### 5.3.1. Kontrol ve Deney Gruplarında Ephrin B1 Bulguları

##### 5.3.1.1 Kontrol Grubu Ephrin B1 Bulguları

Kontrol grubu dokularında, Ephrin B1 immünolokalizasyonu (Şekil 5.6 A-O)'da verilmiştir. Ephrin B1 proteini genel olarak kortekste gelişmekte olan folliküllerin granülosa hücreleri (Şekil 5.6 B, E, G, M), teka interna ve eksterna hücre sitoplazmaları (Şekil 5.6 B, E, H) ve primer oositlerinde (Şekil 5.6 B, E, G, H, J, L, N) eksprese edildiği gözlemlendi. Ovaryum dokusunun korteks ve medulla bölgelerinde dağılım gösteren kan damarlarında (Şekil 5.6 E, G, H, J) ve korpus luteum içindeki kan damarlarında ekspresyonu izlendi (Şekil 5.6 D, G). Ephrin B1 proteini aynı zamanda epitel hücrelerinin sitoplazmalarında da (Şekil 5.6 G, H, M) güçlü boyanması ile dikkat çekiciydi.

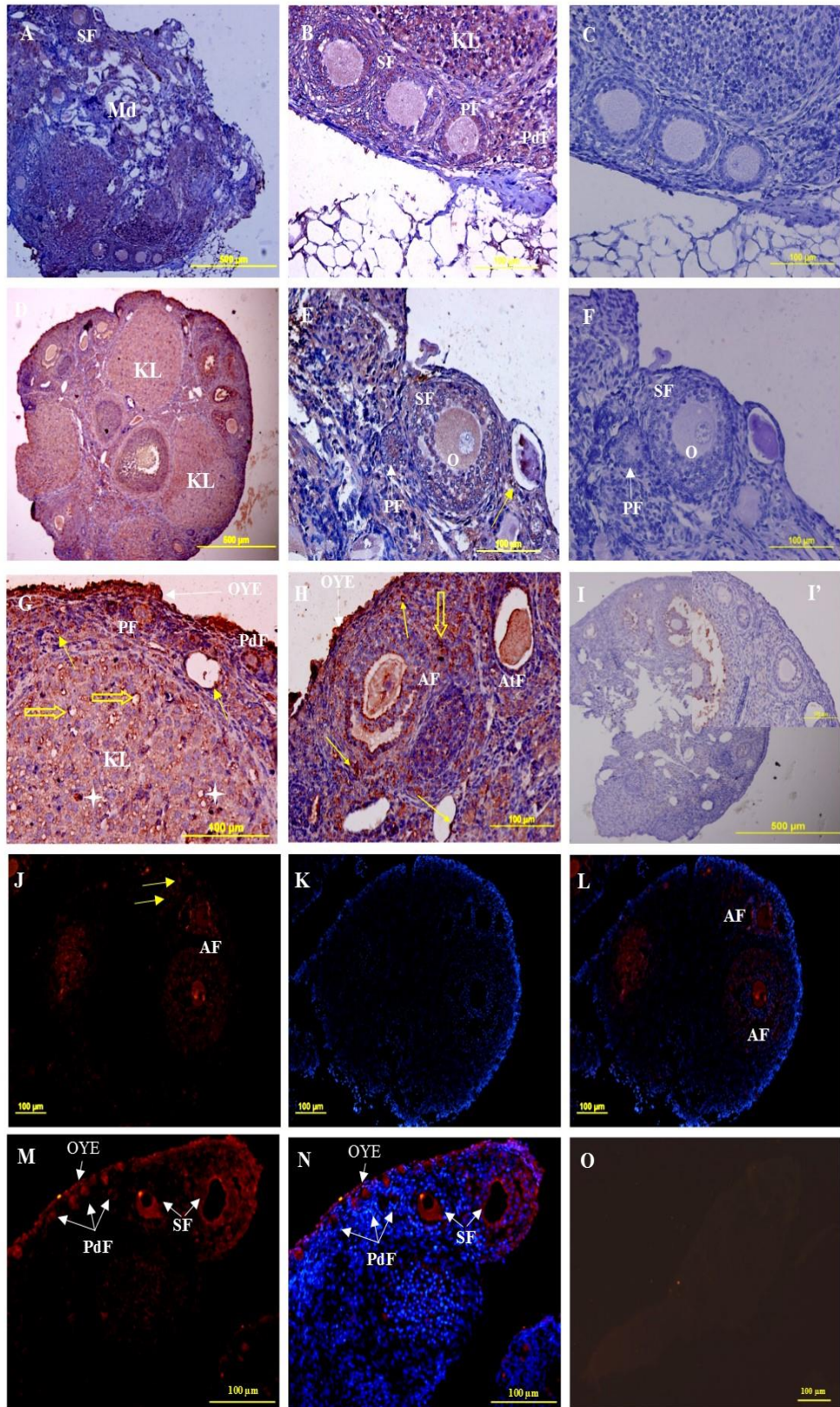
Ephrin B1 ekspresyonu, primordiyal folliküllerin epitel hücrelerinde zayıf, primer oositlerinde orta şiddette boyandığı gözlemlendi. Ancak Ephrin B1 proteininin, primordiyal folliküllerin dışındaki tüm folliküllerin granülosa hücrelerinde (Şekil 5.6 B, E, G, H, L, N) ve primer oositlerinde (Şekil 5.6 B, D, E, G, H, J, L, M, N) orta şiddette, teka interna tabakasında zayıf, teka eksterna tabakasında orta ve bu alandaki kan damarlarında daha güçlü eksprese edildiği belirlendi (Şekil 5.6 B, E, H).

**Şekil 5.6.** Kontrol grubu ovaryum doku kesitlerinde Ephrin B1 immünolokalizasyonu.

Kontrol grubu ovaryum dokularında (A, D, J, K), negatif kontrol (C, F, I, I', O), farklı gelişim aşamalarındaki follüküllerde izlenen Ephrin B1 (B, E, G, H, M, N), teka tabakalarında (sarı yıldız) izlenen Ephrin B1 (B, E, H), stroma içinde dağılım gösteren kan damarlarında (sarı ok) izlenen Ephrin B1 (E, G, H, J), korpus luteum içindeki kan damarlarında (içi boş sarı ok) ve KL hücrelerinde (beyaz yıldız) izlenen Ephrin B1 (G) ekspresyonları. Medulla (Md), primordiyal follükül (PdF), primer follükül (PF), sekonder follükül (SF), antral follükül (AF), oosit (O), korpus luteum (KL), atretik follükül (AtF), ovaryum epiteli (OYE)

Kromojen; AEC, zıt boyama; Hematoksilen (A, B, D, E, G, H)

Mavi; DAPI, kırmızı; CY3 (J, K, L, M, N)



### 5.3.1.2. Grup II Ephrin B1 Bulguları

Bu grupta, Ephrin B1 proteini genel olarak, folliküllerin granülosa hücre sitoplazmalarında (Şekil 5.7 A-H), primer oositlerinde (Şekil 5.7 D, E, G, H, N), teka interna ve eksterna tabakalarında (Şekil 5.7 H, N) ekspresyonu izlendi. Ovaryum dokusunun korteks ve medulla bölgelerinde dağılım gösteren kan damarlarında da (Şekil 5.7 D, E) lokalizasyonu izlenen Ephrin B1' in aynı zamanda ovaryum yüzey epitelinde de (Şekil 5.7 E, L) güçlü boyanması dikkat çekiciydi.

Diğer taraftan bu boyanma, tüm folliküllerin granülosa hücrelerinde (Şekil 5.7 D, G, H, M) ve primer oositlerinde (Şekil 5.7 D, E, G, H, L, N) kontrol grubundan farklı olarak yoğun şekilde izlendi. Kontrol grubuna benzer şekilde; teka interna tabakasında zayıf, teka eksterna tabakasında orta şiddette, bu alanda bulunan kan damarlarında ise yoğun boyanma izlendi (Şekil 5.7. H, M, N).

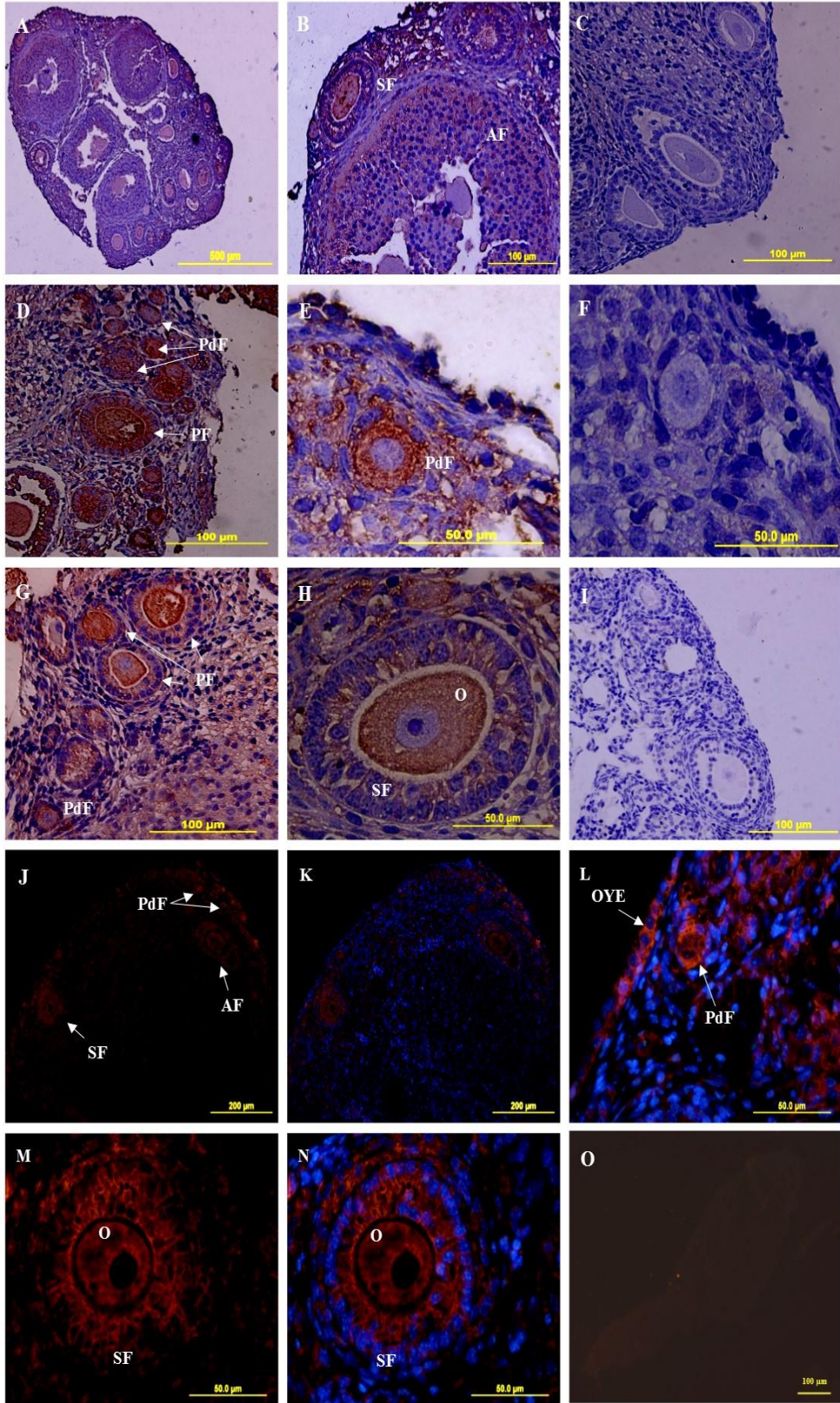
**Şekil 5.7.** Grup II ovaryum doku kesitlerinde Ephrin B1 immünolokalizasyonu.

Grup II ovaryum dokularında (A, J, K), negatif kontrol (C, F, I, O), farklı gelişim aşamalarındaki follüküllerde izlenen Ephrin B1 (B, D, G, H, K, L, M, N), teka tabakalarında (sarı yıldız) izlenen Ephrin B1 (H, M, N), stroma içinde dağılım gösteren kan damarlarında (sarı ok) izlenen Ephrin B1 (E) ve epitel hücre sitoplazmasında izlenen Ephrin B1 (L) ekspresyonu. Primordiyal follükül (PdF), primer follükül (PF), sekonder follükül (SF), antral follükül (AF), oosit (O), ovaryum epiteli (OYE).

Kromojen; AEC, zıt boyama; Hematoksilen (A, B, D, E, G, H)

Mavi; DAPI, kırmızı; CY3 (J, K, L, M, N)





### 5.3.1.3. Grup III Ephrin B1 Bulguları

Bu grupta Ephrin B1 immünolokalizasyonu (Şekil 5.8 A-E, F-kontrol kesit, G-N, O-kontrol kesit) izlendi. Genel olarak Ephrin B1, folliküllerin granülosa hücre tabakasında (Şekil 5.8 B, C, G, I, N), primer oositlerinde (Şekil 5.8 A-G, M), teka interna ve eksterna tabakalarında (Şekil 5.8 C, N) ekspresyonu izlendi. Özellikle böbrek kapsülü altındaki kan damarlarında (Şekil 5.8 D, E), böbrekle komşu alanlarda dağılım gösteren kan damarlarında (Şekil 5.8 B, G, L) ve follikülleri çevreleyen kan damarlarında (Şekil 5.8 A, G, H, J), Ephrin B1 proteininin immünolokalizasyonu izlendi (Şekil 5.2.1.3 D, E, J).

Ephrin B1 immünolokalizasyonu, kontrol grubuna benzer, ancak grup II'den farklı olarak folliküllerin granülosa hücre tabakasında (Şekil 5.8 C, G, I, N) orta şiddette boyanma izlenirken, primer oositlerin (Şekil 5.8 B, C, G, N) ise çok zayıf şiddette boyandığı izlendi. Ancak sekonder ve antral folliküllerin primer oositlerinde şaşırtıcı şekilde oositin zona pellusidasında güçlü bir immünolokalizasyon olduğu görüldü (Şekil 5.8 B, G, I, L, N). Teka interna ve eksterna tabakalarında ise zayıf şiddette Ephrin B1 ekspresyonu izlendi (Şekil 5.8 C, G, N). Ovaryum dokusunda folliküllerin çevresinde dağılım gösteren kan damarlarında (Şekil 5.8 A, G, H, J), böbrekle komşu alanlarda dağılım gösteren kan damarlarında (Şekil 5.8 B, G, L) ve böbrek kapsülü altında dağılım gösteren kan damarlarında (Şekil 5.8 D, E) Ephrin B1 ekspresyonunun yoğun şiddette olduğu izlendi.

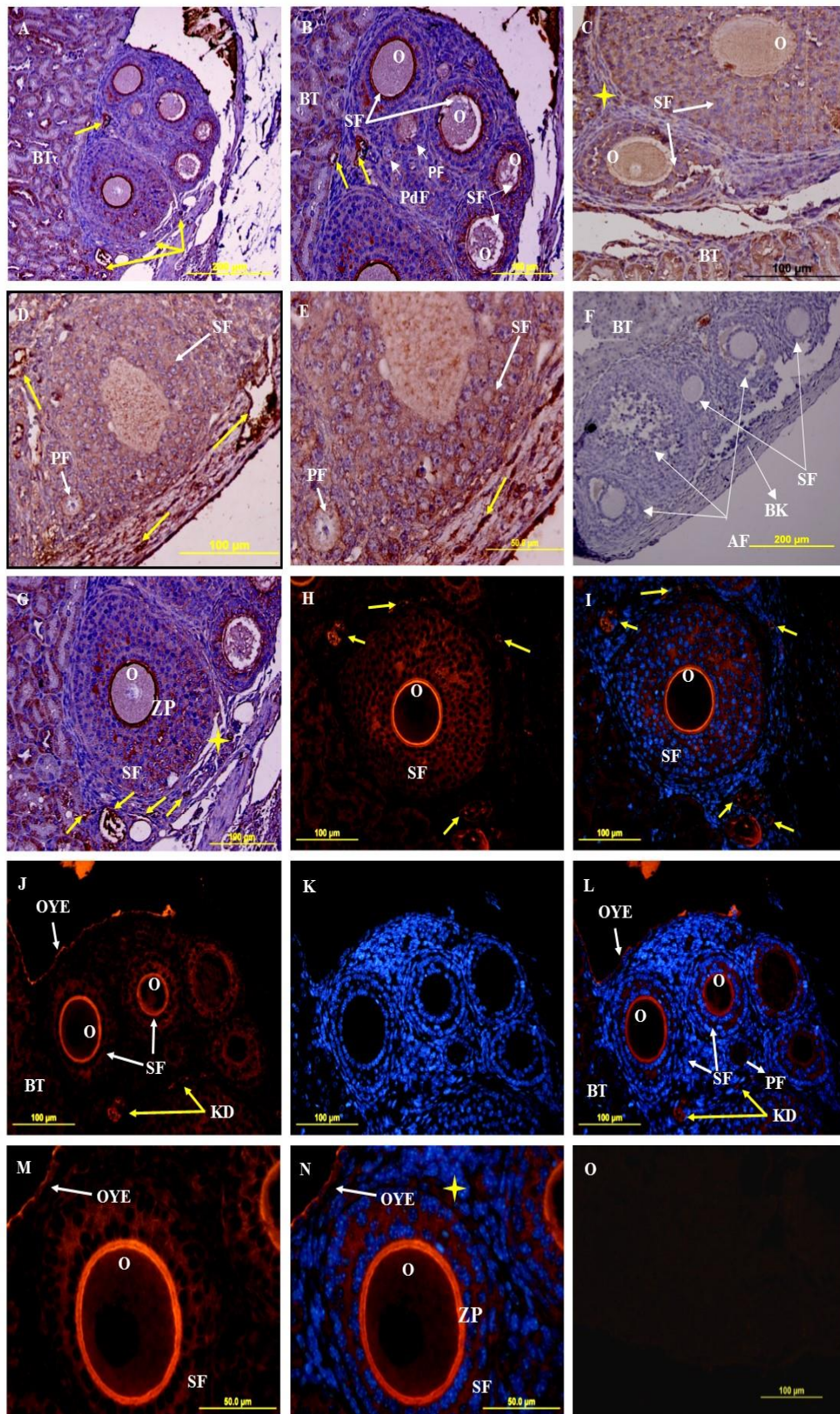


**Şekil 5.8.** Grup III ovaryum doku kesitlerinde Ephrin B1 immünolokalizasyonu.

Grup III ovaryum dokularında (A-E, F-negatif kontrol, G-N, O- negatif kontrol), farklı gelişim aşamalarındaki folliküllerde izlenen Ephrin B1 (A-E, H, M), teka tabakalarında (sarı yıldız) izlenen Ephrin B1 (C, G, N), folliküller çevresinde dağılım gösteren kan damarlarında (sarı ok) izlenen Ephrin B1 (A, G, I), böbrekle komşu alanlarda dağılım gösteren kan damarlarında (sarı ok) izlenen Ephrin B1 (B, H, J), böbrek kapsülü altında dağılım gösteren kan damarlarında ve hücrelerde izlenen (sarı ok) Ephrin B1 (D, E) ekspresyonu. Primordiyal follikül (PdF), primer follikül (PF), sekonder follikül (SF), antral follikül (AF), oosit (O), zona pellusida (ZP), ovaryum epiteli (OYE), böbrek tübüleri (BT).

Kromojen; AEC, zıt boyama; Hematoksilen (A, B, D, E, G)

Mavi; DAPI, kırmızı; CY3 (H, I, J, K, L, M, N)



Çizelge 5.4. Kontrol ve çalışma gruplarında Ephrin B1 ekspresyonları.

	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>
<b>Epitel</b>	+++	+++	+++
<b>Korteks</b>	+++	+++	+++
<b>Kan Damarları</b>			
<b>Primordiyal Follikül</b>			
Primordiyal Follikül Hücreleri	+	+++	++
Oosit	++	+++	±
<b>Primer Follikül</b>			
Primer Follikül Hücreleri	++	+++	++
Oosit	++	+++	±
<b>Sekonder Follikül</b>			
Granüloza Hücreleri	++	+++	++
Oosit	++	+++	±
Zona Pellucida	-	-	+++
Teka İterna	+	+	+
Teka Eksterna	++	++	+
<b>Antral Follikül</b>			
Granüloza Hücreleri	++	+++	++
Oosit	++	+++	±
Zona Pellucida	-	-	+++
Teka İterna	+	+	+
Teka Eksterna	++	++	+
<b>Böbrek Kapsülü</b>			+++

### 5.3.2. Kontrol ve Deney Gruplarında PDGF- $\alpha$ Bulguları

#### 5.3.2.1 Kontrol Grubu PDGF- $\alpha$ Bulguları

PDGF- $\alpha$  proteininin kontrol grubu dokularında immüno-lokalizasyonu (Şekil 5.9 A-H, (C, F, I- negatif kontrol), J-N, (O-negatif kontrol)) izlendi. PDGF- $\alpha$  proteinin, folliküllerin granülosa hücrelerinin sitoplazmalarında (Şekil 5.9 B, G, H, K, M), primer oositlerinde (Şekil 5.9 B, E, G, H, N), teka interna ve eksterna tabakalarında (Şekil 5.9 B, E, H, N) ve bazı stromal hücre sitoplazmalarında eksprese oldukları izlendi (Şekil 5.9 B, G, H, N). Aynı zamanda ovaryum dokusunun korteks ve medulla bölgelerinde dağılım gösteren kan damarlarında (Şekil 5.9 B, E, H, L) ve epitel hücrelerinin sitoplazmalarında (Şekil 5.9 B, E) eksprese oldukları da izlendi.

Bu grupta, çeşitli gelişim aşamalarındaki primordiyal folliküller dışında tüm folliküllerin granülosa hücrelerinin sitoplazmalarında orta yoğunlukta boyanma izlenirken, primer oositlerin primordiyal ve primer folliküllerde yoğun şiddette, sekonder ve antral folliküllerde ise zayıf boyandığı görüldü (Şekil 5.9 B, E, G, H, L, N). Primordiyal folliküllerin folliküler hücrelerinde zayıf şiddette boyanma izlenirken, immünohistokimya işaretlemeye bazı primordiyal folliküllerin primer oositlerinin çekirdeklerinde güçlü boyanma izlendi. Kontrol grubunda PDGF- $\alpha$  teka interna tabakalarının zayıf ancak teka eksterna tabakalarının ve follikülleri çevreleyen kan damarlarının orta şiddette boyandığı izlendi (Şekil 5.9 B, E, H,). Bazı ovaryum stroma hücrelerinde PDGF- $\alpha$ 'nın yoğun boyandığı görüldü (Şekil 5.9 B, E, G, H, N).

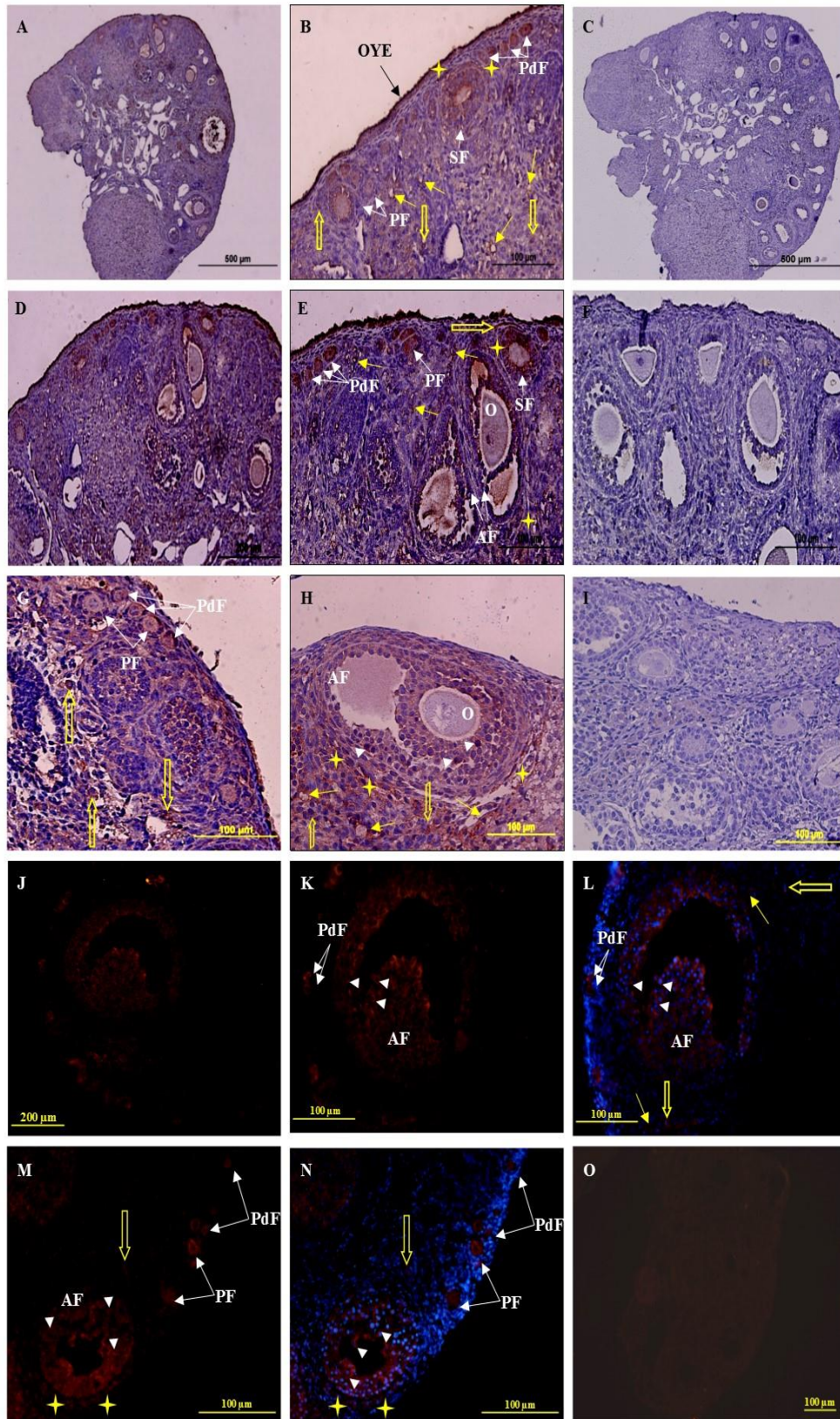
**Şekil 5.9.** Kontrol grubu ovaryum doku kesitlerinde PDGF-  $\alpha$  immünolokalizasyonu.

Kontrol grubu ovaryum dokularında (A-H, (C, F, I- negatif kontrol), J-N, (O-negatif kontrol)) PDGF-  $\alpha$  immünolokalizasyonu. Farklı gelişim aşamalarındaki follüküllerde (B, E, G, H, M, N) ve granülosa hücrelerinde (beyaz ok başı) izlenen PDGF-  $\alpha$  (H, K, M), teka tabakalarında (sarı yıldız) izlenen PDGF-  $\alpha$  (B, E, H, N), stroma içinde dağılım gösteren kan damarlarında (sarı ok) ve hücrelerde (içi boş sarı ok) izlenen PDGF-  $\alpha$  (B, H) ekspresyonu. Primordiyal follükül (PdF), primer follükül (PF), sekonder follükül (SF), antral follükül (AF), oosit (O), ovaryum epiteli (OYE).

Kromojen; AEC, zıt boyama; Hematoksilen (A, B, D, E, G, H).

Mavi; DAPI, kırmızı; CY3 (J, K, L, M, N).





### 5.3.2.2. Grup II PDGF- $\alpha$ Bulguları

PDGF- $\alpha$  proteininin bu grupta immüno lokalizasyonu (Şekil 5.10 A-H, (C, F, I- negatif kontrol) ve J-N, (O-negatif kontrol)) izlendi. PDGF- $\alpha$  proteininin ekspresyonu, folliküllerin granülosa hücrelerinin sitoplazmalarında (Şekil 5.10 B, E, G, L, M), primer oositlerinde (Şekil 5.10 B, D, E, G) ve teka interna ve eksterna tabakalarında (Şekil 5.10 B, G, K, L, M, N) izlendi. Aynı zamanda ovaryum dokusunun korteks ve medulla bölgelerinde dağılım gösteren kan damarları (Şekil 5.10 B, E, H, H', L) ve epitel hücrelerinin sitoplazmalarında da (Şekil 5.10 G, L) PDGF- $\alpha$  ekspresyonu izlendi.

Diğer taraftan PDGF- $\alpha$ , primordiyal folliküller dışında çeşitli gelişim aşamalarındaki tüm folliküllerin granülosa hücrelerinde (Şekil 5.10 B, E, K, L, N) kontrol grubuna benzer şekilde orta yoğunlukta boyanma izlendi. Primordiyal folliküllerin, folliküler hücrelerinde de kontrol grubuna benzer şekilde zayıf şiddette boyanma izlendi. Primer oositlerin, kontrol grubundan farklı şekilde primordiyal ve primer folliküllerde orta şiddette boyandığı izlendi. Ancak sekonder ve antral folliküllerde, primer oositlerin kontrol grubuna benzer şekilde zayıf boyandığı görüldü (Şekil 5.10 B, E, G, N). Teka interna tabakası kontrol grubundan farklı olarak orta şiddette, ancak teka eksterna tabakası ve follikülleri çevreleyen kan damarlarında yoğun şiddette boyanma izlendi (Şekil 5.10 E, G, K, L, M, N). Bazı ovaryum stroma hücrelerinde de (Şekil 5.10 E, G, M) kontrol grubunda olduğu gibi PDGF- $\alpha$ 'nın yoğun boyandığı izlendi.

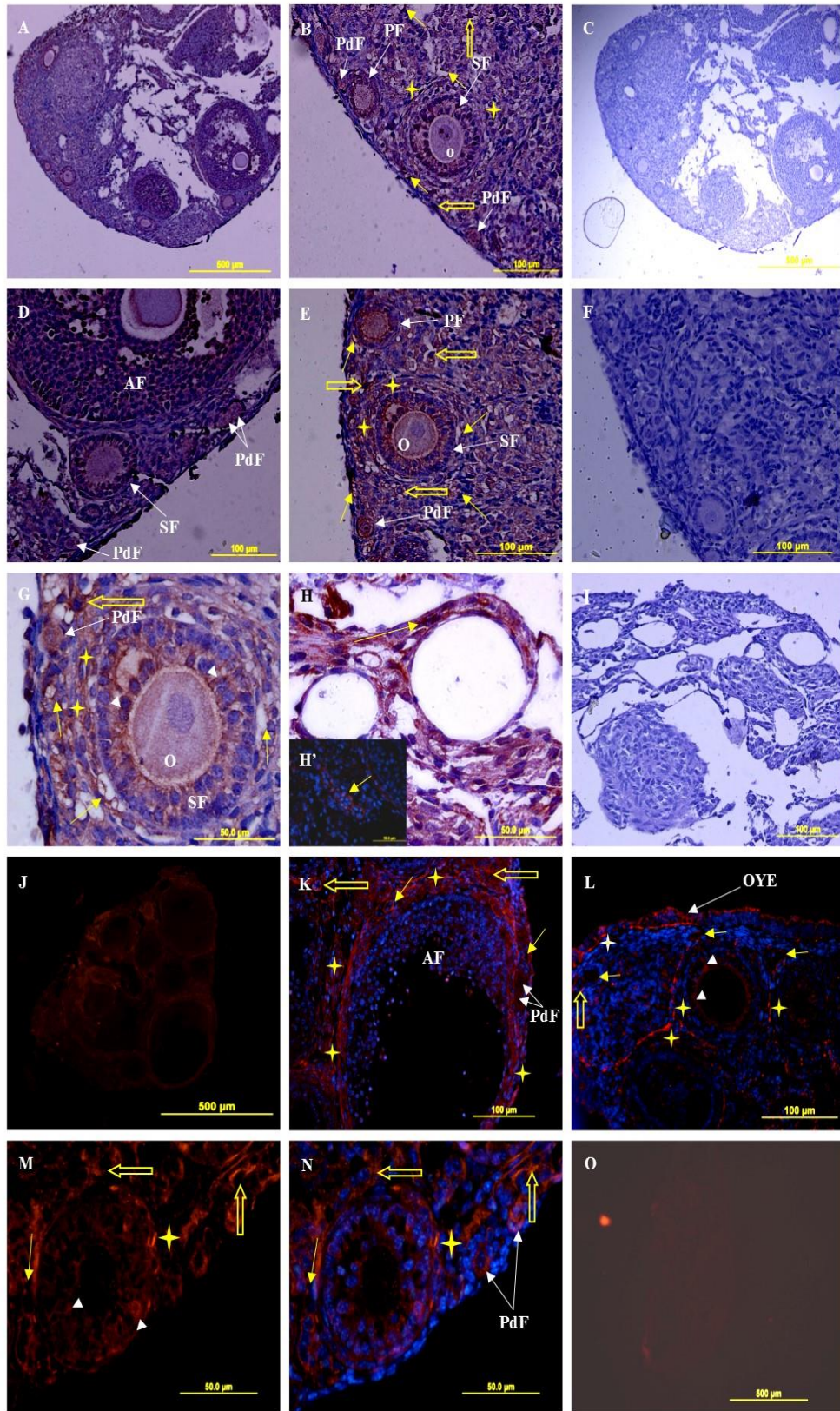
**Şekil 5.10.** Grup II ovaryum doku kesitlerinde PDGF-  $\alpha$  immünolokalizasyonu.

Grup II ovaryum dokularında (A-H, (C, F, I- negatif kontrol), J-N, (O-negatif kontrol)) PDGF-  $\alpha$  immünolokalizasyonu. Farklı gelişim aşamalarındaki folliküllerde (B, D, E, G, L, N) ve granülosa hücrelerinde (beyaz ok başı) izlenen PDGF-  $\alpha$  (G, L, M), teka tabakalarında (sarı yıldız) izlenen PDGF-  $\alpha$  (B, E, G, K, L, M), stroma içinde dağılım gösteren kan damarlarında (sarı ok) (B, E, G, H, H', N) ve hücrelerde (içi boş sarı ok) izlenen PDGF-  $\alpha$  (B, E, G, K, N) ekspresyonu. Primordiyal follikül (PdF), primer follikül (PF), sekonder follikül (SF), antral follikül (AF), oosit (O), ovaryum epiteli (OYE).

Kromojen; AEC, zıt boyama; Hematoksilen (A, B, D, E, G, H).

Mavi; DAPI, kırmızı; CY3 (H', J, K, L, M, N).





### 5.3.2.3. Grup III PDGF- $\alpha$ Bulguları

PDGF- $\alpha$  proteininin bu grupta immünolokalizasyonu Şekil 5.11'de (A-E, -C, F; negatif kontrol- ve G-N, -O; negatif kontrol-) izlendi. PDGF- $\alpha$  proteininin ekspresyonu, folliküllerin granülosa hücrelerinin sitoplazmalarında (Şekil 5.11 B, E, K), primer oositlerinde (Şekil 5.11 B, D), teka interna ve eksterna hücre sitoplazmalarında (Şekil 5.11 B, E, K, N) izlendi. Aynı zamanda, böbrek kapsülü altında ve follikülleri çevreleyen alanlarda dağılım gösteren kan damarlarında (Şekil 5.11 B, D, L, M, N) PDGF- $\alpha$  ekspresyonları izlendi.

PDGF- $\alpha$  ekspresyonlarının boyanma şiddeti incelendiğinde, çeşitli gelişim aşamalarında olan tüm folliküllerin granülosa hücrelerinde kontrol ve grup II bulgularının aksine zayıf boyanma izlendi. Primer oositlerin ise, primordiyal ve primer folliküllerde kontrol ve grup II' den farklı ancak sekonder ve antral folliküllerde benzer şekilde zayıf boyandığı izlendi (Şekil 5.11 B, D, K). Bu grupta teka interna tabakası kontrol grubuna benzer ve grup II' den farklı olarak zayıf ancak teka eksterna tabakasında kontrol grubundan farklı ve grup II' e benzer şekilde yoğun boyandığı izlendi (Şekil 5.11 D, E, I, J, K). Aynı zamanda bazı ovaryum stromal hücrelerinde kontrol grubunda olduğu gibi PDGF- $\alpha$ ' nın yoğun boyandığı görüldü (Şekil 5.11 B, D, E, L). Diğer taraftan, böbrek kapsülü altındaki kan damarlarında (Şekil 5.11 B, E, K, M), follikülleri çevreleyen kan damarlarında (Şekil 5.11 B, D, E, K, L) ve böbrekle komşu alanlardaki kan damarlarında (Şekil 5.11 A, B, L, M, N) PDGF- $\alpha$  proteininin immünolokalizasyonunun dikkat çekici şekilde yoğun olduğu gözlemlendi.

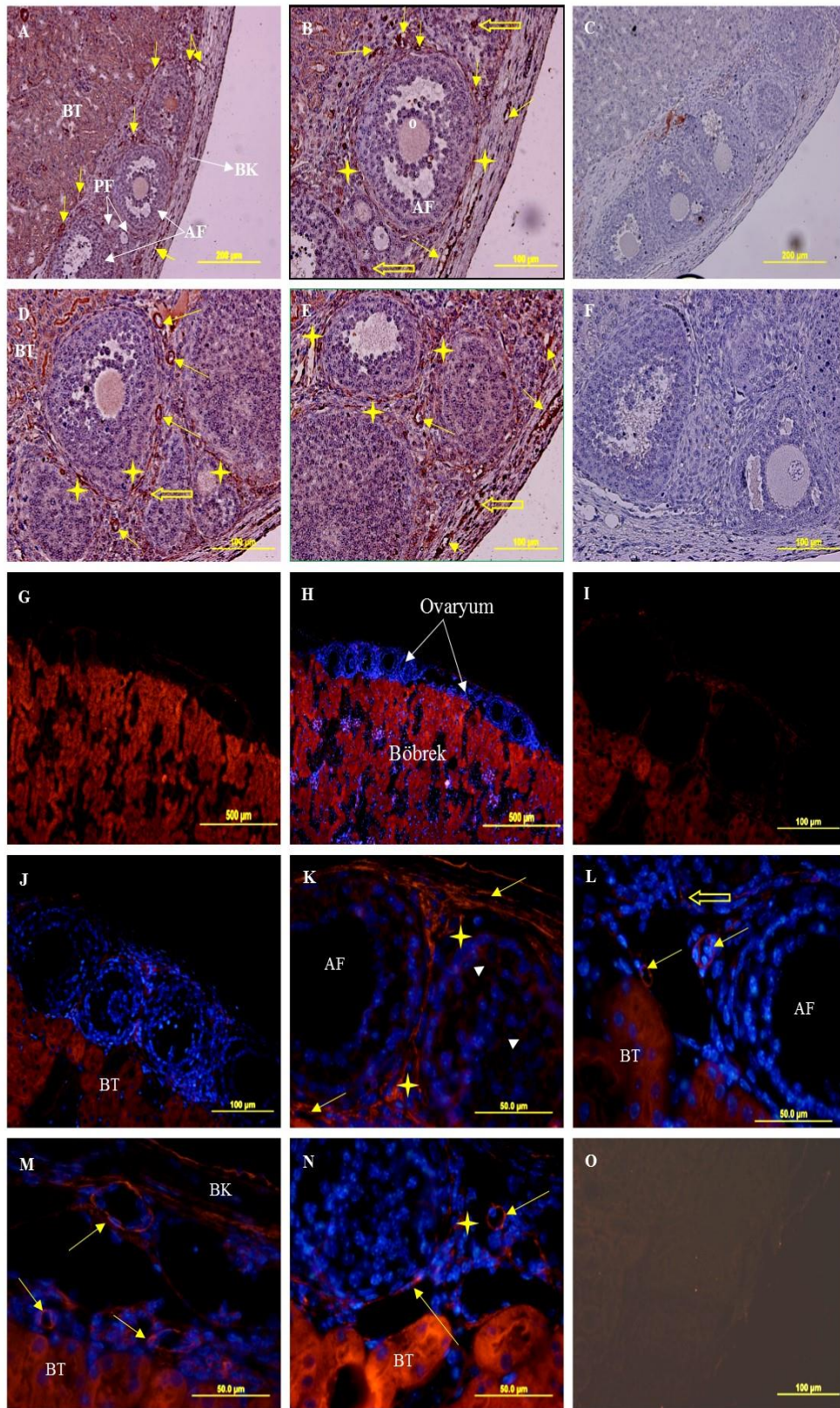
**Şekil 5.11.** Grup III ovaryum doku grubu kesitlerinde PDGF- $\alpha$  immünolokalizasyonu.

Grup III ovaryum dokularında (A-E, (C, F- negatif kontrol) ve G-N, (O-negatif kontrol)) PDGF- $\alpha$  immünolokalizasyonu. Çeşitli büyüme aşamalarındaki folliküllerde (A, B, D, J) ve granüloza hücrelerinde (beyaz ok başı) izlenen (K), teka tabakalarında (sarı yıldız) izlenen (B, D, E, K), folliküller çevresinde dağılım gösteren kan damarlarında (sarı ok) izlenen (A, B, D, E, L), böbrek kapsülü altında dağılım gösteren kan damarlarında ve hücrelerde (sarı ok) izlenen (B, E, K), böbrekle komşu alanlarda dağılım gösteren kan damarlarında (sarı ok) izlenen (A, L, M, N), stromal hücrelerde (içi boş sarı ok) izlenen PDGF-  $\alpha$  ekspresyonu. Primordiyal follikül (PdF), primer follikül (PF), sekonder follikül (SF), antral follikül (AF), oosit (O), ovaryum epiteli (OYE), böbrek tübülleri (BT), böbrek kapsülü (BK).

Kromojen; AEC, zıt boyama; Hematoksilen (A, B, D, F).

Mavi; DAPI, kırmızı; CY3 (G, H, I, J, K, L, M, N).





Çizelge 5.5. Kontrol ve çalışma gruplarında PDGF- $\alpha$  ekspresyonları.

	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>
<b>Epitel</b>	+++	+++	+++
<b>Korteks</b>	++	++	+++
<b>Kan Damarları</b>			
<b>Primordiyal Follikül</b>			
Primordiyal Follikül Hücreleri	+	+	+
Oosit	+++	++	+
<b>Primer Follikül</b>			
Primer Follikül Hücreleri	++	++	+
Oosit	+++	++	+
<b>Sekonder Follikül</b>			
Granüloza Hücreleri	++	++	+
Oosit	+	+	+
Zona Pellucida	-	-	+
Teka İterna	+	++	+
Teka Eksterna	++	+++	+++
<b>Antral Follikül</b>			
Granüloza Hücreleri	++	++	+
Oosit	+	+	+
Zona Pellucida	-	-	-
Teka İterna	+	++	+
Teka Eksterna	++	+++	+++
<b>Böbrek Kapsülü</b>			+++

### **5.3.3. Kontrol ve Deney Gruplarında GDF-9 Bulguları**

#### **5.3.3.1. Kontrol Grubunda GDF-9 Bulguları**

GDF-9 ekspresyonu primordiyal follikül, epitel hücreleri ve oosit hariç çeşitli gelişim aşamalarında olan tüm folliküllerin granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında ve primer oositlerin sitoplazmalarında izlendi (Şekil 5.12 A-E, F/F'-negatif kontrol). Primer follikül aşamasında bulunan folliküllerin, oosit sitoplazmalarında ve folliküler hücrelerin sitoplazmalarında zayıf boyanma izlendi. Sekonder ve antral folliküllerin granüloza hücrelerinde zayıf şiddette ve oosit sitoplazmalarında ise orta şiddette boyanma izlendi (Şekil 5.12 C, D, E). Folliküllerin teka tabakaları, ovaryum epitel hücreleri, kan damarları ve böbrek kapsülünde GDF-9 proteininde boyanma izlenmedi.

#### **5.3.3.2. Grup II GDF-9 Bulguları**

Bu grupta da GDF-9 proteininin kontrol grubuna benzer şekilde, primordiyal follikül aşamasından sonra gelişmeye başlayan folliküllerde giderek artan şiddette boyandığı izlendi. Primer follikül aşamasında bulunan folliküllerin oosit sitoplazmalarında ve folliküler hücrelerin sitoplazmalarında zayıf boyanma izlendi. Sekonder ve antral folliküllerin granüloza hücrelerinde zayıf şiddette ve oosit sitoplazmalarında ise orta şiddette boyanma izlendi (Şekil 5.12 G-K, L-negatif kontrol). Folliküllerin teka tabakaları, ovaryum epitel hücreleri, kan damarları ve böbrek kapsülünde GDF-9 proteininde boyanma izlenmedi.

#### **5.3.3.3. Grup III GDF-9 Bulguları**

Bu grupta GDF-9 proteinini kontrol ve grup II' ye benzer şekilde primordiyal follikül epitel hücreleri ve oositlerinde boyanma izlenmedi. Kontrol ve grup II' den farklı olarak primer, sekonder ve antral folliküllerin granüloza hücrelerinde ve oositlerinde çok zayıf boyanma izlendi. Ancak sekonder ve antral folliküllerin zona pellusidalarında orta şiddette boyanma olduğu izlendi (Şekil 5.12 M-N, O-negatif kontrol).

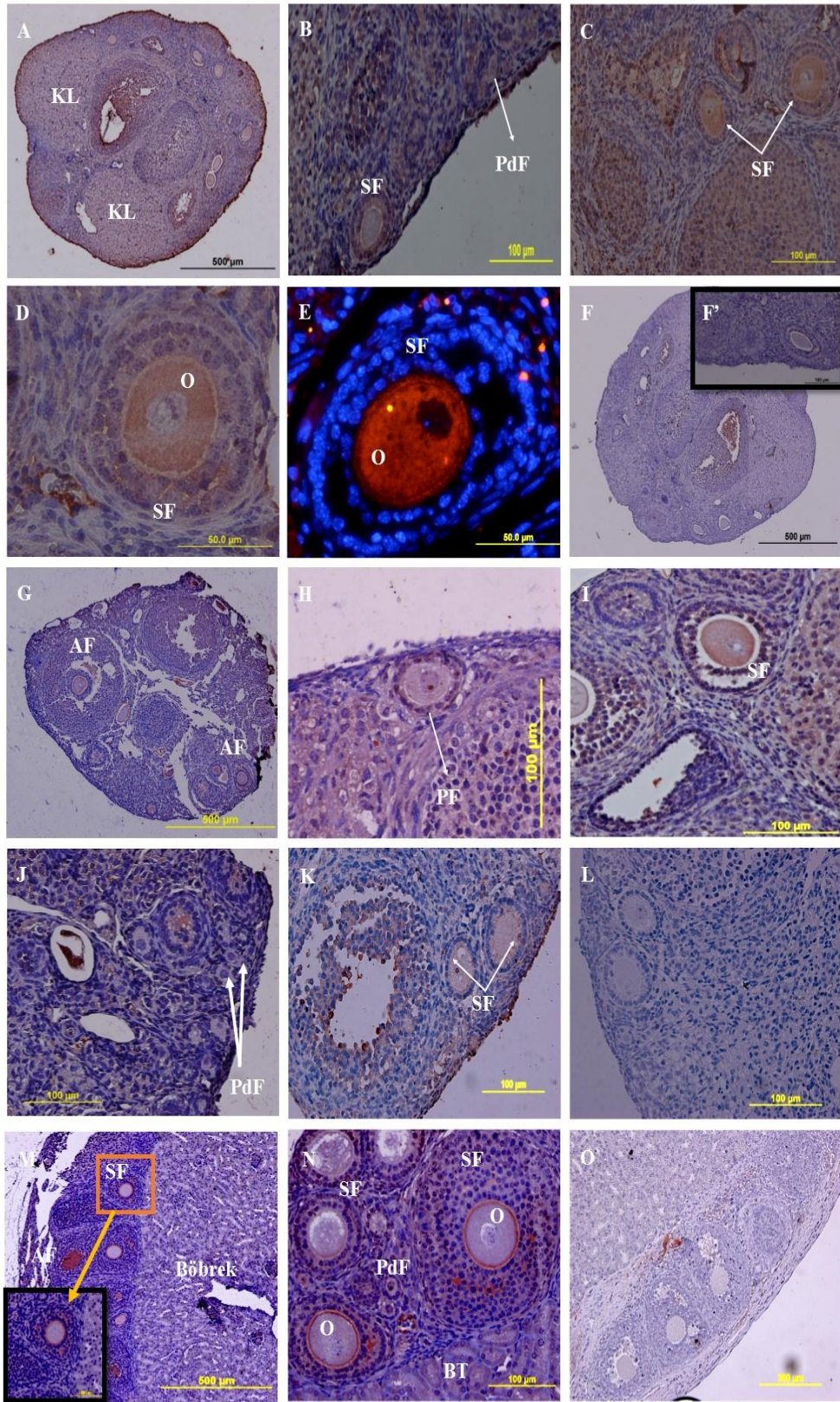
**Şekil 5.12.** Kontrol ve çalışma gruplarında GDF-9 immünolokalizasyonu.

Kontrol grubu (A-F), grup II (G-L), grup III (M-O), negatif kontrol (F, F', L, O)  
Tüm gruplara ait ovaryum dokularında (A-E, (F/F'- negatif kontrol), G-K, (L-negatif kontrol) ve M-N, (O-negatif kontrol)) GDF-9 immünolokalizasyonu. Kontrol grubunda çeşitli gelişim aşamalarında izlenen folliküller (B-E), grup II dokularında çeşitli gelişim aşamalarında izlenen folliküller (H-K) ve grup III dokularında çeşitli gelişim aşamalarında izlenen folliküller (M, N). Primordiyal follikül (PdF), primer follikül (PF), sekonder follikül (SF), antral follikül (AF), oosit (O), böbrek tübüleri (BT).

Kromojen; AEC, zıt boyama; Hematoksilen (A-D, G-K, M-N).

Mavi; DAPI, kırmızı; CY3 (E).







Çizelge 5.6. Kontrol ve çalışma gruplarında GDF-9 ekspresyonları.

	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>
<b>Epitel</b>	-	-	-
<b>Kan Damarları</b>	-	-	-
<b>Primordiyal Follikül</b>			
Primordiyal Follikül Hücreleri	-	-	-
Oosit	-	-	-
<b>Primer Follikül</b>			
Primer Follikül Hücreleri	+	+	±
Oosit	+	+	±
<b>Sekonder Follikül</b>			
Granüloza Hücreleri	+	+	±
Oosit	++	++	±
Zona Pellusida	-	-	++
Teka İnterna/Eksterna	-	-	-
<b>Antral Follikül</b>			
Granüloza Hücreleri	+	+	±
Oosit	++	++	±
Zona Pellusida	-	-	++
Teka İnterna/Eksterna	-	-	-
<b>Böbrek Kapsülü Kan Damarları</b>			-

### **5.3.4. Kontrol ve Deney Gruplarında Ve-kaderin Bulguları**

#### **5.3.4.1. Kontrol Grubu Ve-kaderin Bulguları**

Ve-kaderin kontrol grubunda, folliküllerin granülosa hücrelerinin sitoplazmalarında çok zayıf şiddette boyandığı izlenirken, primer oositlerinde, teka interna tabakalarında ve epitel hücrelerinin sitoplazmalarında Ve-kaderin immüno lokalizasyonu izlenmedi (Şekil 5.13 A-E, F-negatif kontrol). Ancak follikülleri çevreleyen alanlarda bulunan kan damarlarında ve stromal hücrelerde (Şekil 5.13 B, C D, E) ve bazı teka eksterna hücrelerinde (Şekil 5.13 B, D) yoğun boyanma izlendi. Ve-kaderin proteininin genel olarak korteks ve medulla bölgelerinde dağılım gösteren kan damarlarında ve bu bölgelerde bulunan hücrelerde (Şekil 5.13 B, C, D, E) yoğun boyandıkları izlendi.

#### **5.3.4.2. Grup II Ve-kaderin Bulguları**

Bu grupta kontrol grubuna benzer şekilde Ve-kaderin, folliküllerin granülosa hücrelerinin sitoplazmalarında çok zayıf şiddette izlenirken primer oositlerinde, teka interna tabakalarında ve epitel hücrelerinin sitoplazmalarında Ve-kaderin immüno lokalizasyonu (Şekil 5.13 G-I, I'-negatif kontrol) izlenmedi. Ancak follikülleri çevreleyen alanlarda bulunan kan damarlarında ve bazı teka eksterna hücrelerinde (Şekil 5.13 G-I) kontrol grubuna benzer şekilde yoğun immüno lokalizasyon izlendi.

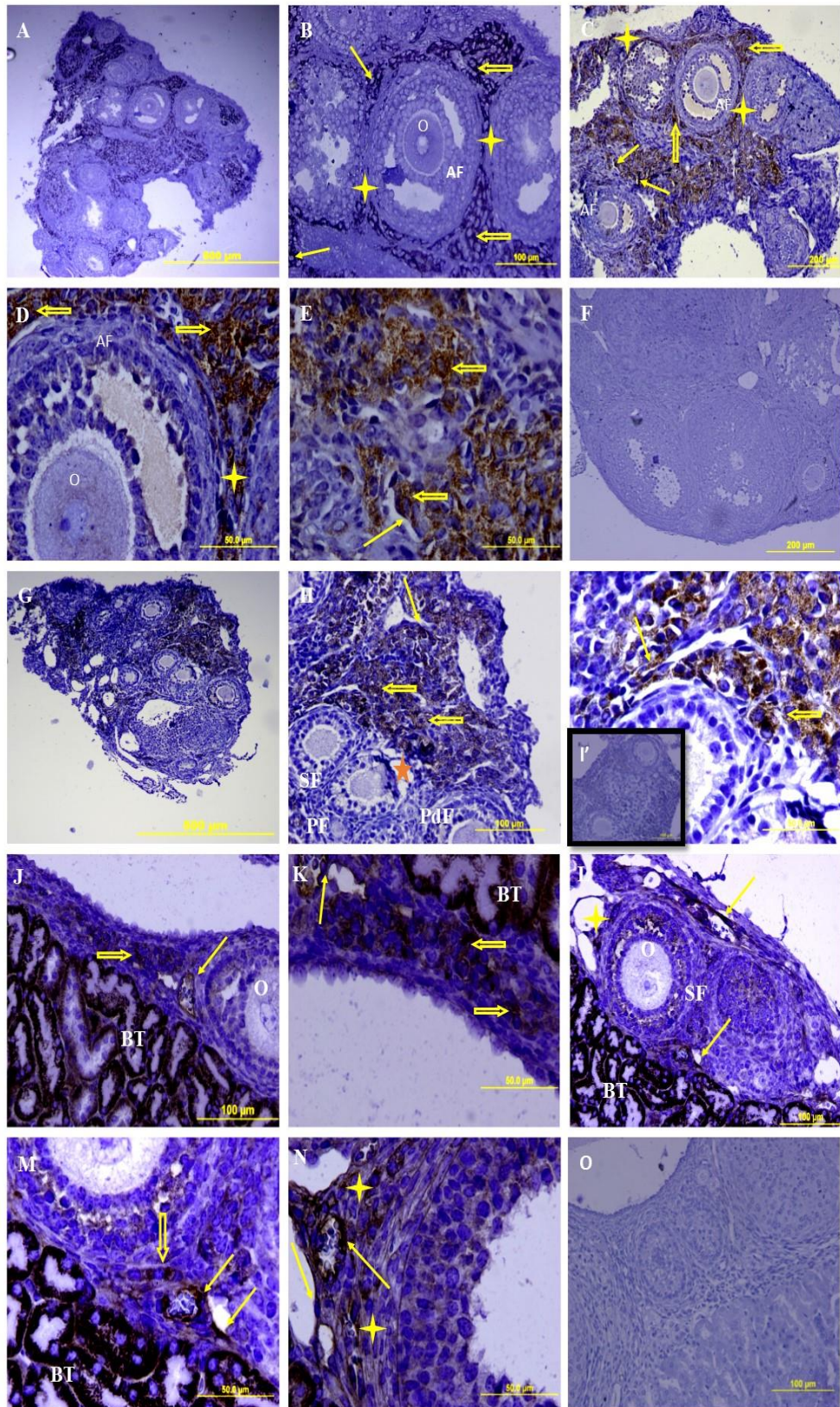
#### **5.3.4.3. Grup III Ve-kaderin Bulguları**

Grup III' de Ve-kaderin, kontrol grubuna benzer şekilde, folliküllerin granülosa hücrelerinin sitoplazmalarında çok zayıf şiddette izlenirken, primer oositlerinde, teka interna tabakalarında ve epitel hücrelerinin sitoplazmalarında Ve-kaderin immüno lokalizasyonu (Şekil 5.13 J-N, O-negatif kontrol) izlenmedi. Ancak follikülleri çevreleyen alanlarda bulunan kan damarlarında (Şekil 5.13 J, N) ve bazı teka eksterna hücrelerinde (Şekil 5.13 L, N) yoğun boyanma gözlemlendi.

Diğer taraftan, böbrek kapsülü altındaki kan damarlarında orta şiddette ve böbrekle tübülleriyle komşu alanlarda bulunan kan damarlarında yoğun şiddette boyanma izlendi (Şekil 5.13 L, M, N).

**Şekil 5.13.** Kontrol, Grup II ve Grup III' de Ve-kaderin immünolokalizasyonu.

Kontrol grubu (A-F), grup II (G-I), grup III (J-N), negatif kontrol (F, I', O)  
Kontrol ve çalışma gruplarına ait ovaryum dokularında (A-E, (F-negatif kontrol), G-I, (I'-negatif kontrol) ve J-N, (O-negatif kontrol)) Ve-kaderin immünolokalizasyonu. Kontrol grubunda follikülleri çevreleyen alanlarda kan damarları (sarı ok) ve stromal (içi boş sarı ok) hücrelerde (B, C, D, E), teka eksternada hücre (sarı yıldız) tabakasında (B, D) Ve-kaderin ekspresyonu. Grup II' de follikülleri çevreleyen alanlarda kan damarları (sarı ok) ve stromal (içi boş sarı ok) hücrelerdeki Ve-kaderin ekspresyonu (G, H, I). Grup III' de follikülleri çevreleyen alanlarda kan damarları (sarı ok) ve stromal (içi boş sarı ok) hücrelerdeki (J, K, N), böbrek kapsülü (L), böbrekle komşu alanlarda (M, N) Ve-kaderin ekspresyonu. Primordiyal follikül (PdF), primer follikül (PF), sekonder follikül (SF), antral follikü (AF), oosit (O), böbrek tübülleri (BT), atretik follikül (turuncu yıldız).  
Kromojen: DAP. Zıt boyama: Hematoksilen (A-E, G-I, J-N).



**Çizelge 5.7.** Kontrol ve çalışma gruplarında Ve-kaderin ekspresyonları.

	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>
<b>Kan Damarları Sekonder Follikül</b>	++	++	++
Granüloza Hücreleri	±	±	±
Teka Eksterna <b>Antral Follikül</b>	+++	+++	+++
Granüloza Hücreleri	±	±	±
Teka Eksterna	+++	+++	+++
<b>Stromal Hücreler</b>	+++	+++	+++
<b>Böbrek Kapsülü Kan Damarları</b>			++
<b>Böbrek Komşuluğundaki Kan Damarları</b>			+++

### 5.3.5. Kontrol ve Deney Gruplarında Pecam-1 Bulguları

#### 5.2.5.1. Kontrol Grubu Pecam-1 Bulguları

Pecam-1 proteininin, kontrol grubunda sekonder ve antral folliküllerin teka eksterna tabakalarında dağılım gösteren kan damarlarının endotel hücrelerinde orta şiddette, bazı stromal hücrelerde ise çok zayıf şiddette boyandığı izlendi. Ancak, folliküllerin granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında, primer oositlerin sitoplazmalarında ve teka interna tabakalarında boyanma izlenmedi (Şekil 5.14 A-B, C-negatif kontrol).

#### 5.3.5.2. Grup II Pecam-1 Bulguları

Bu grupta Pecam-1 proteininin kontrol grubuna benzer şekilde, preantral ve antral folliküllerin teka eksterna tabakalarında dağılım gösteren kan damarlarının endotel hücrelerinde orta şiddette boyandıkları ve bazı stromal hücrelerde ise çok zayıf şiddette boyandıkları izlendi. Ancak, folliküllerin granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında, primer oositlerin sitoplazmalarında ve teka interna tabakalarında boyanma izlenmedi (Şekil 5.14 D-E, F-negatif kontrol).

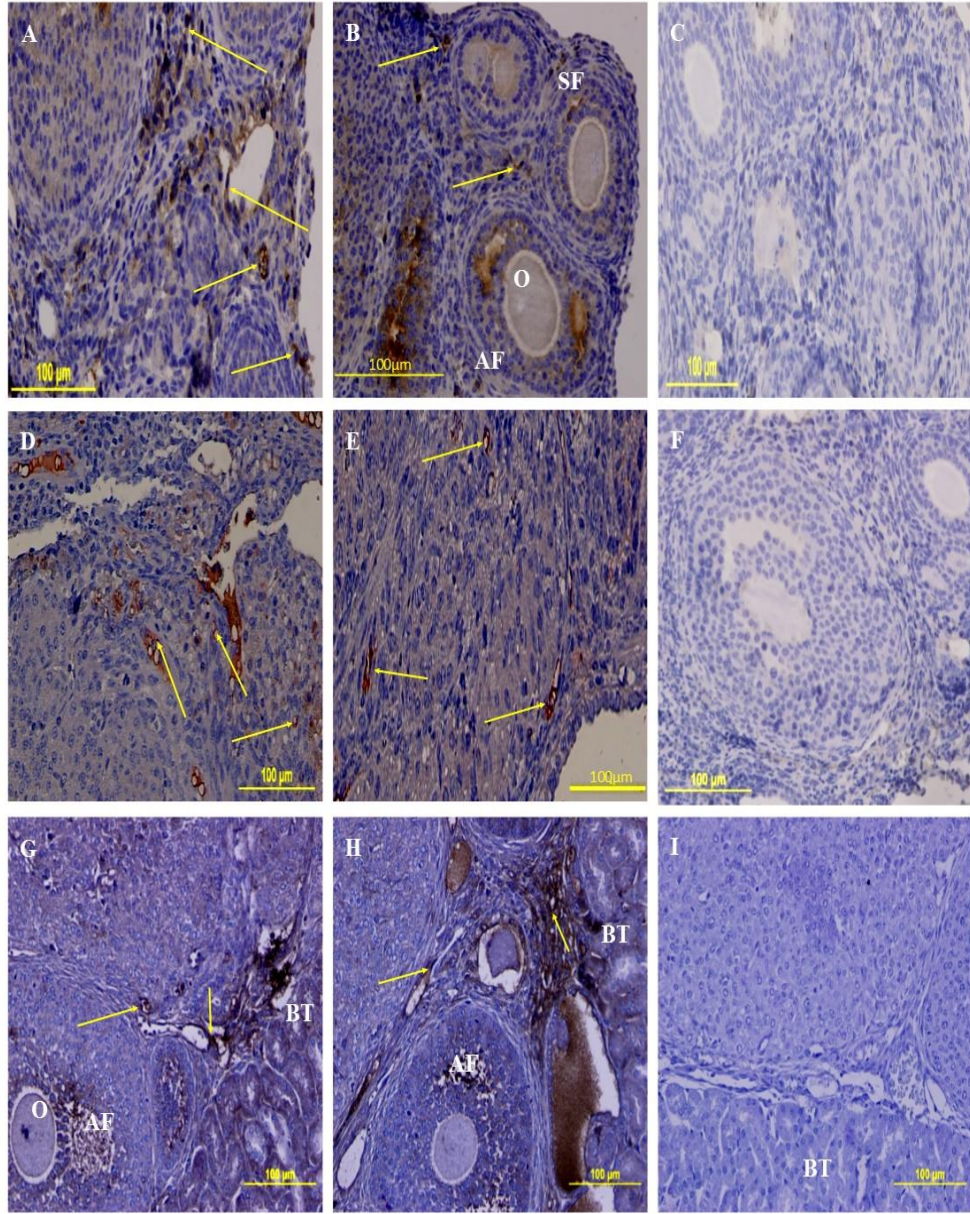
### 5.3.5.3. Grup III Pecam-1 Bulguları

Bu grupta Pecam-1 proteininin, sekonder ve antral folliküllerin teka eksterna tabakalarında dağılım gösteren kan damarlarının endotel hücrelerinde ve böbrek kapsülü altındaki kan damarlarının ve böbrek tübüleriyle komşu alanlarda bulunan kan damarlarının endotel hücrelerinde yoğun şiddette ve bazı stromal hücrelerde ise çok zayıf şiddette boyandığı izlendi (Şekil 5.14 G-H, I-negatif kontrol).

**Çizelge 5.8.** Kontrol ve çalışma gruplarında Pecam-1 ekspresyonları.

	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>
<b>Kan Damarları</b>	+++	+++	+++
<b>Sekonder Follikül</b>			
Teka Eksterna	++	++	++
<b>Antral Follikül</b>			
Teka Eksterna	++	++	++
<b>Stromal Hücreler</b>	±	±	±
<b>Böbrek Kapsülü</b>			+++
<b>Kan Damarları</b>			





**Şekil 5.14** Kontrol grubu (A-C), grup II (D-F), grup III (G-I), negatif kontrol (C, F, I)

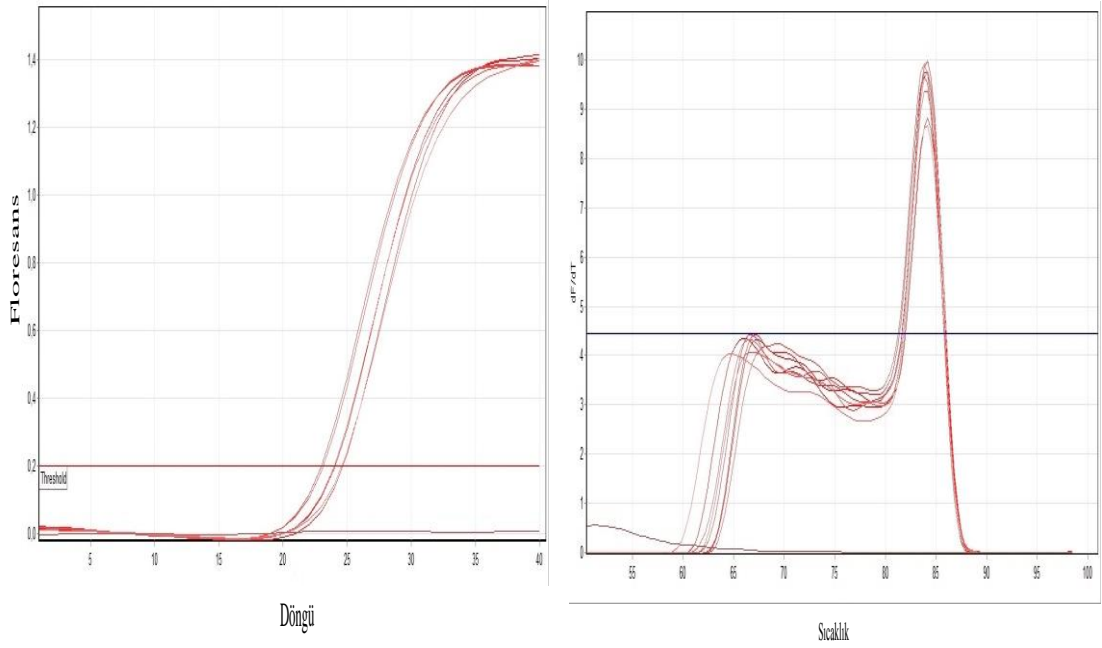
Pecam-1 immüno lokalizasyonu. Kontrol ve çalışma gruplarında, follikülleri çevreleyen alanlarda ve stromada dağılım gösteren kan damarlarında (sarı ok) Pecam-1 (A-B, D-E, G-H) ekspresyonu. Sekonder follikül (SF), antral follikül (AF), oosit (O), böbrek tübülleri (BT).

Kromojen DAB (A, B, G, H), AEC (D, E). Zıt boyama: Hematoksilen.

#### 5.4. REAL TIME PCR

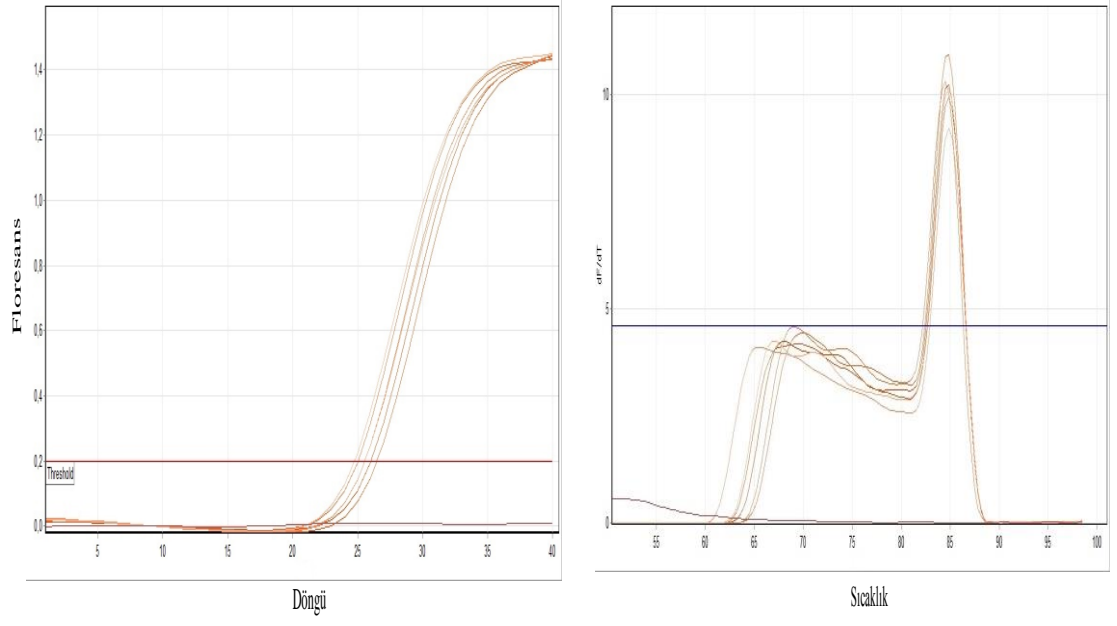
Kontrol, grup II ve grup III ovaryum dokularında Ephrin B1, GDF-9, PDGF- $\alpha$ , PECAM-1 ve Ve-kaderin gen ifadelerinin düzeyleri RT-PCR tekniğiyle analiz edilmiş ve referans gen olarak kullanılan GAPDH ile normalize edilmiştir.

Real Time-PCR reaksiyonu sonucunda her gen için spesifik amplifikasyon eğrisi ve erime eğrileri gözlemlendi (Şekil 5.15, Şekil 5.16, Şekil 5.17, Şekil 5.18, Şekil 5.19, Şekil 5.20).

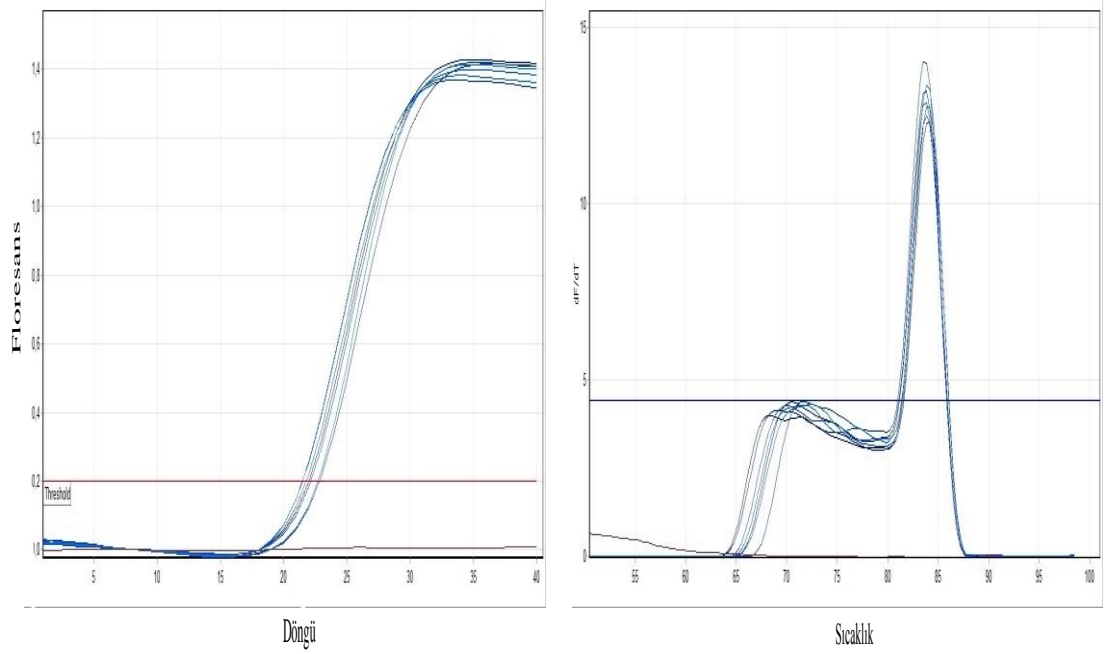


**Şekil 5.15.** Ephrin B1 geninin amplifikasyon eğrisi (A) ve erime eğrisi (B).

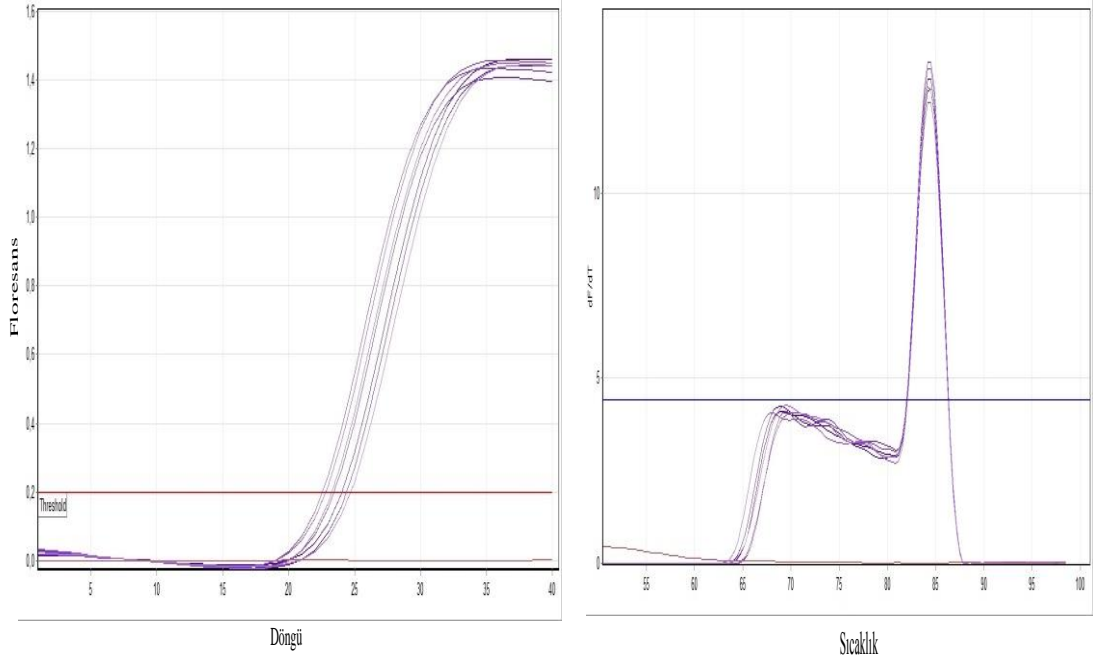




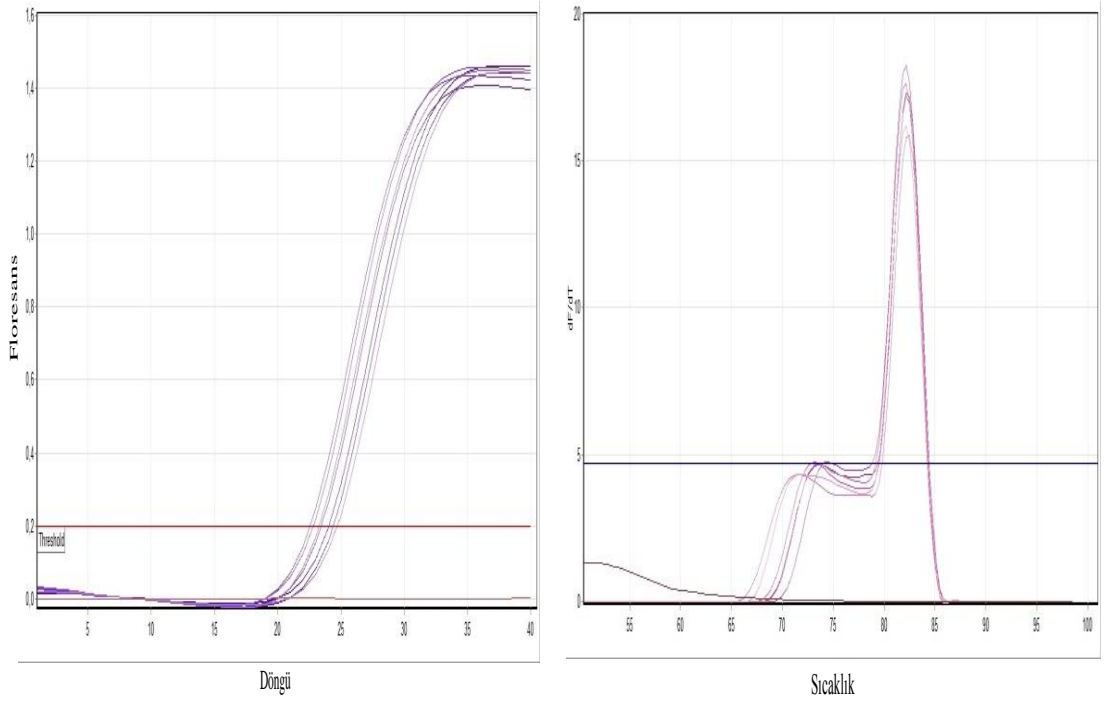
**Şekil 5.16.** PDGF- $\alpha$  geninin amplifikasyon eğrisi (A) ve erime eğrisi (B).



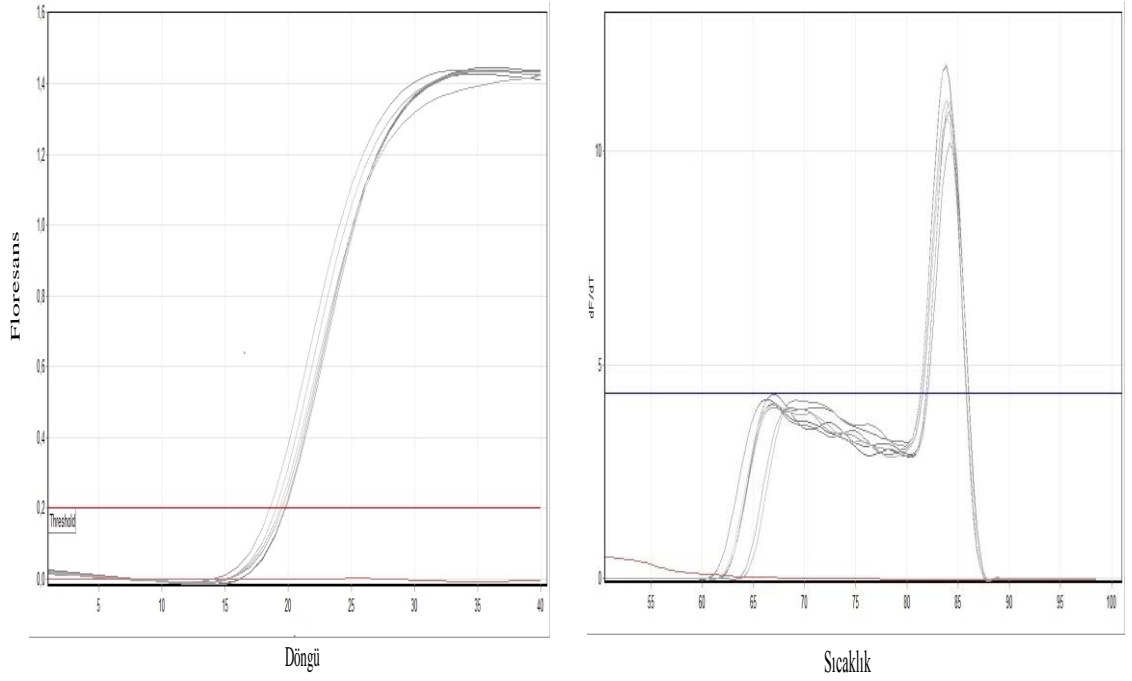
**Şekil 5.17.** GDF-9 geninin amplifikasyon eğrisi (A) ve erime eğrisi (B).



**Şekil 5.18.** Ve-kaderin geninin amplifikasyon eğrisi (A) ve erime eğrisi (B).

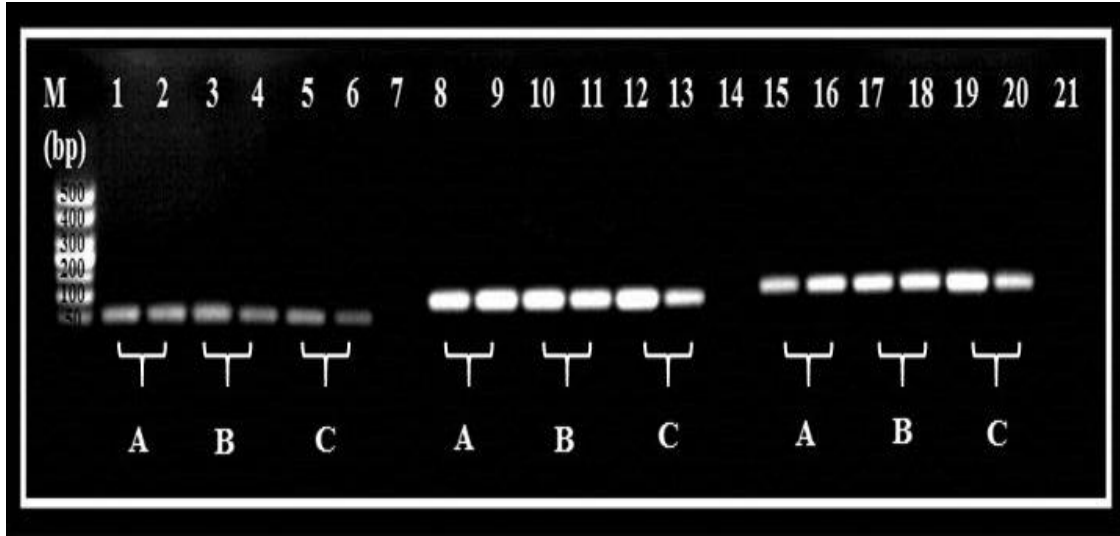


**Şekil 5.19.** Pecam-1 geninin amplifikasyon eğrisi (A) ve erime eğrisi (B).



**Şekil 5.20.** GapDh geninin amplifikasyon eğrisi (A) ve erime eğrisi (B).

Elde edilen Real Time-PCR ürünlerinin özgüllüğünü belirlemek amacıyla ayrıca %2 agaroz jelde, 90 V'ta numuneler yürütüldü. Ürünlerin, Real Time-PCR yönteminde erime noktasında tek pik verdikleri gösterildi. Agaroz jel elektroforez yöntemiyle de ürünlerin tek bant içerdikleri doğrulanmış oldu. Şekil 5.21' de seçilen bazı ürünlerin her üç deney grubunda elde edilen jel görüntüsü gösterilmiştir.



**Şekil 5.21.** Ephrin B1 ürünleri (1-6), GDF-9 ürünleri (8-13), Pecam-1 ürünleri (15-20), Negatif kontrol (7, 14, 21). Marker (M), Kontrol grubu (A), grup II (B), grup III (C).

#### 5.4.1. Real Time-PCR sonuçlarının istatistiksel analizi

Elde edilen ölçümler ve değerlendirmelerde RT-PCR sonuçları Rotor-Gene 6000 yazılımı ile kantite edildi. Verilerin istatistiksel analizi RT<sup>2</sup> profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler  $\Delta\Delta C_t$  metodu temel alınarak analiz edildi. RT<sup>2</sup> profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5 programında Student's T-testi gerçekleştirilerek çalışılan her gen için ifade düzeyleri grup I temel alınarak grup II ve grup III' de belirlendi (Çizelge 5.9.).

Kat değişimi değeri ( $\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), birden büyükse genin ifade düzeyinin arttığı anlamına gelir. Eğer kat değişim değeri birden azsa gen ifade düzeyinin azaldığı anlamına gelir. Kat düzenlemesi (Fold regulation), kat değişim sonuçlarının biyolojik sistemlere uyarlanmasıdır. Eğer kat değişimi değeri ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) birden büyükse kat düzenlemesi değerine eşittir. Ancak kat değişimi değeri ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) birden azsa kat düzenlemesi değeri kat değişimi değerinin negatif tersidir. Verilerin analiz sonucunda her gen bölgesinin ortalama Ct, kat değişim ve kat düzenlemesi değerleri Çizelge 5.9' de gösterilmiştir.

Ephrin B1 geni ifade düzeylerinde, grup II' de 1,44 kat artma, grup III' de ise 1,06 kat azalma olduğu izlendi. Ancak bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p > 0,05$ ).

PDGF- $\alpha$  geninin ifade düzeylerinin, grup II' de 1,05 kat artma, grup III' de ise 1,38 kat azalma olduğu izlendi. Ancak gruplar arasında izlenen bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ).

GDF-9 geninin ifade düzeylerinin, grup II' de 1,25 kat arttığı, grup III' de ise 1,96 kat azalma olduğu izlendi. Ancak bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi ( $p>0,05$ ).

Ve-kaderin geninin ifade düzeyinin ise grup II ve grup III' de sırasıyla 1,01 ve 1,04 kat azalma olduğu ancak farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi ( $p>0,05$ ).

Pecam-1 geninin ifade düzeylerinin, grup II ve grup III' de sırasıyla 1,01 ve 1,00 kat artma olduğu ancak farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi ( $p>0,05$ ).

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen tüm genlerin ifade düzeylerinde çalışma grupları arasında farklılıklar tespit edilmiş olsa da bu farklı ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları izlenmiştir (Çizelge 5.9.). Genlerin grup I' e göre çalışma gruplarında ifade düzeyleri toplu olarak Şekil 5.22' de gösterilmiştir.

**Çizelge 5.9.** RT-PCR verilerinin kontrol ve çalışma gruplarında ortalama Ct, kat değişim ve kat düzenlemesi değerleri ve Student's T-testi sonuçları.

Genler	Gruplar (Sayı)	Ort. Ct	Standart Sapma	Kat Değişimi (Fold Change)*	Kat Düzenlemesi (Fold Regulation)*	Sonuç
<b>EphB1</b>	Grup I	24,4	2,21			
	Grup II	24,39	1,59	1,44	1,44	P=0,185
	Grup III	23,82	1,16	0,94	-1,06	P=0,697
<b>PDGF<math>\alpha</math></b>	Grup I	25,64	1,88			
	Grup II	26,09	1,18	1,05	1,05	P=0,657
	Grup III	25,45	1,48	0,72	-1,38	P=0,153
<b>GDF9</b>	Grup I	21,71	1,87			
	Grup II	21,9	1,31	1,25	1,25	P=0,210
	Grup III	22,01	1,67	0,50	-1,96	P=0,109
<b>VeC</b>	Grup I	23,55	2,64			
	Grup II	24,1	2,01	0,98	-1,01	P=0,790
	Grup III	22,94	1,45	0,95	-1,04	P=0,694
<b>Pecam1</b>	Grup I	23,72	2,33			
	Grup II	24,22	1,71	1,01	1,01	P=0,884
	Grup III	23,04	0,99	1,00	1,00	P=0,841
<b>Gapdh</b>	Grup I	19,55	1,79			
	Grup II	20,07	1,51	1	1	
	Grup III	18,88	1,11	1	1	

P<0.05 anlamlı.

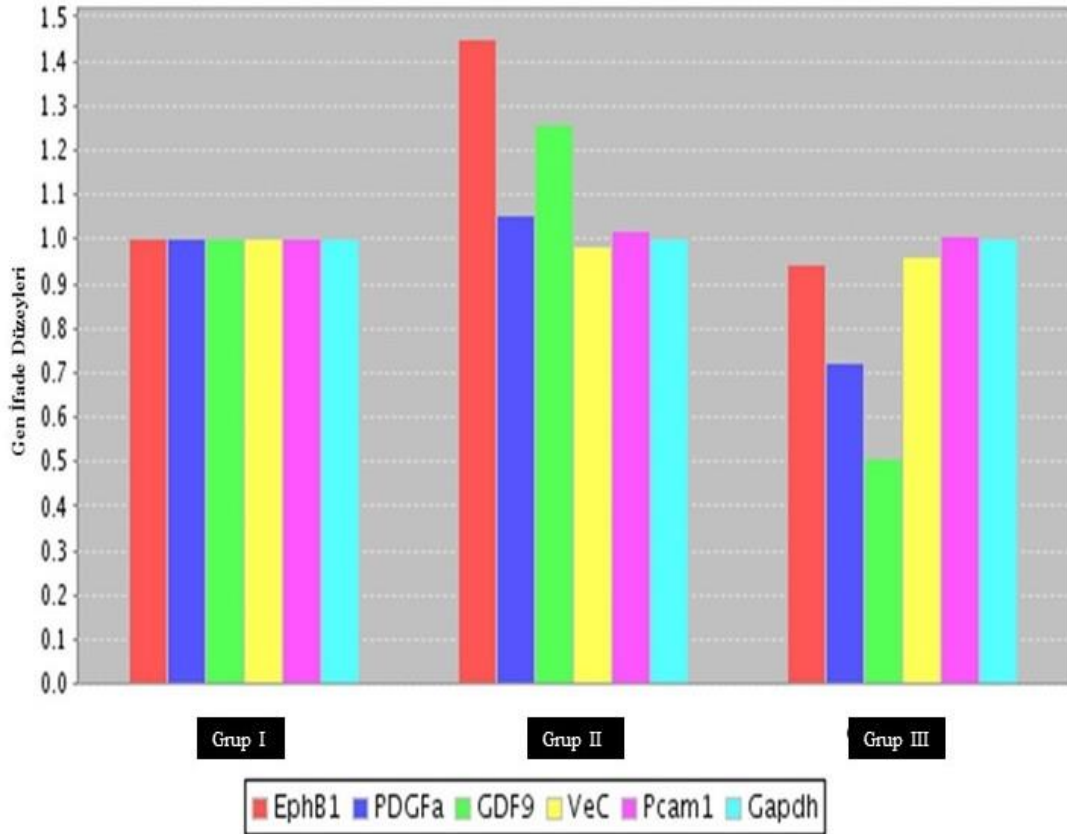
\* Kat Değişimi (Fold Change)=  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

\*\* Kat düzenlemesi (Fold Regulation)=  $-1/ \Delta\Delta Ct$

$\Delta Ct_{\text{çalışma}} = \text{Ort Ct hedef gen}_{\text{çalışma}} - \text{Ort Ct Gapdh}_{\text{çalışma}}$

$\Delta Ct_{\text{kontrol}} = \text{Ort Ct hedef gen}_{\text{kontrol}} - \text{Ort Ct Gapdh}_{\text{kontrol}}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{hedef gen}_{\text{çalışma}} - \text{Gapdh}_{\text{çalışma}}) - \Delta Ct (\text{hedef gen}_{\text{kontrol}} - \text{Gapdh}_{\text{kontrol}})$



**Şekil 5.22.** Kontrol gurubu temel alınarak çalışma gruplarında, Ephrin B1 (EphB1), Pdgf- $\alpha$  (PDGf $\alpha$ ), GDF-9, Ve-kaderin (VeC) ve Pecam-1 (Pcam1) genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması.

Grup I; Kontrol, Grup II; Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözülmüş ovaryum dokusu ve Grup III; Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözümlenerek heterotopik transplantasyonu yapılan grup.

## 6. TARTIŞMA

Ovaryum doku kriyoprezervasyonu, kanser tedavisi sonrasında ya da genetik sebeplerle şekillenebilen prematüre ovaryum yetmezliği riski olan prepubertal kızlar ve evli ya da partneri olmayan genç kadınlar için doğurganlığın korunmasında umut verici yeni bir yöntemdir. Bu yöntem hala deneysel düzeyde olmasına rağmen, farklı kliniklerde başarılı sonuçlar rapor edilmektedir.

Ovaryum dokusu, birçok farklı hücre tipinden oluşur. Ovaryum dokusu içinde bulunan ve puberteyle gelişmeye başlayan folliküller oositlerin gelişimi ve fertilizasyonu için gerekli mikroçevreyi oluştururlar. Bu mikroçevre, ekstraselüler matriksi oluşturan stromal hücreler, kan damarları ve sinirler ile karşılıklı etkileşim halindedir. Bu etkileşim ve uyum folliküllerin gelişimi için gereklidir ve günümüzde folliküllerin *in vitro* gelişimi için kullanılan yöntemlerden hiçbirisi bu uyumu yakalayabilmiş değildir. Yapılan çalışmalarda, folliküllerin *in vitro* gelişimi için hazırlanan kültür ortamlarına ekstraselüler matriks elemanlarının eklenmesinin folliküllerin gelişimini uyardığı, ayrıca ekstraselüler matriksin hücrelerin çoğalmasından adezyonuna kadar birçok hücresel aktivitenin düzenlenmesinde görev üstlendiği rapor edilmiştir (109). Bu veriler, ovaryum kriyoprezervasyon çalışmalarında stromal hücrelerin korunmasının folliküllerin dondurma-çözme sonrasında gelişimleri için hayati rol üstlendiğini göstermektedir.

Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokusunun ototransplantasyonu sonrasında canlı doğum gerçekleştirilmiş olsa da (12), yavaş dondurma yöntemi ile dondurulan ovaryum dokusunda stromal hücrelerin hasar görmesi, tekniğin zaman alması ve pahalı ekipmanlar gerektirmesi nedenleri yöntemin kullanım alanını sınırlamaktadır (110).

Ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonu için kullanılan basit ve düşük maliyetli alternatif bir diğer yöntem vitrifikasyon yöntemidir. Bu çalışmada kullandığımız vitrifikasyon protokolü, çeşitli derişimlerde PrOH, EG ve DMSO' nun medyum içinde hazırlanan karışımını içermektedir. Dokular dondurma işlemi öncesinde bu karışımlar içinde inkübe edilerek sıvı azot içinde donduruldu. Çözme sırasında oluşacak hasarları en aza indirmek amacıyla da örnekler hızlı bir şekilde, sıvı azottan azalan derişimlerde sükröz içeren çözme çözeltileri içine alındı. Bu çalışmada,



ovaryum dokularında çeşitli büyüme aşamalarındaki follüküller ışık mikroskobu kullanılarak sağlam ve atretik follüküller olarak sayıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Vitrikiye edilen ovaryum dokularında kontrol grubuna göre tüm follükül gruplarında canlılık yüzdelerinde azalma olduğu izlendi. Primordiyal ve primer follüküller açısından kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi. Ancak sekonder ve antral follüküllerde gözlenen canlılık kaybının istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi. Primordiyal follüküllerin, küçük olmaları, kortikal granülleri ve zona pellusidanın olmaması ve düşük metabolik aktiviteleri nedeniyle iyi korunduğu bilinmektedir (9, 22, 111). Wang ve arkadaşları, iki farklı vitrifikasyon ve slow freezing yöntemlerini kullanarak insan ve fare ovaryum dokularını karşılaştırdıkları deneyde; her üç grupta da follüküllerin korunduğu özellikle pre-antral follüküllerin morfolojilerinin iyi korunduğunu bildirmişlerdir. Akapunktur iğnesi kullanarak yaptıkları vitrifikasyon protokolünün primer ve sekonder follükülleri diğer tekniklere oranla daha yüksek oranda koruduklarını tespit etmişlerdir. Slow freezing ve ovaryum dokusunun direkt vitrifikasyon çözeltisinde inkübe edildiği vitrifikasyon protokolü karşılaştırıldığında ise follüküllerin morfolojisi açısından bir fark bulunmamıştır (108). Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup-çözülen bir haftalık fare ovaryum dokularında kültür sonrasında apoptozun incelendiği bir diğer çalışmada; kültür öncesinde ovaryum dokularında ışık mikroskopik inceleme yapılmış ve primordiyal, primer ve preantral follüküllerin kontrol grubuna göre oldukça iyi korundukları tespit edilmiştir (112). EG ve ficoll 70 kullanılarak vitrikiye edilen 12-14 günlük fare ovaryum dokularında preantral follüküllerin canlılığı trypan blue kullanılarak test edilmiş ve kontrol grubunda canlılığın %90,5, çalışma grubunda %79,4 olduğu ve farklılığın anlamlı olmadığı bildirilmiştir (113). Slow freezing ve vitrifikasyon yöntemleri ile dondurulmuş sığır ovaryum dokularının karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada da, kontrol ve vitrifikasyonla dondurulmuş dokuların sağlam primordiyal follükül yüzdeleri arasında fark olmadığı ancak slow freezing yöntemiyle dondurulmuş ovaryum dokularında sağlam primordiyal follükül yüzdesinin az olduğu tespit edilmiştir (114). Makaklarda yapılan bir çalışmada ise, sağlam primordiyal ve primer follüküller açısından slow freezing ve vitrifikasyon yöntemleri arasında fark olmadığı ancak stroma ve sekonder follüküller açısından slow freezing yönteminin, vitrifikasyon

yöntemine göre daha fazla hasara neden olduğu rapor edilmiştir (115). Keros ve arkadaşları, 20 hastadan aldıkları ovaryum doku parçalarını slow freezing ve vitrifikasyon yöntemiyle dondurmuşlar ve folliküllerin hayatta kalma oranlarını ve stroma hücrelerinde yapısal özelliklerde oluşan değişiklikleri belirlemişlerdir (106). Bizim de bu çalışmada kısmen modifiye ederek kullandığımız vitrifikasyon protokolünü hazırlayan bu grup, primordiyal, primer, sekonder ve antral folliküllerin her iki yöntemde de iyi korunduklarını tespit etmişlerdir. EM bulgularında stromal hücrelerin korunmasının, kontrol grubuna göre dondurulmuş dokularda daha az olduğunu ancak vitrifikasyon yönteminin slow freezing yöntemine göre stromal hücreleri daha iyi koruduğunu rapor etmişlerdir (16, 106). Isachenko ve arkadaşları ise slow freezing yönteminin, vitrifikasyon yöntemine kıyasla folliküllerin canlılığında daha etkin olduğunu rapor etmişlerdir (116). Çalışmamızda vitrifikasyon ve slow freezing protokolleri karşılaştırılmadı. Ancak kontrol ve vitrifikasyon yöntemiyle dondurup-çözdüğümüz doku grupları arasında tüm follikül tiplerinde korunmanın olduğu, primordiyal ve primer folliküllerin korundukları ve kontrol grubuna göre canlılık kaybının istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemledik. Ancak daha ileri gelişim aşamalarındaki sekonder ve antral folliküllerinin de korunmuş olmalarına rağmen, canlılık kaybının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını izledik. Aktive olarak mayoz bölünmeye kaldığı yerden devam eden primer oositin ileri gelişim aşamalarındaki folliküllerde gereksinimleri ve ayrıca stromal hücreler, granülosa hücreleri ve oosit arasındaki ilişkinin oosit matürasyonu üzerindeki karşılıklı ilişkisi beraber düşünüldüğünde, dondurma işleminin ileri gelişim aşamalarındaki follikülleri daha ciddi boyutta etkileyeceği açıktır. Elde ettiğimiz bu verilerin diğer çalışmalarla benzer olduğu izlendi (106, 112, 114).

Slow freezing ve vitrifikasyon yöntemlerinin sonuçları arasındaki bu farklılığın, dondurma için seçilen prosedürlerden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir. Kriyoprotektan bileşimi, KPA' ların derişim miktarı, KPA' a maruz kalma sürelerinin prosedürler arasındaki farklılıkta etkin olabileceği düşünülmektedir (16). Ancak stroma, granülosa hücreleri ve oosit arasındaki ilişkinin ovaryum işlevleri açısından önemli olduğu bilinmektedir (35). Stromal hücreler, follikülün bazal laminasının dışında teka interna ve eksterna tabakalarını oluşturur. Bu hücreler granülosa hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasında rol oynar (108). Ovaryum

dokusu için seçilecek dondurma yönteminde, stroma hücrelerinin follikül gelişiminde destekleyici rol aldığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Dondurulup çözülmüş ovaryum dokularında, sağlam folliküllerin oranlarını belirlemede ışık ve elekton mikroskopik incelemeler sıkça kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler folliküllerin canlı olduğunu tam olarak göstermez. Dondurma sonrasında folliküllerin canlılığı dokuların çözüldükten sonra *in vitro* kültürü ya da transplantasyonu ardından tekrar değerlendirilerek belirlenmektedir. Folliküllerin ya da ovaryum dokusunun kültürü, hematolojik veya ovaryum kanserli hastalar için dokunun yeniden transplantasyonundan daha güvenli bir yöntem olabilir. Folliküllerin erken gelişim dönemlerinde *in vitro* kültürü umut verici olsa da her gelişim döneminde farklı metabolitlere ihtiyaç duymaları nedeniyle oldukça zordur (117). Bunun yanı sıra ovaryum folliküllerinin *in vitro* ve *in vivo* kültüründe gen ekspresyon profillerinin farklı olduğu da bilinmektedir. Klinikte kullanım alanında çeşitli çekinceleri olsa da ovaryum dokusunun transplantasyonunun, ovaryum dokusunun *in vivo* gelişimini en çok taklit edebilecek yöntem olduğu gösterilmiştir (111). Taze ve dondurulmuş ovaryum dokularının ortotopik ve heterotopik transplantasyonu birçok hayvan türünde gerçekleştirilmiştir (111). Ancak transplante edilen ovaryum dokuları alıcı hayvanlardan tanımlanamamış ya da ölçümlenemeyecek biyolojik bileşenlere maruz kalabilmektedir (78). Bu nedenle insan dokularında *in vitro* kültür bütün eksikleri ve gelişmeye ihtiyaç duymasına rağmen hala eşsiz bir yöntem olarak önemini korumaktadır.

İnsanlarda, dondurulup-çözülmüş ovaryum dokusunun yeniden transplantasyonu ile gebelikler ve canlı doğum rapor edilmiş olsa da (11, 80) metastatik hücrelerin yeniden bulaşma riski klinikte yaygın kullanımını sınırlamaktadır (59). Klinik çalışmalarda taze veya dondurulmuş ovaryum dokularının heterotopik transplantasyonu yapılmış kadınlarda hormonal geri kazanımın 1 yıldan fazla zamanda düzeldiği ancak doğurganlığın kısa sürdüğü rapor edilmiştir (118). Ovaryum korteks parçalarının ortotopik transplantasyonun yapıldığı hastaların %75' inde ovaryum dokularının normal işlevlerini kazandığı ve işlevlerini devam ettirdikleri bildirilmiştir (119).

İnsan ovaryum dokuları araştırma amaçlı olarak ksenotransplantasyon yoluyla immün yetersiz (SCID) farelere de transplante edilmektedir. Doku reddi

gerçekleşmeden yeniden damarlanması gerçekleşen dokularda, çeşitli kriyoprezervasyon yöntemlerinin ve kriyoprotektanların karşılaştırılması ve moleküler mekanizmaların araştırılması yapılmaktadır (117). Dokunun hayatta kalması çoğunlukla dokunun yeniden damarlanma sürecine bağlıdır. Doku transplantasyonundan hemen sonra gelişecek iskemi folliküler kayıpların temel nedenidir (117).

Deney hayvanlarında da ovaryum doku transplantasyonun gametlerin işlev kazanmasında ve hormonal aktivitenin yeniden şekillenmesinde etkin bir yöntem olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (82, 120). Ratlarda yapılan bir çalışmada, vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan ovaryum dokularının heterotopik ototransplantasyonu yapılmış ve 5, 8 ve 10 ay sonunda folliküllerin gelişimi ve dağılımları incelenmiştir. Bu çalışmada heterotopik transplantasyonun başarılı olduğu folliküllerde azalmaya rağmen hedef organlarda endokrin işlev oluşturduğu ve ovaryum işlevlerinin 10 ay sonra bile devam ettiği gösterilmiştir (120). Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuş ovaryum dokularında transplantasyon sonrasında dokuda işlev kaybının olmadığı ancak primordiyal folliküller açısından canlılık oranlarında kayıpların olduğu bildirilmiştir. Transplantasyondan 5 ay sonra taze transplante edilen ovaryum dokularında canlı follikül yüzdesinin transplantasyon sonrasında %59,5 olduğu ancak dondurulan grupta %55,1 olduğu görülmüştür (120). Slow freezing yöntemiyle dondurulmuş fare ovaryum dokularının ortotopik transplantasyonun yapılmış olduğu başka bir çalışmada, taze transplante edilen grupta yaklaşık %80, dondurularak transplante edilen grupta ise %75 oranında östrus döngülerinin yeniden kazanıldığı görülmüştür (121). Bir başka çalışmada ise slow freezing yöntemiyle dondurulmuş fare ovaryum dokularının çift taraflı overektomi yapılmış alıcı farelerin böbrek kapsüllerinin altına transplantasyonu yapılmıştır (122). Dondurulmuş over dokusunda transplantasyon sonrasında folliküler kaybın taze transplante edilen gruba göre %9 daha fazla olduğu görülmüştür. Folliküler kaybın kriyoprezervasyon yönteminden çok iskemi nedeniyle olduğu ileri sürülmüştür. Transplantasyon işlemi ardından 30 dakika ile 4 gün süresince çeşitli zaman dilimlerinde apoptozun izlendiği bu çalışmada, transplantasyonun ardından 2-12 saatler arasında apoptozun arttığı 12 saat sonrasında azaldığı rapor edilmiştir. Farelerde transplantasyondan 3 gün sonra greftlerde yeniden damarlanmanın

gözlendiği rapor edilmiştir (122). 2008 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, taze ve slow freezing yöntemiyle dondurulan ovaryum dokuları tek ve çift taraflı overektomi yapılmış alıcı farelere ortotopik olarak transplante edilmiştir. Transplantasyondan 2 hafta sonra; folliküllerin hayatta kalma oranlarının ve büyüklüklerinin hem taze hem de dondurulup-çözöldükten sonra transplante edilen her iki grupta da azaldığı görölmüştür (82). Transplantasyon sonrasında ovaryum dokularının büyüklüğündeki dolayısıyla follikül havuzundaki bu azalmanın dondurma prosedüründen değil, transplantasyon işleminden kaynaklandığı gösterilmiştir (82, 122).

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan fare ovaryum dokularının intraperitoneal (123) ve ortotopik (124) transplantasyonları da yapılmış ve her iki çalışmada da folliküllerin hayatta kaldığı rapor edilmiştir. Migishima ve arkadaşları, green floresan protein taşıyan transgenik farelerden aldıkları ovaryum dokularını vitrifikasyon yöntemiyle dondurmuşlar ve ortotopik transplantasyonu sonrasında elde edilen canlı yavru miktarının kontrol grubuna göre daha az olduğu ve istatistiksel olarak sonucun anlamlı olduğunu bildirmişlerdir (124).

Gerek farelerde gerekse diğer büyük hayvanlarda da buna benzer follikül kayıplarının olduğu izlenmiştir (120). Pirimordiyal folliküllerin metabolitlere az ihtiyaç duymaları nedeniyle iskemiden en az etkilenen folliküller olduğu bilinmektedir (111). Transplantasyon sonrasında canlı folliküllerde izlenen kaybın temelde iskemik hasar nedeniyle artış gösterdiği iddia edilmektedir (82, 111, 120, 122, 123, 125). Böbrek dokusu ise anjiogenik faktörler açısından zengindir, hızlı yeniden damarlanma gerçekleşir. Bu nedenle transplante edilen parçaların hayatta kalma şansı artar (125). Bu doğal avantajlarının yanında, doku parçalarının nereye transplante edildiğine bakılmaksızın, yeniden damarlanma öncesinde ki iskemik hasarlar transplante edilen parçalar açısından problemdir.

Bu çalışmada, taze ve vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularının heterotopik ototransplantasyonu ardından, ovaryum dokuları böbrek kapsülü altında geniş hacimli kitleler şeklinde izlendiler. Transplantasyondan 17 gün sonra, çalışma gruplarında canlı follikül sayısı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm follikül gruplarında kontrol grubuna kıyasla azalma izlendi. Çalışma grupları açısından değerlendirildiğinde ise dondurulup-çözöldükten sonra transplante edilen grupta gözlenen folliküler kaybın sham gruptan daha fazla olduğu izlendi.

Transplantasyon işlemi ardından oluşan iskemik hasarın kortekste dağılım gösteren ve az metabolik gereksinime ihtiyaç duyan primordiyal follikülleri en az etkilemiş olması gerekir. Bizde transplantasyon işlemi ardından, primordiyal follikül havuzunda azalma olmasına rağmen, sham ve grup III' de primordiyal folliküllerde izlenen canlılık kaybının istatistiksel olarak anlamsız olduğunu tespit ettik. Transplantasyon işlemi ardından, primer folliküllerde canlılığın korunmasına rağmen gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. Bu sonucun, primordiyal follikül havuzunda meydana gelen azalmadan kaynaklandığı düşünülebilir. Çünkü, primer folliküller menstrüal döngüde seçilen bir grup primordiyal folliküllerden gelişmektedir. Sekonder folliküllerin canlılığının ise gruplar arasında korunduğu ve canlılık kaybının istatistiksel olarak anlamsız olduğu tespit edildi. Sekonder folliküllerde transplantasyon ardından farklılığın olmaması, primordiyal follikül havuzundan seçilen folliküllerin gelişmesi ve buna ek olarak vitrifikasyon yöntemi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde korunduğunu tespit ettiğimiz canlı kalan primer folliküllerin gelişmesiyle olabileceğini düşünmekteyiz. Antral folliküller, ileri gelişim aşamalarında bulunan folliküllerin vitrifikasyon yöntemi ile daha fazla kayba uğraması nedeniyle gruplar arasında en az korunan gruptur, dolayısıyla istatistiksel olarak canlılık kaybı gruplar arasında anlamlı bulunmuştur. Kontrol ve çalışma gruplarında tüm tespit edilen folliküllerin canlılığı karşılaştırıldığında, vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup-çözülmüş dokunun transplantasyonu sonrasında canlılığın %69,3 taze ovaryum dokusunun transplantasyonu sonrasında canlılığın %78,5 olduğu görüldü. Vitrifikasyon işleminin folliküllerin canlılığına olan etkisinin yaklaşık %9 olduğu düşünüldüğünde folliküler kayıplarda, dondurma işleminden ziyade transplantasyon sonrasında oluşan iskeminin etkin olduğu görülmektedir. Bu veriler, Liu ve arkadaşlarının çalışma bulgularıyla örtüşmektedir (122). Liu ve ekibinin, slow freezing yöntemiyle ovaryum dokularını dondurdukları ve folliküllerde izlenen canlılık kaybının bizim de tespit ettiğimiz gibi %9 civarında olması, transplantasyon sonrası folliküllerde gözlenen canlılık kaybının dondurma prosedürü ile ilgili olmadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan ve en az 1 hafta -196 °C'de saklanan fare ovaryum dokularının çözünmesi sonrasında, tüm folliküllerin morfolojisinin iyi korunduğu ve primordiyal ve primer folliküllerin korunmasının

istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Vitrifiye edilmiş ovaryum dokularının *in vivo* kültürü olarak da değerlendirilebilecek böbrek kapsülü altına avasküler transplantasyonu sonrasında, dokuların damarlandığı ve 17. günde follikül morfolojisinin ve canlılığının korunduğu tespit edildi. Özellikle primordiyal ve sekonder folliküllerin korunmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.

Bu çalışmada, vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan ve ototransplantasyonu yapılan ovaryum dokularının üreme potansiyeli, canlılığı korunan folliküllerin morfolojilerinin belirlenmesinin yanısıra, follikülogenez ve anjiogenezde etkin olduğu bilinen bazı genlerin ve gen ürünlerinin ekspresyonları açısından da değerlendirildi. Embriyo gelişimi sürecinde, aksonal yönlendirmenin kontrolü, doku morfogenezinde boyutsal sınırların düzenlenmesi, nöral krista hücre göçü, segmentasyon ve apoptoz (84) gibi olaylarda görev alan Ephrin ailesinin yetişkinlerde neovaskülarizasyonda görev aldığı bilinmektedir (87, 88). Ephrin ve reseptörlerinin farklı dokulardaki ekspresyonları çeşitli bilim insanlarıncı araştırılmış ve embriyogenez sürecinde sinir sisteminde, vasküler sistemde (126) ve erişkinlerde yeniden damarlanma alanlarında ayrıca tümör hücrelerinde eksprese oldukları izlenmiştir (127). Ephrin ailesine ait ligand-reseptör ilişkisinin hücre-hücre adezyon sisteminin kontrolünde kritik rol oynadığı bilinmektedir. Bu sistemin yetişkin dokularda bozulmasının malign invazyona ve metastaza yol açabileceği iddia edilmektedir. Ephrin B reseptörlerinin hücre-hücre adezyon sistemi yoluyla kolorektal kanser hücrelerinin yayılımını sınırlandırdığı *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir. Ephrin B1 düzenlenimindeki bozulmanın veya fosforile olamamasının, sıkı bağlantı komplekslerinde bozulmaya ve hücre-hücre sınırlarında tümör hücrelerinin invazyonuna neden olduğu iddia edilmektedir (128).

Src-ailesine ait kinazların Ephrin B1'in tirozin fosforilasyonuna katıldığı ve bu fosforilasyon olayının, endotel hücrelerinde Ephrin B1'in aktivasyonu sonrasında anjiyogenezin başlatılması için gerekli olduğu gösterilmiştir (129). Embriyoner dönemde geniş ölçüde eksprese edilen Ephrin B1'in yetişkin dönemde az eksprese edilmesi embriyonik dönemde önemli rolleri olduğunu düşündürmüştür (84, 129). Davy ve arkadaşlarının fare embriyolarında yaptıkları çalışmada, Ephrin B1'in iskelet yapılarında embriyogenez süresince ilişkili olduğu ve eksikliğinde iskelet ve nöral krista kökenli dokularda defektlerin oluştuğunu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada

Ephrin B1'in nöral krsta hücrelerinin hedef bölgelere göçünü kontrol ettiği ve bu hücrelerin bazıları için reseptör gibi davrandığı iddia edilmiştir (129). Ephrin ailesine ait ligand ve reseptörlerinin memelilerde dişi üreme sistemi ile ilgili işlevleri henüz bilinmemektedir. Ancak B tipi Ephrin grubunun lüteinleşme ile ilgili olduğu ve kumulus hücrelerinde Ephrin B2 reseptör ekspresyonunun, anöploidi ve normal oositler arasında farklı olduğu bilinmektedir (130). Folliküler büyüme sürecinde gen ekspresyonlarının araştırıldığı bir çalışmada, aralarında Ephrin B1 reseptörünün de bulunduğu bazı genlerin PDGF sinyal yolağıyla ilişkili olduğunu rapor edilmiştir (131). Egawa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Ephrin B1'in insan ovaryum dokularında preovulatar folliküllerin granülosa hücrelerinde yoğun eksprese edildiği immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Aynı çalışmada IVF tedavisi öncesinde hastalardan elde edilen lüteinize granülosa hücrelerinde Ephrin B1 ekspresyonu immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiş ve elde edilen veriler flow sitometri yöntemleri ile desteklenmiştir. Aynı çalışmada, Ephrin B1 ligandının, granülosa hücrelerindeki ekspresyonlarının LH'nin pik yaptığı veya ovulasyon sonrasında hızla arttığı gözlenmiş ancak oositlerdeki ekspresyonlarının olup olmadığı bildirilmemiştir (86). Gale ve arkadaşları B-tipi ephrin ailesinden Ephrin B2'nin yetişkin farelerin tümör dokularını da içeren çeşitli organ ve dokularında ekspresyonunu inceledikleri çalışmada, Ephrin B2'nin tümörlerde veya dişi üreme sistemindeki yeni oluşan kan damarlarında güçlü şekilde eksprese edildiğini bildirmişlerdir (127). Dişi üreme sisteminde folliküllerin matürasyonuna ve ovulasyon sonrası şekillenen korpus luteum oluşumuna anjiogenez eşlik eder. Follikül matürasyonu sırasında folliküller yeni oluşan kan damarları tarafından çevrilir. Korpus luteum oluşumunda ise lüteinleşen granülosa hücreleri ve göç eden endotel hücreleri ince damar ağı kurmak için birbiriyle ilişki içerisindedir. Damar gelişimi süresince vasküler endotel hücreler arasındaki iletişimin B tipi Ephrin-ephrin reseptör ilişkisi yoluyla kurulduğu verisi üzerinden, Ephrin-ephrin reseptör sisteminin yeni damar ağının kurulumunda ve korpus luteum oluşumu gibi dokunun yeniden modellenmesinde önemli bir düzenleyici olabileceği ileri sürülmüştür (86). Çalışmamızda, antikör kullanımı ile Ephrin B1 immüno lokalizasyonu kontrol ve çalışma gruplarına ait ovaryum dokularında belirlendi. Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında Ephrin B1 proteininin, tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin



oositlerinde ve granülosa hücrelerinde orta şiddette, teka interna hücre tabakasında zayıf, teka eksterna hücre tabakasında orta ve korpus luteum ve stromadaki kan damarlarında yoğun şiddette boyandığı izlendi. İmmünohistokimyasal işaretleme sonrasında elde ettiğimiz bulgular, Egawa'nın insan preovulator folliküllerin granülosa hücrelerinde ve korpus luteumda rapor ettiği pozitif boyanmaya benzerlik göstermektedir (86). Bildiğimiz kadarıyla mevcut çalışmamız memeli ovaryumunda Ephrin B1 geni ve proteininin ekspresyonu ile ilgili ilk detaylı çalışmadır. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularında tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin oosit ve granülosa hücrelerinde Ephrin B1 ekspresyonunun kontrol grubuna göre şaşırtıcı şekilde arttığı izlenmiştir. Teka interna ve eksterna hücre tabakalarında ise kontrol grubuna benzer şekilde dağılım gözlemlendi. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise folliküllerdeki ekspresyonda azalma izlendi. Dikkat çekici şekilde tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin oositlerinde çok zayıf boyanma izlenirken oositlerin zona pellusidalarında yoğun immüno lokalizasyon izlendi. Yeni damar ağının kurulumunda önemli görevler üstlenen Ephrin B1 proteininin, böbrekle komşu alanlarda ve böbrek kapsülünde var olan ve yeni oluşan kan damarlarındaki ekspresyonunun yoğun olduğu izlendi. Real Time-PCR sonuçlarına göre Ephrin B1 gen ekspresyonunun, dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışı izlendi ( $p>0,05$ ). Bu veri, immünohistokimyasal bulgularla beraber değerlendirildiğinde artışın tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin oosit ve granülosa hücrelerinde izlenen yoğun boyanma ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Folliküllerde izlenen protein ekspresyonundaki bu artış vitrifikasyonda kullandığımız bazı kimyasalların ya da dondurma işleminin kendisinin, Ephrin B1'in de dahil olduğu bazı sinyal iletim mekanizmalarını aktive etmesiyle oluşabilir. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan çok az azalma izlendi ( $p>0,05$ ). Neovaskülarizasyonda görev aldığı bilinen Ephrin B1 ekspresyonunda, bu grupta artma beklenirken azalma izlendi. İmmünohistokimyasal bulgularla birlikte değerlendirildiğinde böbrekle komşu alanlarda ve böbrek kapsülü altında yeni şekillenen ya da var olan kan damarlarında Ephrin B1 proteininin yoğun ekspresyon edilmiş olduğu izlendi. Ancak dokular mRNA izolasyonu için hazırlanırken böbrek

kapsülü ve böbrek dokusundan dikkatlice arındırıldığı için bu bölgelerde eksprese olan Ephrin B1 geni RT-PCR sonucu içinde değerlendirilememiştir. Transplante ettiğimiz dondurulmuş-çözülmüş ovaryum dokularında transplantasyondan 17 gün sonra folliküllerin oositlerinde Ephrin B1 proteinin ekspresyonunda azalma gözlene de normal morfolojiye sahip çeşitli aşamalarındaki folliküllerin varlığı bu azalmanın folliküllerin gelişimini etkileyecek düzeyde olmadığını düşündürmektedir. Ancak her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, çalışma grupları arasında gözlenen Ephrin B1 ekspresyonlarındaki farklılık çeşitli metotlarla incelemeye değer olduğunu düşündürmektedir.

Anjiyogenez ve hali hazırda damar bulunan dokularda kan damarlarının gelişiminden sorumlu olan PDGF'ler, hücre proliferasyonunda ve farklılaşmasında, hücre göçünde, embriyogenez ve organogenezde, yara iyileşmesi ve iskelet kas rejenerasyonları gibi birçok önemli işlevde görev alırlar. Ayrıca nöral kista ve merkezi sinir sistemi gelişiminde de rol oynamaktadırlar (94, 95). Embriyoner dönemde, PDGF'ler farklılaşmamış mezenşim hücrelerinin ve bazı progenitör hücrelerin çoğalmasında etkindirler ve sonraki dönemlerde ise, doku şekillenmesi ve hücrelerin farklılaşmasında rol oynarlar (95). PDGF ailesinin bir üyesi olan PDGF- $\alpha$ 'ların üreme organlarında eksprese edildikleri ve önemli işlevleri oldukları fark edilmiştir. Dişi üreme sisteminde PDGF- $\alpha$ 'nın östrojenle düzenlendiği ve genel olarak epitel ve stromal hücrelerde lokalize oldukları bilinmektedir. İnsanlarda gebelik döneminde PDGF- $\alpha$  ekspresyonunun miyometrial düz kas hücrelerinde arttığı ve böylece uterusun fizyolojik hipertofi ile genişlemesinde görev aldığı iddia edilmektedir (132, 133). İnsanlarda fetal ve yetişkin ovaryumlarında PDGF ligand ve reseptörlerinin araştırıldığı bir çalışmada, PDGF- $\alpha$ 'nın oosit sitoplazmalarında, granülosa hücrelerinde, teka hücre tabakasında ve ovaryumun stromal hücrelerinde eksprese edildiği immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiş ve ovaryum dokusunda PDGF- $\alpha$ 'nın mRNA ekspresyonu RT-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir (94). PDGF'lerinde aralarında bulunduğu bazı büyüme faktörlerinin erken dönem follikülogenezde görev aldıkları mikroarray yöntemle belirlenmiştir. PDGF, mRNA ekspresyonunun primordiyal follikülden primer follikül aşamasına geçişi sürecinde değişmesi, PDGF'lerin erken follikül gelişiminde rol oynayabileceğini göstermiştir (134). Nilsson ve arkadaşları, PDGF varlığında ve PDGF antikorları nötralize edilmiş rat ovaryum

doku kültürlerinde yaptıkları çalışmada, PDGF ekspresyonunun primordiyal follüküllerin gelişimini uyardığını ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada PDGF proteinlerinin primordiyal follüküllerin oositlerinde ve gelişen follüküllerde bulunduğu gösterilmiştir (134). PDGF ligand ve reseptör ekspresyonlarının prenatal ve 4 haftalık postnatal rat ovaryumlarında araştırıldığı başka bir çalışmada, PDGF- $\alpha$  immüno lokalizasyonunun primordiyal ve primer follüküllerin oosit ve follükül hücrelerinde olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada postnatal rat ovaryumlarında PDGF- $\alpha$  immüno lokalizasyonunun primer, sekonder ve antral follüküllerin teka tabakalarında ve bazı preantral ve antral follüküllerin granülosa hücrelerinde boyanmanın 20-24 günlük ovaryum dokularında pozitif olduğu rapor edilmiştir (135). Yoon ve arkadaşları, erken follüküler gelişimin gen ekspresyonlarını araştırdıkları bir çalışmada, işlevsel özelliklerine göre genleri mikroarray analizleme yöntemiyle listelemişlerdir (131). PDGF ligand ve reseptörlerinin follüküler gelişime bağlı olarak oosit ve ovaryum hücrelerinde farklı eksprese edildiklerini fark etmişlerdir. 12 günlük fare ovaryumlarında immünohistokimyasal yöntemler yardımıyla yaptıkları incelemede, PDGF- $\alpha$  ve  $\beta$  ligandlarının primordiyal follüküllerin oosit nükleus ve sitoplazmalarında eksprese olduğu, sitoplazmik ekspresyonun follükül gelişimine bağlı olarak azaldığı, ancak proliferen olan granülosa hücreleri ve teka hücrelerinde PDGF ailesine ait tüm ligandların ekspresyonunun olduğunu rapor etmişlerdir. PDGF reseptör  $\alpha$  (PDGFR- $\alpha$ ), follüküllerin çevresinde eksprese olurken reseptör  $\beta$ 'nin (PDGFR- $\beta$ ) oosit ve granülosa hücrelerinde eksprese olduğu görülmüştür. Reseptör ile ligand ilişkisi dikkate alınarak primordiyal follüküllerin seçilmesi, büyümeye başlaması ve teka hücre tabakasının şekillenmesinde PDGF ligandları ile PDGFR- $\alpha$ 'nın etkileşiminin, granülosa ve teka hücrelerinin çoğalmasını etkileyerek follükülün büyümesinde ise PDGF ligandları ile PDGFR- $\beta$  etkileşiminin rol oynayabileceği iddia edilmiştir (131). Özetle oosit ve follüküllerin çeşitli kısımlarında üretilen ve salgılanan PDGF ligand ve reseptörlerinin primordiyal follüküllerin değişiminde ve preantral follüküllere gelişiminde rol aldığı araştırmacılar tarafından iddia edilmektedir (94, 131, 134, 135). Bu çalışmada immünohistokimyasal yöntemlerle elde ettiğimiz kontrol grubu verilerine göre, tüm gelişim aşamalarındaki follüküllerin oositlerinde, granülosa hücrelerinde ve teka tabakalarında PDGF- $\alpha$  ekspresyonu gösterilmiştir. Bazı primordiyal, primer ve sekonder follüküllerin oosit nükleusunda güçlü boyanma

olduğu izlendi ancak bu veri immüno Floresan boyanma ile doğrulanamadı. İmmünohistokimyasal işaretlemeyle elde edilen bulgularımızın Yoon'un bulgularını destekler şekilde olduğu izlendi (131). Dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularında kontrol grubundan farklı olarak primordiyal ve primer folliköllerin oosit sitoplazmalarında boyanma şiddeti açısından azalma ancak teka interna ve eksterna hücre tabakalarında artma olduğu izlendi. Dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında folliköllerdeki oosit sitoplazması, granülosa hücreleri ve teka interna tabakası hücrelerinde zayıf ve teka eksterna hücre tabakasında ise yoğun boyanma izlendi. Ancak böbrek kapsülü altındaki kan damarlarında, folliköllerini çevreleyen kan damarlarında ve böbrekle komşu alanlardaki kan damarlarında PDGF- $\alpha$  proteininin immüno lokalizasyonunun dikkat çekici şekilde yoğun olduğu gözlemlendi. Real Time-PCR sonuçlarına göre PDGF- $\alpha$  gen ekspresyonunun, dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularında istatistiksel olarak anlamlı olmayan çok az artış gösterdiği ( $p>0,05$ ) izlendi. Bu artışın, immünohistokimyasal bulgularla karşılaştırdığımızda primordiyal ve primer folliköllerin oosit sitoplazmasında azalma ve teka interna ve eksterna hücre tabakalarında gözlenen protein ekspresyonundaki artışla ilişkili olarak meydana geldiği düşünülebilir. Dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma izlendi ( $p>0,05$ ). Bu azalmanın ise, immünohistokimyasal bulgularla karşılaştırdığımızda tüm gelişim aşamalarındaki folliköllerin oosit, granülosa ve teka interna hücre tabakasında gözlenen protein ekspresyonundaki azalma ile ilgili olduğu düşünülebilir. Yara iyileşmesi ve anjiogenezde de rol üstlenen bu proteinin, heterotopik transplantasyon sonrasında ekspresyonunun artmasını beklemek doğaldır. Her ne kadar PDGF- $\alpha$  gen ekspresyonu, transplante edilen grupta azalsa da böbrek dokusuyla beraber histolojik takibi yapılan dokulardaki immünohistokimyasal veriler, böbrekle komşu alanlar ve böbrek kapsülünde protein ekspresyonunun yoğun olduğunu göstermektedir. Transplante edilen dokular mRNA izolasyonu için hazırlanırken böbrek kapsülü ve böbrek dokusundan dikkatlice arındırıldığı için bu bölgelerde eksprese olan PDGF- $\alpha$  geninin RT-PCR sonucu içinde değerlendirilemediği göz önünde bulundurulmalıdır. Kontrol ve çalışma grupları arasında gerek protein gerekse mRNA ekspresyonlarında izlenen

bu farklılığın, vitrifikasyon yönteminin ve transplantasyon sonrasında dokunun yeniden toparlanması süresince PDGF'lerin de içinde bulunduğu sinyal yollarında henüz tanımlanmamış ya da fark edilmeyen birtakım moleküler değişikliklerden oluşabileceği düşünülebilir. PDGF ligand ve reseptörleri, primordiyal folliküllerin seçilip daha ileri folliküler gelişim aşamalarına değişiminde, granülosa ve teka hücrelerinin proliferasyonu ve şekillenmesinde önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir. İmmünohistokimyasal incelemede, her ne kadar transplante ettiğimiz dondurulmuş-çözülmüş ovaryum dokularında transplantasyondan 17 gün sonra folliküllerin oositlerinde ve folliküler hücrelerde PDGF- $\alpha$  proteininin ekspresyonunda azalma gözlenirse de bu azalışın folliküllerin gelişimini etkileyecek düzeyde olmadığı farkedilmiştir. Kontrol ve çalışma gruplarında PDGF- $\alpha$  gen ekspresyonlarında gözlenen değişimin istatistiksel olarak anlamsız olması ve ayrıca dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra primordiyal follikül havuzundan seçilen ve morfolojik olarak da normal izlenen çeşitli aşamalardaki folliküllerin varlığı kullandığımız vitrifikasyon protokolünün güvenilirliği hakkında bilgi vermektedir.

TGF $\beta$  üst ailesinin bir üyesi olan GDF-9, memeli ovaryumunda follikülogenez ve fertilitede önemli rolü olan parakrin faktörlerden biridir. GDF-9, oosit tarafından sentezlenir ve somatik hücre işlevi için gereklidir (90, 136, 137). GDF-9'un granülosa hücrelerinin büyümesi ve farklılaşmasında doğrudan rol aldığı, oositin olgunlaşması ve teka hücre tabakasının çoğalması ve farklılaşmasında ise dolaylı roller üstlendiği iddia edilmektedir (90, 92, 111, 136). Ovaryum dokusunda GDF-9 mRNA ve proteininin primer folliküllerin erken dönemlerinden itibaren eksprese olmaya başladığı ve follikül gelişimini takiben sekonder ve antral folliküllerin oositlerinde eksprese edildiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (90, 111, 136-139). GDF-9'un oosit içindeki bu spesifik lokalizasyonu follikülogenez ve fertilité için gerekli olduğunu düşündürmektedir (90, 138). GDF-9 eksikliğinde, folliküllerin gelişimin primer follikül safhasında kaldığı, teka hücre tabakasının şekillenmesinde ve sonuçta oositin mayotik bölünme yeterliliğinde bozulmalar olduğu bildirilmiştir. Bu veriler doğrultusunda primer folliküllerin büyümesi ve follikülogenez için GDF-9 ekspresyonunun gerekli olduğu iddia edilmiştir (136). Bazı çalışmalarda ise GDF-9 eksikliğine rağmen ovaryum dokusunda primer folliküllerin varlığı, GDF-9'un

follikülogenezdeki rolünün abartıldığını düşündürmüştür. Primer follikülün sekonder follikül safhasına değişimi, granülosa hücrelerinde çoğalmayı gerektirmektedir. GDF-9 eksikliğinde primer folliküllerin granülosa hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla proliferasyon markırlarının ekspresyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (90). Ayrıca rekombinant GDF-9 kullanımının ratlarda preantral folliküllerin büyümesi ve granülosa hücrelerinde östrojen üretimini uyardığı bildirilmiştir (136). Bu veriler GDF-9'un, primer ve sekonder folliküller arasındaki değişime, granülosa hücre proliferasyonunu uyarması yoluyla dolaylı etki ettiğini göstermektedir (137). GDF-9'un direkt ya da dolaylı olarak oositin canlılığını (111, 137), folliküllerin büyümesini (90, 136) ve teka hücre tabakasının iyileşmesini (90) desteklediği bildirilmiştir. Hatta düşük seviyede GDF-9 ekspresyonunun kötü kaliteli oosit ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir (111). Wang ve arkadaşları yenidoğan fare ovaryumlarında kültür ve transplantasyon yöntemlerinin folliküllerin büyümesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada; oosit ve granülosa hücrelerinin kalitesini, içinde GDF-9'un da bulunduğu bazı genlerin protein ve mRNA ekspresyonlarının analizi yardımıyla değerlendirmişlerdir (111). Ovaryum dokularının immünohistokimyasal analizi sonucunda, GDF-9 proteininin ekspresyonunun spesifik olarak oosit sitoplazmasında olduğu izlenmiştir. Kontrol ve çalışma gruplarında, primordiyal folliküllerin oositlerinde boyanma izlenmediği, ancak primer follikül aşamasında orta şiddette ve diğer gelişim aşamalarında olan folliküllerin oositlerinde yüksek şiddette boyanma olduğunu rapor etmişlerdir. Gerek kültüre alınmış ovaryum dokularında gerekse transplante edilmiş ovaryum dokularında GDF-9 immüno lokalizasyonu eşit yoğunlukta bulunmasına rağmen kültüre alınmış ovaryum dokularında GDF-9 mRNA ekspresyonunun düşük olduğu görülmüştür. Transplante edilen ovaryum dokularının GDF-9 mRNA ekspresyonunun *in vivo* ovaryum dokularına nazaran daha düşük seviyede olduğu ancak istatistiksel olarak önemli olmadığı rapor edilmiştir. GDF-9 ve incelenen diğer genlerin ekspresyon seviyelerini dikkate alarak, transplantasyon yönteminin ovaryum dokusunun gelişimini kültür yöntemlerinden daha çok desteklediğini iddia etmişlerdir (111). David ve arkadaşları (139) ise dondurulup çözüldükten sonra ksenotransplantasyonu yapılmış insan ovaryum dokularında büyüme faktörlerinin immünohistokimyasal lokalizasyonlarını araştırdıkları çalışmada, kontrol grubunda primer ve sekonder folliküllerin oosit sitoplazmalarında

GDF-9 proteininin boyanmasının pozitif olduğu, bazı primordiyal folliküllerinde GDF-9 proteinini eksprese ettiklerini rapor etmişlerdir. Dondurulup-çözölmüş ve dondurulup-çözöldükten sonra transplante edilmiş ovaryum dokularında da farklı folliküler aşamalarda oositlerin sitoplazmasında GDF-9 protein ekspresyonunun benzer olduğu bildirilmiştir (139). Bu çalışmada kullandığımız vitrifikasyon protokolünün oosit kalitesi üzerine olan etkisini belirlemek için GDF-9'un protein ve mRNA ekspresyonunu kontrol ve çalışma gruplarında inceledik. Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında GDF-9 proteininin, primer folliküllerin oositlerinde zayıf, sekonder ve antral folliküllerin oosit sitoplazmalarında orta şiddette ve folliküllerin granülosa hücrelerinde ise zayıf şiddette boyandıklarını tespit ettik. Primordiyal folliküllerin oosit sitoplazması ve folliküler hücrelerinde ise boyanma izlenmedi. Dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularında GDF-9 protein ekspresyonunun, kontrol grubuna benzer şekilde primer, sekonder ve antral folliküllerin oosit sitoplazmalarında ve granülosa hücrelerinde olduğu ve boyanma şiddetlerinin aynı olduğu gözlemlendi. İmmünohistokimyasal işaretlemeyle elde edilen bulgularımızın Wang (111) ve David (139) bulgularıyla benzer olduğu izlendi. Dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında, follikülerdeki GDF-9 protein ekspresyonunda azalma olduğu ancak granülosa hücreleri ile temasta olan zona pellusidada ise orta şiddette boyanma olduğu izlendi. Real Time-PCR sonuçlarına göre GDF-9 gen ekspresyonunun, dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gösterdiği tespit edildi ( $p>0,05$ ). Bu veri, immünohistokimyasal bulgularla birlikte değerlendirildiğinde; mRNA ekspresyonunda izlenen, istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışın, protein ekspresyonunda gözle görünür bir değişim oluşturmadığını göstermektedir. Dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise, istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma izlendi ( $p>0,05$ ). Bu veri, immünohistokimyasal bulgularla birlikte değerlendirildiğinde; GDF-9 mRNA ekspresyonunda izlenen istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalmanın çeşitli gelişim aşamalarındaki oositlerin sitoplazmalarında olduğunu göstermektedir. GDF-9 ekspresyonunun primer ve sekonder folliküller arasındaki değişime olan etkileri ve eksikliğinde folliküllerin primer follikül aşamasında kalmaları göz önünde bulundurularak veriler değerlendirilmelidir. Elde ettiğimiz immünohistokimyasal, RT-

PCR ve morfolojik veriler beraber değerlendirildiğinde, ovaryum dokularının dondurulması ve dondurulup-çözölmüş dokunun transplante edilmesi sonrasında GDF-9 aktivitesinde ve follüköllerin gelişmesinde bir aksama olmadığını düşöndürmektedir.

Ve-kaderinler, kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyonundan sorumlu transmembran glikoproteinler olan kaderin ailesinin bir üyesidir (102). Ve-kaderin eksikliğinde hücre-hücre adezyonunda bozulmalar, damar geçirgenliğinde artış, lökosit göçünde artış, damarlarda kırılgnalık ve kanamalar olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (104). Bu veriler, VE-kaderinlerin ekspresyonlarının endotel hücre biyolojisinde, dolayısıyla anjiyogenez sürecinde vazgeçilmez adezyon molekölü olduğuna işaret etmektedir (102, 103, 104, 140). Transmembran bir glikoprotein olan Ve-kaderin'in hücre yüzeyinde yerleşik ekstraselöler domaini, hücreler arasındaki sıkı bağlantıları desteklerken, sitoplazmik domainin aktin hücre iskeletiyle olan birlikteliği sayesinde hücrelerarası geçirgenlik ve hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesinde görev aldığı düşünölmektedir (140). Korpus luteumun içerisinde şekillenen damarların varlığını devam ettirmesi, işlevlerinin korunması için gereklidir (141). Ovaryumda follüköler gelişim ve korpus luteum oluşumu için ise yeni damar oluşumu ve damarların gelişimi oldukça önemlidir (142). Anjiyogenez sırasında ekstraselöler matriks yıkımı, endotel hücrelerinde tomurcuklanma, proliferasyon ve göç, damar yapılarının oluşumu, olgunlaşması ve kapiller ağı kurulması gibi oldukça kompleks bir süreci içerir (140). Transgenik deney modelleriyle yapılan çalışmalarda Ve-kaderin yokluğunda anjiyogenez oluşumu sırasında yaşanan aksaklıklar nedeniyle embriyolarda ciddi ölümcöl defektler oluştuğu rapor edilmiştir (140, 141). Ayrıca korpus luteum oluşumunda şekillenen anjiyogenez sürecinde rol alan faktörlerin anlaşılması ovaryum döngüsünün dolayısıyla fertilitenin anlaşılması için gereklidir (142). Nakhuda ve arkadaşları gonadotropin varlığında korpus luteum oluşumu ve anjiogenezi araştırdıkları çalışmada, Ve-kaderinlerin ovaryum dokusunda anjiogenez için gerekli olduğunu göstermişlerdir (140). Çalışmalarında, anjiogenez süresince Ve-kaderinlerin işlevini bloke eden E4G10 antikoru kullanmışlardır. E4G10 hali hazırda var olan damar yapılarındaki ara bağlantıları bozmadan endotel hücreleri arasındaki yeni bağlantıların oluşumuna izin vermediği için anjiogenezi engelleyen spesifik bir moleküldür. Kontrol grubu dokularında Ve-kaderinin teka hücre tabakasında ve luteal



kan damarlarında lokalize olduğu bildirilmiştir. E4G10 antikoru kullanılarak Ve-kaderinin nötralize edilmesi sonrasında, korpus luteumda anjiogenezin engellendiği ancak daha önce varolan damar yapılarında bozulma olmadığı ve Ve-kaderin antikoru kullanılarak protein ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir (140). Bu çalışmada, immünohistokimyasal ve RT-PCR yöntemleriyle kontrol ve çalışma gruplarında Ve-kaderin protein ve mRNA ekspresyonları da incelendi. Kontrol grubuna ait ovaryum doku gruplarında, Ve-kaderin protein ekspresyonunun sekonder ve antral folliküllerin teka eksterna tabakasında yoğun şiddette boyandığını izledik. Bu folliküllerin granülosa hücrelerinde ise çok zayıf şiddette boyandığı görüldü. Folliküler arasında dağılım gösteren bazı stromal hücrelerde yoğun şiddette ve kan damarlarında ise orta şiddette boyanma izlendi. Bu verilerimiz Ve-kaderin proteininin Nakhuda'nın (140) ileri sürdüğü teka hücre tabakasında dağılım gösterdiği bulgusu ile benzerlik göstermektedir. Her iki çalışma grubunda da kontrol grubuna benzer şekilde, sekonder ve antral folliküllerin teka eksterna tabakasında, granülosa hücrelerinde, stromal hücre ve kan damarlarında kontrol grubuna benzer şekilde ve şiddette Ve-kaderin proteini ekspresyonu izlendi. Ancak transplantasyonu yapılan grupta böbrek kapsülü içindeki ve böbrekle komşu alanlardaki endotel hücrelerinde Ve-kaderin ekspresyonunun sırasıyla orta ve yoğun şiddette olduğu izlendi. Real Time-PCR yöntemiyle incelenen Ve-kaderin gen ekspresyonunun, çalışma gruplarında kontrol grubuna göre çok az azalma ile ifade edildiği görüldü. Bu bulguyu protein ekspresyonları ile birlikte değerlendirdiğimizde, Ve-kaderin protein ekspresyonunun gruplar arasında izlenen boyanma şiddeti açısından farklılık olmaması ile uyumlu olduğu izlenmiştir. Endotel hücrelerinde adezyon özellikleri nedeniyle anjiyogenez sürecinde gerekli olduğu bilinen Ve-kaderinin (141, 142), transplante edilen ovaryum dokularında ekspresyonunun kontrol grubuyla neredeyse aynı çıkması, dokunun yeniden damarlanması düşünüldüğünde beklenen bir sonuç değildi. Daha önce de belirttiğimiz gibi transplante edilen ovaryum dokularından total RNA izolasyonu yapılırken deneklerin böbrek dokularının değerlendirilmeye alınmaması için stereomikroskop altında ovaryum dokuları böbrek dokusundan dikkatlice arındırıldı. Ve-kaderin proteininin yoğun boyandığı böbrekle komşu alanların ve böbrek kapsülünde bulunan endotel hücrelerinin RNA'larının transplante edilen dokularda gen ekspresyonunun araştırılmasında değerlendirilemediği dolayısıyla gen ekspresyonunun çok az bir

azalma ile neredeyse aynı çıktığı düşünülebilir. Ayrıca, Ve-kaderin proteininin follikül gelişimi sırasında sadece sekonder ve antral folliküllerin teka hücre tabakasındaki endotel hücrelerde eksprese olduğu dikkate alınır, transplante edilen dokularda sekonder ve antral folliküllerin kontrol grubuna nazaran sayıca daha az oranda bulunmaları Ve-kaderin gen ekspresyonunu etkilemiş olabilir. Diğer taraftan, dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra, avasküler transplantasyonu yapılan dokunun canlılığını korumuş olması ve morfolojik olarak normal izlenen çeşitli aşamalardaki folliküllerin varlığını korumuş olması dokunun yeniden damarlandığını kanıtlamaktadır.

Endotel hücrelerinde hücre-hücre temas bölgelerinde eksprese olan ve endotel hücre göçü, vaskülogenez, anjiyogenez, apoptoz ve yara iyileşmesi (97, 99) gibi birçok biyolojik süreçle ilişkili olan Pecam-1, birçok çalışmada anjiogenezin belirlenmesinde kullanılan endotel hücrelerine özgü spesifik belirleyicilerden biridir (101, 143). Endotel hücrelerince eksprese edilen Pecam-1 proteini aynı zamanda hücre-hücre adezyonuna da aracılık eder. Ovaryum dokusundaki Pecam-1 ekspresyonu daha çok, kullanılan deneysel protokollerin ya da uygulanan tedavi yöntemlerinin folliküllerin gelişimi üzerine olan etkilerini anjiogenez bağlamında incelemek için araştırılmaktadır. Bilindiği gibi ovaryum dokusunda follikülogenez ve korpus luteum oluşumu teka hücre tabakasında lokalize olan anjiogenik ağın gelişimine bağlıdır (140, 143, 144). Skrtic ve arkadaşları rat ovaryumlarında yaptıkları bir çalışmada; preantral ve antral folliküllerin kan damar ağı ile çevrelenmiş teka hücre tabakasında bulunan endotel hücrelerinde ve korpus luteum içindeki kan damarlarının endotel hücrelerinde Pecam-1'in pozitif boyandığını rapor etmişlerdir (143). Primordiyal ve erken gelişim aşamasında bulunan folliküller, oksijen ve besin ihtiyaçlarını stromal kan damarlarından karşılar ve kan damarı içermezler. Bu nedenle Pecam-1 ekspresyonunun ovaryum dokusunda, preantral ve antral folliküllerin teka hücre tabakası ve korpus luteum kan damarlarıyla sınırlı olduğu bildirilmiştir (143). Benzer şekilde primatlarda folliküler gelişim süresince anjiogenezin araştırıldığı başka bir çalışmada, folliküler gelişimin erken safhalarında folliküllerin çevresindeki endotel hücrelerinde Pecam-1 protein ekspresyonunun olmadığı bildirilmiştir (144). Aynı çalışmada, Pecam-1 protein ekspresyonunun 4'ten fazla granülosa hücre tabakası içeren folliküllerde izlenmeye başladığı, özellikle geç sekonder ve tersiyer follikül

aşamalarında boyanmanın daha şiddetli olduğu rapor edilmiştir (144). Rahimi ve arkadaşları çeşitli kriyoprezervasyon yöntemleri ile dondurulmuş ve ksenotransplantasyonu yapılan insan ovaryum dokularında yeniden damarlanmayı araştırdığı çalışmada, transplantasyon öncesinde kontrol ve dondurulmuş dokularda Pecam-1 boyanmasının olmadığını bildirmiştir (145). Ancak ksenotransplantasyon işleminden 3 gün sonra ovaryum dokularında Pecam-1 boyanmasının pozitif olduğu görülmüş ve doku parçalarında anjiogenezin transplantasyonun ardından başladığını rapor etmişlerdir (145). Aynı çalışmada dondurma protokollerinden bağımsız olarak transplantasyonun 4. haftasında kan damarlarında Pecam-1 boyanmasının arttığı ve sonuç olarak transplantasyon sonrasında yeniden damarlanma sürecinin, kullanılan dondurma protokollerinden bağımsız olduğu ve follikül kalitesini etkilemediği iddia edilmiştir (145). Bu çalışmada kontrol grubuna ait ovaryum doku gruplarında, sekonder ve antral follikül aşamasında bulunan folliküllerin teka eksterna tabakasındaki endotel hücrelerinde Pecam-1 proteinini izledik. Primordiyal, primer folliküller ve folliküller çevresindeki kan damarlarında protein ekspresyonu izlenmedi. Bu verilerimiz daha önce çeşitli türlerde yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (140, 143, 144). Çalışma gruplarında da kontrol grubuna benzer şekilde; sekonder ve antral folliküllerin teka eksterna tabakasındaki endotel hücrelerinde Pecam-1 proteinini izlendi. Primordiyal, primer folliküller ve folliküller çevresindeki kan damarlarında protein ekspresyonu izlenmedi. Pecam-1 proteininin gerek kontrol gerekse çalışma gruplarındaki boyanma yoğunluğunda fark gözlenmedi. Ancak transplantasyon yapılan grupta böbrek kapsülü içindeki ve böbrekle komşu alanlardaki bazı endotel hücrelerinde Pecam-1 ekspresyonunun yoğun şiddette olduğu izlendi. Real Time-PCR sonuçlarına göre Pecam-1 gen ekspresyonunun, çalışma gruplarında kontrol grubuna göre nerdeyse hiç değişmediği izlendi. Bu bulgu immünohistokimyasal verilerimizle karşılaştırdığında, Pecam-1 protein ekspresyonunda gruplar arasında izlenen boyanma şiddeti açısından farklılık olmamasıyla uyumludur. Transplante edilen ovaryum dokularında, anjiogenik belirleyici olan Pecam-1 gen ekspresyonunun kontrol grubuyla aynı çıkması dokunun yeniden damarlanması düşünüldüğünde beklenen bir sonuç değildi. Bu sonuç, Pecam-1 protein ekspresyonunun yoğun izlendiği böbrekle komşu alanlarda ve böbrek kapsülünde bulunan endotel hücrelerin değerlendirilememiş olmasından kaynaklanabilir. Total RNA izolasyonu sırasında,

transplante edilen dokular mRNA izolasyonu için hazırlanırken böbrek kapsülü ve böbrek dokusundan dikkatlice arındırılmaya çalışılmış, dolayısıyla bu bölgelerde eksprese olan Pecam-1 geni RT-PCR sonucu içinde değerlendirilememiştir. Pecam-1 proteininin follikül gelişimi sırasında sadece sekonder ve antral folliküllerin teka hücre tabakasındaki endotel hücrelerde eksprese olduğu dikkate alınır, transplante edilen dokularda sekonder ve antral folliküllerin kontrol grubuna nazaran daha az oranda bulunmaları Pecam-1 gen ekspresyonunu etkilemiş olabilir. Bunların dışında, dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra primordiyal follikül havuzundan seçilen ve morfolojik olarak da normal izlenen çeşitli aşamalardaki folliküllerin var olması her ne kadar Pecam-1 gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre değişim izlenmese de avasküler transplantasyonu yapılan dokunun yeniden damarlandığını kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak, oosit kalitesi ve follikül gelişiminde rol alan PDGF- $\alpha$  ve GDF-9 protein ve gen ekspresyonları çalışma gruplarında da tespit edildi. Gen ekspresyonlarının uygulanan işlemlerden istatistiksel olarak etkilenmediği gösterildi. Anjiyogenez ve yara iyileşmesinde görev alan Ephrin B1, Ve-kaderin ve Pecam-1 protein ve gen ekspresyonları kontrol ve çalışma gruplarında tespit edildi. Yapılan stereomikroskopik, ışık mikroskopik değerlendirmelerde ve immünohistokimyasal bulgularda, transplante edilen ovaryum dokularının damarlandığı gösterildi. Anjiyogenezin özellikle böbrek kapsülü altında ve böbrekle komşu alanlarda şekillendiği stereomikroskopik (Şekil 5.3 D, F), ışık mikroskopik (Şekil 5.4 D, E) ve immünohistokimyasal (5.8 D, E) bulgularla gösterilmiştir. Transplante edilen gruplarda, protein ekspresyonları immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilen bu genlerin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da gen ekspresyonlarının düşük çıkması, RNA izolasyonu sırasında anjiyogenezin gerçekleştiği bu alanların değerlendirilmeye alınamamasından kaynaklanmıştır. Ancak vitrifikasyon sonrası dokulardaki gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı değişmemiş olduğu tespit edildi. Kontrol ve çalışma grupları arasında, Ephrin B1, PDGF- $\alpha$  ve GDF-9 protein ve mRNA ekspresyonlarında artma ve azalma şeklinde gözlenen değişiklikler izlendi. İncelenen moleküllerin, vitrifikasyon sonrası ekspresyonlarında izlenen artma ve transplantasyon sonrası ekspresyonlarında izlenen azalmanın; *in vitro* şartlarda işlem gören, çeşitli kimyasallara maruz kalan ve -196 °C’de saklanan dokularda bir takım

moleküler değişikliklere yol açtığı ve ekspresyonlarında görev alan bir takım sinyal mekanizmalarını etkilediği açıktır. Yapılan literatür çalışmasında, Ephrin B1 geninin folliküllerde eksprese olduğu ilk bizim çalışmamızla gösterilmiştir. Ephrin B1'in bütün gelişim aşamalarında eksprese olmaları da dikkat çekicidir. Bu gen grubunun ait olduğu ailenin ileri tetkiklerle araştırılması ve follikülogenez ya da olası diğer süreçteki rolleri aydınlatılmalıdır. Gerek morfolojik değerlendirmelerle, gerekse Ephrin B1, PDGF- $\alpha$ , GDF-9, Ve-kaderin ve Pecam-1 genlerinin değerlendirilmesiyle ovaryum dokusunun başarılı şekilde vitrifiye edildiği ve seçilen genler açısından korunduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın devamında seçilen gen bölgeleri çalışma gruplarından elde edilecek oositlerde de belirlenmelidir. Oositlerdeki gen ekspresyonlarının belirlenmesi bu çalışmamızı tamamlayacak şekilde bilgiler verecektir. Literatür taraması da göstermektedir ki; gerek deney hayvanlarında, gerekse klinik çalışmalarda vitrifikasyon yöntemi başarılı sonuçlar vermektedir. Vitrifikasyon yöntemlerinin, gen ekspresyonu ve epigenetik temelli değişikliklere ne ölçüde etki ettiğinin belirlenmesinin kullanılan vitrifikasyon protokollerinin ve *in vitro* kültür ortamlarının iyileştirilmesinde, dolayısıyla klinik uygulamalarda yaygın ve başarılı şekilde kullanılmasına büyük katkı yapacağına inanmaktayız. Bu çalışma kapsamında fark ettiğimiz Ephrin ailesine ait ligand ve reseptörlerin ovaryum dokusu üzerine etkilerini belirleyecek ileri tetkiklerin kullanılacağı çalışmalar yapmayı planlıyoruz.

## 7. SONUÇLAR

✓ Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan dokularda kontrol grubuna göre tüm follikül gruplarında canlılık yüzdelerinde azalma olduğu gözlemlendi. Ancak primordiyal ve primer folliküllerin vitrifikasyon işlemi sonrasında daha iyi korunduğu ve kontrol grubu ile arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) izlendi. Sekonder ve antral folliküller açısından ise, çalışma grubunda kontrol grubuna oranla sağlam folliküllerde görülen azalmanın istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) olduğu tespit edildi.

✓ Taze ve vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının heterotopik otoplastasyonunun 17. gününde her iki gruba ait ovaryum dokuları böbrek kapsülü altında geniş hacimleriyle izlendi. Folliküllerin canlılığı açısından tüm follikül gruplarında kontrol grubuna kıyasla azalma izlendi. Primordiyal, primer ve antral folliküller açısından çalışma gruplarının her ikisinde de izlenen folliküler kaybın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p<0,05$ ) tespit edildi. Çalışma grupları arasında, primordiyal ve sekonder folliküller açısından izlenen folliküler kaybın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) yani bu follikül gruplarının daha iyi korunduğu izlendi. Çalışma grupları arasında primer ve antral folliküllerde izlenen folliküler kaybın istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) olduğu tespit edildi. Vitrifikasyon işleminin folliküllerin canlılık kaybına olan etkisinin yaklaşık %9 olduğu tespit edildi. Folliküler kayıplarda, dondurma işleminden ziyade transplantasyon sonrasında oluşan iskeminin etkin olduğu tespit edildi.

✓ Kontrol ve çalışma gruplarında Ephrin B1 geni ve proteini tespit edildi. Ephrin B1 proteininin kontrol ve çalışma gruplarında, folliküllerin oositlerinde ve granülosa hücrelerinde, teka interna ve eksterna hücre tabakasında, korpus luteum ve stromadaki kan damarlarında boyandığı tespit edildi. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularında kontrol grubuna göre tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin oosit ve granülosa hücrelerinde Ephrin B1 proteininin boyanma şiddetinin arttığı izlendi. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise folliküllerdeki Ephrin B1 boyanma şiddetinin azaldığı ancak böbrekle komşu alanlarda ve böbrek kapsülünde var olan ve yeni oluşan kan damarlarındaki ekspresyonun yoğun olduğu izlendi. Grup III'e ait tüm gelişim

aşamalarındaki folliküllerin oositlerinde çok zayıf boyanma izlenirken oositlerin zona pellusidalarında yoğun immüno lokalizasyon tespit edildi. Ephrin B1 gen ekspresyonunda, dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularında istatistiksel olarak anlamlı olmayan ( $p>0,05$ ) bir artış izlendi. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan ( $p>0,05$ ) çok az azalma izlendi.

✓ Kontrol ve çalışma gruplarında PDGF- $\alpha$  geni ve proteini tespit edildi. PDGF- $\alpha$  proteininin kontrol ve çalışma gruplarında, folliküllerin oositlerinde, granülosa hücrelerinde ve teka tabakalarında ve kan damarlarında boyanma izlendi. Bazı primordiyal, primer ve sekonder folliküllerin oosit nükleusunda güçlü boyanma olduğu izlendi. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularında kontrol grubundan farklı olarak boyanma şiddetinde primordiyal ve primer folliküllerin oosit sitoplazmalarında azalma ve ancak teka interna ve eksterna hücre tabakalarında artma tespit edildi. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise boyanma şiddetinde, follikülerin oosit sitoplazması, granülosa hücreleri ve teka interna tabakası hücrelerinde azalma ve teka eksterna hücre tabakasında artma izlendi. Böbrek kapsülü altındaki kan damarlarında, follikülleri çevreleyen kan damarlarında ve böbrekle komşu alanlardaki kan damarlarında PDGF- $\alpha$  proteininin immüno lokalizasyonunun yoğun olduğu gözlemlendi. PDGF- $\alpha$  gen ekspresyonunun, dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularında istatistiksel olarak anlamlı olmayan ( $p>0,05$ ) çok az artış gösterdiği tespit edildi. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan ( $p>0,05$ ) azalma izlendi.

✓ Kontrol ve çalışma gruplarında GDF-9 geni ve proteini tespit edildi. Kontrol ve çalışma gruplarında GDF-9 proteininin, primer, sekonder ve antral folliküllerin oosit sitoplazmalarında ve granülosa hücrelerinde boyandıklarını tespit ettik. Primordiyal folliküllerin oosit sitoplazması ve folliküler hücrelerinde boyanma izlenmedi. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularında GDF-9 protein ekspresyonu kontrol grubuna benzer şekil ve boyanma şiddetinde izlendi. Dondurulup-çözülmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise follikülerdeki GDF-9 proteininin ekspresyonunda azalma ancak granülosa hücreleri ile temasta olan zona pellusidada orta şiddette boyanma izlendi.

GDF-9 gen ekspresyonunun, dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularında istatistiksel olarak anlamlı olmayan ( $p>0,05$ ) artış gösterdiği tespit edildi. Dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan ( $p>0,05$ ) azalma izlendi.

✓ Kontrol ve çalışma grupları arasında, Ephrin B1, PDGF- $\alpha$  ve GDF-9 protein ve mRNA ekspresyonlarında, vitrifikasyon sonrası artma ve transplantasyon sonrası ise azalma izlendi. İşlemler sonrasında istatistiksel olarak önemli olmayan bu değişikliklerin, *in vitro* şartlarda işlem gören, çeşitli kimyasallara maruz kalan ve -196 °C’de saklanan dokularda bir takım moleküler değişiklikler olduğu ve değişikliklerin bu moleküllerin ekspresyonlarında görev alan bir takım sinyal mekanizmalarını etkilediği açıktır.

✓ Kontrol ve çalışma gruplarında Ve-kaderin geni ve proteini tespit edildi. Kontrol ve çalışma gruplarında Ve-kaderin proteininin, sekonder ve antral folliküllerin teka eksterna tabakasında, bu folliküllerin granülosa hücrelerinde çok zayıf şiddette boyandığı izlendi. Folliküler arasında dağılım gösteren bazı stromal hücreler ve kan damarlarında da boyanma izlendi. Ancak transplantasyonu yapılan grupta böbrek kapsülü içindeki ve böbrekle komşu alanlardaki endotel hücrelerinde Ve-kaderin ekspresyonu izlendi ve boyanmasının sırasıyla orta ve yoğun şiddette olduğu tespit edildi. Ve-kaderin gen ekspresyonunun, çalışma gruplarında kontrol grubuna göre çok az azalma ile ifade edildiği göröldü. Gruplar arasında gen ekspresyonunda gözlenen değişim istatistiksel olarak anlamlı ( $p>0,05$ ) bulunmadı.

✓ Kontrol ve çalışma gruplarında Pecam-1 geni ve proteini tespit edildi. Kontrol ve çalışma gruplarında Pecam-1 proteinini, sekonder ve antral follikül aşamasında bulunan folliküllerin teka eksterna tabakasındaki endotel hücrelerinde izledik. Dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularında ve dondurulup-çözölmüş ovaryum dokularının transplantasyonundan 17 gün sonra elde edilen ovaryum dokularında kontrol grubuna benzer şekilde ve şiddette olduğu tespit ettik. Primordiyal, primer folliküller ve folliküller çevresindeki kan damarlarında protein ekspresyonu izlenmedi. Ancak transplantasyon yapılan grupta böbrek kapsülü içindeki ve böbrekle komşu alanlardaki bazı endotel hücrelerinde Pecam-1 ekspresyonu izlendi. Pecam-1 gen ekspresyonunun, çalışma gruplarında kontrol grubuna göre neredeyse hiç değişmediği ( $p>0,05$ ) izlendi.



✓ Böbrek kapsülü altına transplante edilen ovaryum dokularında anjiyogenezin özellikle böbrek kapsülü altında ve böbrekle komşu alanlarda şekillendiği stereo ve ışık mikroskopik olarak izlendi ve immünohistokimyasal işaretlemelerle gösterildi. Transplante edilen gruplarda anjiyogenez ve yara iyileşmesinde görev alan Ephrin B1, Ve-kaderin ve Pecam-1 gen ekspresyonlarının düşük çıkması, RNA izolasyonu sırasında anjiyogenezin gerçekleştiği bu alanların değerlendirilmeye alınamamasından kaynaklandı.

✓ Gerek morfolojik değerlendirmelerle, gerekse Ephrin B1, PDGF- $\alpha$ , GDF-9, Ve-kaderin ve Pecam-1 genlerinin değerlendirilmesiyle, ovaryum dokusunun başarılı şekilde vitrifiye edildiği ve seçilen genler açısından korunduğu tespit edildi.

## 8. KAYNAKLAR

1. Vayena E, Rowe PJ, Griffin PD (2002) Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction. Geneva. World Health Organization;2002.
2. Chuai Y, Xu X, Wang A (2012). Preservation of Fertility in Females Treated for Cancer. *Int J Biol Sci.* 8(7):1005-1012.
3. Von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, Keros V, Maltaris T, Montag M, Salle B, Sonmezer M, Andersen CY (2009). Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy a technique in its infancy but already successful in fertility preservation. *Eur J Cancer*;45:1547–1553.
4. Nicosia SV, Matus-Ridley M and Meadows AT (1985). Gonadal effects of cancer therapy in girls. *Cancer.* 55:2364-2372.
5. Schmidt KT, Larsen EC, Andersen CY and Andersen AN (2010). Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease. *BJOG* 117:163-174.
6. Revel A, Revel M, Laufer N, Kasher A (2011). New possibilities resulting from oocyte banking. *Harefuah.* Jun;150(6):524-7, 551.
7. Oktay K, Oktem O (2009). Fertility preservation medicine: a new field in the care of young cancer survivors. *Pediatr Blood Cancer.* 53(2): 267-273.
8. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P (2011). Cancer and fertility: strategies to preserve fertility. *Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2009. Reproductive BioMedicine Online* 22, 232– 248.
9. Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RM (1996). Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod.* 11:1268-1272.
10. Hreinsson JG, Ojala M, Fridstrom M, Borgstrom B, Rasmussen C, Lundqvist M, Tuuri T, Simberg N, Mikkola M, Dunkel L (2002). Follicles are found in the ovaries of adolescent girls with Turner's syndrome. *J. Clin. Endocrinol Metab.* pp. 3618-3623.
11. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A (2004). Livebirth after orthotopic

- transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 364:1405-1410.
12. Kirsten TM, Annette KJ, Anne L, Erik E, Claus YA (2014). Treatment history and outcome of 24 deliveries worldwide after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue, including two new Danish deliveries years after autotransplantation. *J. Assist Reprod Genet* 31:1557–1564 DOI 10.1007/s10815-014-0331-z.
  13. Karlsson JO, Toner M (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 17:243-256.
  14. Mullen SF, Critser JK (2007). The science of cryobiology. *Cancer Treat Res*. 138:83-109.
  15. Lornage J, Salle B (2007). Ovarian and oocyte cryopreservation. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 19:390-394.
  16. Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B, Lundqvist M, Hovatta O (2011). Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue *Hum Reprod*. pp. 594-603.
  17. Kuwayama M (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The CryoTop method. *Theriogenology* 67, 73-80.
  18. Nawroth F, Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, Liebermann M, Tucker MJ, Liebermann J (2005). Cryopreservation *in* assisted reproductive technology: new trends. *Semin Reprod Med*. Nov;23(4):325-35.
  19. Shaw JM, Jones GM (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedure for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, Vol.9, No.6 pp. 583±605.
  20. Baust, JG, Gao, DY, Baust, JM (2009). Cryopreservation An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 5:3, 90-96.
  21. Mazur P (2004). Principles of cryobiology. Life in the frozen state. Boca Raton. CRC Press. 4-55.
  22. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*. 53:59-72.
  23. Orief Y, Schultze-Mosgau A, Dafopoulos K, AI-Hasani S (2005). Vitrification: Will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? Middle

- East Fertility Society Journal. 10, 171-184.
24. Mazur P (1963). Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol.* 47:347-369.
  25. Pegg DE (2007). Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 368:39-57.
  26. Pegg DE, Hunt CJ, Fong LP (1987). Osmotic properties of the rabbit corneal endothelium and their relevance to cryopreservation. *Cell Biophys.* 10:169-189.
  27. Pegg DE (2010). The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology.* 60:S36-44.
  28. Kedem O, Katchalsky A (1958). Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim Biophys Acta.* 27:229-246.
  29. Zhang JM, Li LX, Liu XL, Yang YX, Wan XP (2009). Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. *J Assist Reprod Genet.* 26:137-142.
  30. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T (1990). A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil.* 89:91-97.
  31. Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO (2001). Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 43:21-31
  32. Rall WF, Fahy GM (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 313(6003): 573-5.
  33. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod;* 67:1671-1680.
  34. Hovatta O (2005). Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online.* 10:729-734.
  35. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology.* 21:407-426.

36. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K (2001). Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop container less technique. *Fertil. Steril.* 76, 618–620.
37. Mazur P (1970). Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science.* 168(934): 939-949.
38. Kierszenbaum AL (2006). (Çeviri editörü: Demir R.) *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş.* Palme yayıncılık ISBN: 9944-341-02-9, Sayfa: 23-35.
39. Johnson M, Everitt B (1988). *Essential Reproduction.* Blackwell Scientific Publications, Third edition, ISBN: 0-632-02183-7, Sayfa: 75-101.
40. Gougeon A (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17:121-155.
41. Delilbaşı L, (Editör) (2008). *İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri,* Güneş Tıp Kitapevleri ISBN: 978-975-277-169-7, sayfa: 85-105.
42. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 7:1342-1346.
43. Çolgar U (2006). *Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite.* İstanbul Medikal Yayıncılık 1. Baskı ISBN: 975-6395-65-6, Sayfa: 9-29.
44. Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN, Choe S, Pollard TD (2001). Crystal Structure of Arp2/3 Complex. *Science Vol 294:* 1679-1684, 23 November.
45. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell.* Garland Publishing 4. baskı. ISBN: 0815332181, sayfa 907-982.
46. Erickson GF (1993). Normal regulation of ovarian androgen production. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 11: 307-312.
47. Şeftalioğlu A (1998). *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi.* Tıp&Teknik Yayıncılık Ltd. Sti. 3. baskı, ISBN: 975-94823-1-2, Sayfa: 7-86.
48. [http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci\\_repro/lab/lab3/lab3\\_win/primor\\_1\\_2\\_fo1.html](http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lab/lab3/lab3_win/primor_1_2_fo1.html). 30.10.2014; saat 15:30.

49. Mamsen LS, Brochner CB, Byskov AG and Mollgard K (2012). The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *Int J Dev Biol.* 56:771-778.
50. Ding J, Jiang D, Kurczy M, Nalepka J, Dudley B, Merkel EI, Porter FD, Ewing AG, Winograd N, Burgess J, Molyneaux K (2008). Inhibition of HMG CoA reductase reveals an unexpected role for cholesterol during PGC migration in the mouse. *BMC Dev Biol.* 8:120.
51. Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C, Heasman J (1994). Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120, 135-141.
52. Sadler WT (2005). (Çeviri: Başaklar AC.). *Langman Medikal Embriyoloji* Palme Yayıncılık, Dokuzuncu Baskı. ISBN: 975-8982-12-5, sayfa: 3-50.
53. Byskov AG, Hoyer PE, Yding Andersen C, Kristensen SG, Jespersen A and Mollgard K (2011). No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life. *Hum Reprod.* pp. 2129-2139.
54. Gougeon A (2010). Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol.* 71:132-143.
55. Jensen JR, Morbeck DE Coddington CC (2011). 3rd. Fertility preservation. *Mayo Clin Proc.* 86:45-49.
56. Beck-Peccoz P, Persani L (2006). Premature ovarian failure. *Orphanet J Rare Dis.* 1:9.
57. Jadoul P, Dolmans MM, Donnez J (2010). Fertility preservation in girls during childhood: is it feasible, efficient and safe and to whom should it be proposed? *Hum Reprod Update.* 16(6): 617-630.
58. Aittomaki K, Herva R, Stenman UH, Juntunen K, Ylostalo P, Hovatta O, de la Chapelle A (1996). Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:3722-3726.
59. Salama M, Winkler K, Murach KF, Seeber B, Ziehr SC, Wildt L (2013). Female fertility loss and preservation: threats and opportunities. *Annals of*

- Oncology 24: 598–608.
60. Meirrow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, Raanani H, Levron J, Fridman E (2007). Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod.* 22:1626-1633.
  61. Oktem O, Oktay K (2007). Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer.* 110:2222-2229.
  62. Meirrow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH (2010). Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol.* 53:727-739.
  63. Desmeules P, Devine PJ (2006). Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. *Toxicol Sci.* 90:500–509.
  64. Yucebilgin MS, Terek MC, Ozsaran A, Akercan F, Zekioglu O, Isik E, Erhan Y (2004). Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: An animal model of premature ovarian failure and infertility. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 44:6–9.
  65. Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW (2003). The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod.* 18:117-121.
  66. Hovatta O (2003). Cryobiology of ovarian and testicular tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 17:331-342.
  67. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K (2012). Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 26;391–405.
  68. Yeomanson DJ, Morgan S, Pacey AA (2013). Discussing fertility preservation at the time of cancer diagnosis: dissatisfaction of young females. *Pediatr Blood Cancer.* Dec;60(12):1996-2000.
  69. Silber SJ, Woodruff TK, Shea LD (2010). To transplant or not to transplant - that is the question. *Cancer Treat Res.* 156: 41–54.
  70. Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC (1984).

- Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril*. 42:293-296.
71. Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, Picton HM, Plancha C, Shea LD, Stouffer RL, Telfer EE, Woodruff TK, Zelinski MB (2010). Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update*. 16:395-414.
  72. Dolmans MM, Demylle D, Martinez-Madrid B, Donnez J (2005). Efficacy of *in vitro* fertilization after chemotherapy. *Fertil Steril*. 83:897-901.
  73. Pena JE, Chang PL, Chan LK, Zeitoun K, Thornton MH (2002). 2nd and Sauer MV. Supraphysiological estradiol levels do not affect oocyte and embryo quality in oocyte donation cycles. *Hum Reprod*. 17:83-87.
  74. Sonmezer M, Oktay K (2004). Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update*. 10:251-266.
  75. Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones HW Jr, Muasher SJ, Lanzendorf SE (1995). Evaluation of the spindle apparatus of *in-vitro* matured human oocytes following cryopreservation. *Hum Reprod*. 10:1816-1820.
  76. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, Ernst E, Luyckx V, Andersen CY (2013). Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril*. May; 99(6): 1503-13.
  77. Mussett MV, Parrott DM (1961). Factors affecting the fertility of mice with orthotopic ovarian grafts. *J Reprod Fertil*. 2: 80-97.
  78. Kim SS, Soules MR, Battaglia DE (2002). Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fertil Steril*. 78:77-82.
  79. Soleimani R, Van der Elst J, Heytens E, Van den Broecke R, Gerris J, Dhont M, Cuvelier C, De Sutter P (2008). Back muscle as a promising site for ovarian tissue transplantation, an animal model. *Hum Reprod*. 23(3): 619-626.
  80. Noyes N, Knopman JM, Long K, Coletta JM, Abu-Rustum NR (2011). Fertility considerations in the management of gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol*. 120(3):326-33.



81. Oktay K (2001). Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. *Human Reproduction Update*. Nov-Dec;7(6):526-34.
82. Liu L, Wood GA, Morikawa L, Ayearst R, Fleming C, McKerlie C (2008). Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Hum Reprod*. 23(1): 122-128.
83. Migishima F, Suzuki-Migishima R, Song SY, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M, Yokoyama M (2003). Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod*. 68(3): 881-887.
84. Davy A, Soriano P (2005). Ephrin Signaling In Vivo: Look Both Ways *Developmental Dynamics* 232:1–10.
85. Kuijper S, Turner CJ, Adams RH (2007). Regulation of Angiogenesis by Eph–Ephrin Interactions. *Trends Cardiovasc Med*. Jul;17(5):145-51.
86. Egawa M, Yoshioka S, Higuchi T, Sato Y, Tatsumi K, Fujiwara H, Fujii S (2003). Ephrin B1 is expressed on human luteinizing granulosa cells in corpora lutea of the early luteal phase: the possible involvement of the B class Eph-ephrin system during corpus luteum formation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(9):4384–4392.
87. Adams RH, Klein R (2000). Eph receptors and ephrin ligands: essential mediators of vascular development. *Trends Cardiovasc Med* 10:183–188.
88. Cheng N, Brantley DM, Chen J (2002). The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:75–85.
89. [http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n3/fig\\_tab/nrc2806\\_F1.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n3/fig_tab/nrc2806_F1.html).  
31.10.2014; saat 14:55
90. Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE (2009). Roles for Transforming Growth Factor Beta Superfamily Proteins in Early Folliculogenesis. *Semin Reprod Med*. January ; 27(1): 14–23.
91. Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 67:753-791.
92. Tarumi W, Tsukamoto S, Okutsu Y, Takahashi N, Horiuchi T, Itoh MT, Ishizuka B (2012). Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence. *Fertility and*

- Sterility 97 (2): 469-76.
93. <https://www.bcm.edu/departments/pediatrics/cardiology/TGFBR2>. 30.10.2014. saat 16:40
  94. Pinkas H, Fisch B, Rozansky G, Felz C, Kessler-Icekson G, Krissi H, Nitke S, Ao A, Abir R (2008). Platelet-derived growth factors (PDGF-A and -B) and their receptors in human fetal and adult ovaries. *Molecular Human Reproduction* Vol.14, No.4 pp. 199–206.
  95. Betsholtz C (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 215–228.
  96. [http://www.rndsystems.com/cb\\_detail\\_objectname\\_SP04\\_NT\\_Platelet-DrivenGrowthFactor.aspx](http://www.rndsystems.com/cb_detail_objectname_SP04_NT_Platelet-DrivenGrowthFactor.aspx). 31.10.2014; 15:50
  97. Newman PJ (1997). The Biology of PECAM-1. *J Clin Invest*. January 1; 99(1): 3–8.
  98. Newman PJ (1994). The Role of PECAM-1 in Vascular Cell Biology *Ann N Y Acad Sci*. Apr 18;714:165-74.
  99. Lu TT, Yan LG, Madri JA (1996). Integrin engagement mediates tyrosine dephosphorylation on platelet-endothelial cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, pp. 11808-11813.
  100. Moseley GW, Jackson DE (2004). The Multiple Functions of PECAM-1. *Australian Biochemist* Vol 35 No 2.
  101. Rahimi G, Isachenko V, Kreienberg R, Sauer H, Todorov P, Tawadros S, Mallmann P, Nawroth F, Isachenko E (2010). Re-vascularisation in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 149:63–67.
  102. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science* 121, 2115-2122.
  103. Li L, Bennett SAL, Wang L (2012). Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adhesion & Migration* 6:1, 59–70.

104. Harris SE, Nelson JW (2010). VE-Cadherin: At the Front, Center, and Sides of Endothelial Cell Organization and Function. *Curr Opin Cell Biol.* 22(5): 651–658
105. [http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3409314\\_nihms363511f11&req=4](http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3409314_nihms363511f11&req=4). 31.10.2014; saat 16:00
106. Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, Hreinsson J, Hovatta O (2009). Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod.* Jul;24(7):1670-83.
107. Gougeon A (1986). Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod*; 1:81-87.
108. Wang Y, Xiao Z, Li L, Fan W, Li SW (2008). Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod.* 23:2256-2265.
109. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RM (1997). Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod.* 12:1032-1036.
110. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J (2011). Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online.* Aug;23(2):160-86.
111. Wang S, Yang S, Lai Z, Ding T, Shen W, Shi L, Jiang J, Ma L, Tian Y, Du X, Luo A, Wang S (2013). Effects of culture and transplantation on follicle activation and early follicular growth in neonatal mouse ovaries. *Cell Tissue Res.* Nov;354(2):609-21.
112. Abdi S, Salehnia M, Hosseinkhani S (2014). Evaluation of apoptosis in long-term culture of vitrified mouse whole ovaries. *Res Vet Sci.* Feb;96(1):1-4.
113. Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla SJ (2008). Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertility and Sterility\_ Vol. 90, Suppl 2, October.*
114. Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, Díaz C, Sánchez-Serrano M, Mirabet V, Pellicer A (2014). Improving ovarian tissue cryopreservation for

oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril*. Mar;101(3):775-84.

115. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB (2011). In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod*. 26:2461–72.
116. Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, Krivokharchenko A, Kreienberg R, Woriedh M, Bader M, Weiss JM (2009). Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction*. Aug;138(2):319-327.
117. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K (2012). Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. Jun;26(3):391-405.
118. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Laila JM, Balasch J (2001). Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen–thawed human ovarian tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86;4489–4494.
119. Sanchez M, Alama P, Gadea B, Soares SR, Simon C, Pellicer A (2007). Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation: long-term result. *Human Reproduction*. 22 786–791.
120. Deng X, Zheng H, Yu X, Yu H, Zhang C, Chao L, Li R, Liu W (2009). Cryopreserved ovarian tissues can maintain a long-term function after heterotopic autotransplantation in rat. *Reproduction*. Sep;138(3):519-25.
121. Harp R, Leibach J, Black J, Keldahl C, Karow A (1994). Cryopreservation of murine ovarian tissue. *Cryobiology*. 31:336–343.
122. Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M (2002). Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Hum Reprod*. Mar;17(3):605-11.
123. Salehnia M (2002). Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. *Exp Anim*. 51(5):509-12.
124. Migishima F, Suzuki-Migishima R, Song SY, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M, Yokoyama M (2003). Successful Cryopreservation of Mouse Ovaries by Vitrification. *Biol Reprod*. Mar;68(3):881-7.

125. Cox SL, Shaw J, Jenkin G (1996). Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *J Reprod Fertil.* Jul;107(2):315-22.
126. Frisén J, Holmberg J, Barbacid M (1999) Ephrins and their Eph receptors: multitalented directors of embryonic development. *EMBO J* 18:5159–5165.
127. Gale NW, Baluk P, Pan L, Kwan M, Holash J, DeChiara TM, McDonald DM, Yancopoulos GD (2001) Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol* 230:151–160.
128. Lee HS, Nishanian TG, Mood K, Bong YS, Daar IO (2008). EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. *Nat Cell Biol.*;10(8): 979–986.
129. Davy A, Aubin J, Soriano P (2004). Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev* 2004;18:572–583.
130. Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Landuyt LV, Coucke W, Devroey P, Smitz J (2013). Pregnancy Prediction in Single Embryo Transfer Cycles after ICSI Using QPCR: Validation in Oocytes from the Same Cohort. *PLoS One.* 8(4): e54226.
131. Yoon SJ, Kim KH, Chung HM, Choi DH, Lee WS, Cha KY, Lee KA (2006). Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. *Fertil Steril.* Jan;85(1):193-203.
132. Taniguchi Y, Morita I, Kubota T, Murota S, Aso T (2001). Human uterine myometrial smooth muscle cell proliferation and vascular endothelial growth-factor production in response to platelet-derived growth factor. *J Endocrinol.* 169(1):79-86.
133. Li SH, Lee RK, Chen PW, Lu CH, Wang SH, Hwu YM (2005). Differential expression and distribution of alternatively spliced transcripts of PDGF-A and of PDGF receptor-alpha in mouse reproductive tissues. *Life Sci.* 23;77(19):2412-24.
134. Nilsson EE, Detzel C, Skinner MK (2006). Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction.* Jun;131(6):1007-15.

135. Smeer LS, Taylor CC (2007). Cell-type localization of platelet-derived growth factors and receptors in the postnatal rat ovary and follicle. *Biol Reprod.* Mar;76(3):379-90.
136. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol.* Jun;15(6):854-66.
137. Yan C, Elvin JA, Lin YN, Hadsell LA, Wang J, DeMayo FJ, Matzuk MM (2006). Regulation of growth differentiation factor 9 expression in oocytes in vivo: a key role of the E-box. *Biol Reprod.* Jun;74(6):999-1006.
138. Pereira M Jr, Vidotti DB, Borra RC, Simões Mde J, Da Silva ID, Haidar MA (2011). Involvement of GDF-9, leptin, and IGF1 receptors associated with adipose tissue transplantation on fertility restoration in obese anovulatory mice. *Gynecol Endocrinol.* Oct;27(10):759-66.
139. David A, Dolmans MM, Van Langendonck A, Donnez J, Amorim CA (2011). Immunohistochemical localization of growth factors after cryopreservation and 3 weeks' xenotransplantation of human ovarian tissue. *Fertil Steril.* Mar 15;95(4):1241-6.
140. Nakhuda GS, Zimmermann RC, Bohlen P, Liao F, Sauer MV, Kitajewski J (2005). Inhibition of the vascular endothelial cell (VE)-specific adhesion molecule VE-cadherin blocks gonadotropin-dependent folliculogenesis and corpus luteum formation and angiogenesis. *Endocrinology.* Mar;146(3):1053-9.
141. Herr D, Fraser HM, Konrad R, Holzheu I, Kreienberg R, Wulff C (2013). Human chorionic gonadotropin controls luteal vascular permeability via vascular endothelial growth factor by down-regulation of a cascade of adhesion proteins. *Fertil Steril.* May;99(6):1749-58.
142. Maroni D, Davis JS (2011). TGFB1 disrupts the angiogenic potential of microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *J Cell Sci.* Jul 15;124(Pt 14):2501-10.
143. Skrtic A, Sokolic L, Borovecki A, Rosa J, Fenzl V (2011). Immunohistochemical localization of CD31, NOTCH1 and JAGGED1

proteins in experimentally induced polycystic ovaries of immature rats. *Acta Histochem.* May;113(3):262-9.

144. Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, Fraser HM (2001). Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap (A40)). *Endocrinology.* Jul;142(7):3244-54.
145. Rahimi G, Isachenko V, Kreienberg R, Sauer H, Todorov P, Tawadros S, Mallmann P, Nawroth F, Isachenko E (2010). Re-vascularisation in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Mar;149(1):63-7.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Erkan GÜMÜŞ
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD., 58140-SİVAS
Yabancı Dil	İngilizce
E-posta Adresi	erkangumus@yahoo.com

Eğitim ve Akademik Durumu	
Lise	Ereğli Süper Lisesi, 1997
Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, 2002
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD, Sivas, 2008
Doktora	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD, Sivas, 2014

İş Tecrübesi	
Cumhuriyet Üniversitesi	Araştırma Görevlisi, 2004-Halen



## EK-1

## ETİK KURUL KARARI

T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

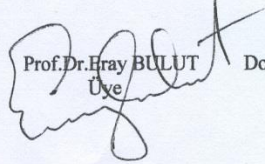
Sayı : B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/62  
Konu : Etik Kurul Kararı hk.

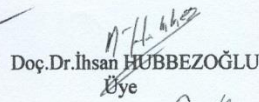
05.04.2012

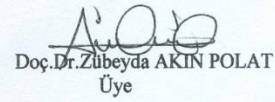
Sayın  
Prof.Dr.Celal KALOĞLU  
Tıp Fakültesi Histoloji-Embryoloji Anabilim Dalı

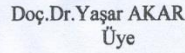
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05.04.2012 tarihinde Prof.Dr.Ömer POYRAZ başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararı almıştır.

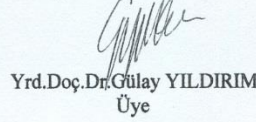
Prof.Dr.Celal KALOĞLU'nun yürütücülüğünü yapmış olduğu 30.03.2012 tarih ve 315 sayılı "Vitrifikasyon ve ototransplantasyon sonrasında fare ovaryum dokusunun morfoloji ve üreme potansiyeli açısından değerlendirilmesi" isimli Araştırma Projesi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

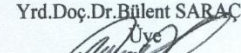
  
Prof.Dr.Eray BULUT  
Üye

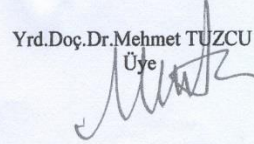
  
Doç.Dr.İhsan HÜBBEZOĞLU  
Üye

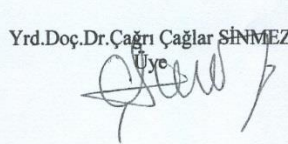
  
Doç.Dr.Zübeyda AKIN POLAT  
Üye

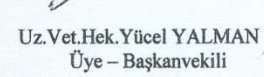
  
Doç.Dr.Yaşar AKAR  
Üye

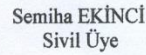
  
Yrd.Doç.Dr.Gülay YILDIRIM  
Üye

  
Yrd.Doç.Dr.Bülent SARAC  
Üye

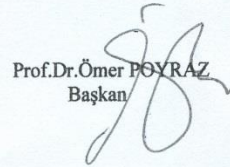
  
Yrd.Doç.Dr.Mehmet TUŞCU  
Üye

  
Yrd.Doç.Dr.Çağrı Çağlar SİNMEZ  
Üye

  
Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN  
Üye - Başkanvekili

  
Semiha EKİNCİ  
Sivil Üye

  
Turhan DUYMUŞ  
Sivil Üye

  
Prof.Dr.Ömer POYRAZ  
Başkan