

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**OVARYUM KRİYOPREZERVASYONU  
VE TRANSPLANTASYONU SONRASINDA  
FOLİKÜL KAYBI MEKANİZMALARINDA ROL ALAN  
BASKILAYICI MOLEKÜLLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Soner ÇELİK**

**Yüksek lisans tezi**

**Antalya, 2016**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**OVARYUM KRİYOPREZERVASYONU  
VE TRANSPLANTASYONU SONRASINDA  
FOLİKÜL KAYBI MEKANİZMALARINDA ROL ALAN  
BASKILAYICI MOLEKÜLLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Soner ÇELİK**

**Yüksek lisans tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
(Proje No: 2013.02.0122.03) Tarafından Desteklenmiştir.

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

**Antalya, 2016**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 08/01/2016

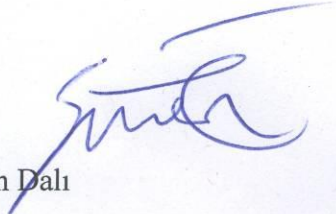
**Tez Danışmanı** : **Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ**  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



**Üye** : **Prof. Dr. Münire ERMAN AKAR**  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı



**Üye** : **Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKCU**  
Ankara Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı



**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... / ..... / ..... tarih ve ..... / ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Narin DERİN**  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doğurganlığı koruma teknikleri, kanser gibi yıkıcı kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları içeren hastalıkların tedavisi sonrasında, kısırlık ve hormonal yetmezliklerle başetmede önemli bir seçenektir. Üremeye yardımcı tekniklerin kullanıma sunduğu embriyo, oosit ve ovaryum kriyoprezervasyonu, kadın hastaların ovaryum rezervlerinin ve doğurganlıklarının, bu tedaviler öncesinde korunması için bir kolaylık sağlamaktadır. Ancak, bekâr ve pre-pubertal hastalarda kendisini en fazla kanıtlamış yöntem olan embriyo kriyoprezervasyonu seçeneği uygun değildir. Kanser tanısı sebebiyle bir an önce tedavi planına başlanması gereken hastalar için oosit toplama süreci zaman kaybına neden olmaktadır. Hormon uyarısıyla tümör dokusunu indükleme riskinin olduğu durumlarda (örneğin östrojen reseptörü pozitif olan meme kanseri olguları) ovaryum dokusu kriyoprezervasyonu tek seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır ve günümüzde bildirilmiş 60 kadar gebelik olgusu mevcuttur. Primordiyal folikülden primer foliküle geçişte, kontrollü aktive edici ve baskılayıcı rol oynayarak folikül havuzunun korunmasında rol alan sinyal yolları birbirinden bağımsız ancak dengeli bir şekilde çalışmalıdır. Baskılayıcı ve aktivatör genlerin dengeli çalışmadığı durumlarda, klinikte prematür ovaryan yetmezlik olarak bilinen, foliküllerin kitlesel aktivasyonu ile folikül havuzunun yarısından fazlasının hatta daha büyük kısmının erkenden tükenmesine sebep olmaktadır. Bununla bağlantılı olarak, ovaryum kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında geciken anjiyogenez ve oluşan hipoksi ovaryumda primordiyal folikülden primer foliküle geçişte görev alan intrinsek mekanizmaları bozuyor olabilir. Ovaryum doku kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında meydana gelen folikül kaybının nedenleri arasında foliküllerin büyümelerinin baskılanma mekanizmasının bozulmuş olabileceğini araştırdığımız bu çalışmada pTEN, Tsc1, p27 ve AMH moleküllerinin ekspresyonlarını değerlendirdik. Bulgularımız, literatüre benzer şekilde dondurulup çözme ve transplantasyon sonrasında ovaryumda primordiyal folikül havuzunun azaldığını gösterdi. pTEN, Tsc1, p27 ve AMH moleküllerinin ekspresyonlarını değerlendirdiğimizde K grubu ile DÇ grubunda bir fark gözlenmezken, T ve DÇT gruplarında bu moleküllerin pTEN, Tsc1 ve p27 ekspresyonlarının primordiyal foliküllerde, AMH ekspresyonunun ise büyüyen foliküllerde neredeyse tamamen ortadan kalktığı gözlemlendi. Ovaryum kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında, primordiyal folikülden primer foliküle geçişte rol oynayan baskılayıcı moleküllerin ekspresyonlarını araştırdığımız bu çalışma ile literatürde ilk kez bu konuyu değerlendirmiş oluyoruz. Sonuçlarımız, ovaryum doku kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında primordiyal folikül kaybı ile ilişkili sürece yeni bir yaklaşım sunmaktadır ve primordiyal folikülden primer foliküle geçişte fren mekanizmasının adeta bozulduğunu işaret etmektedir. Primordiyal folikülden primer foliküle geçişte rol oynayan aktivatörler ve baskılayıcıların bu süreçte fonksiyonel değerlendirmelerini yaptığımız yeni çalışmalar ovaryum kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu ile ilişkili süreçleri daha da aydınlayabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Kriyoprezervasyon, Ovaryan doku kriyoprezervasyonu, Primordiyal folikül aktivasyonu, p27, Tsc, AMH, pTEN

## ABSTRACT

Fertility preservation techniques are crucial options for compete with infertility and hormonal insufficiency or cancer therapies including destructive implementation such as chemotherapy and radiotherapy. Embryo, oocyte and ovarian tissue cryopreservation that offered by the use of assisted reproductive techniques are simplicity for preserving ovarian reserve of female patients for improving their fertility. However, even if embryo cryopreservation method has evidence-based methodology but not feasible for unmarried for prepubertal female patients. Oocyte pick-up process means waste of time for female cancer patients whose immediately need to start scheduling their therapy. Ovarian tissue cryopreservation is unique option in some cases of tumor tissue induction risk via hormonal stimulation (e.g. estrogen receptor positive breast cancer cases). It is already known that currently methods for cancer therapies are increased survival rate of human race. But, it's not easy to handle complications on reproductive systems. Ovarian cryopreservation is unprecedented fertility method for the group of chosen patients. Although increasing cancer incidence, a decreasing the proportion of patients who died because of cancer. Most irreversible complication from these cell destructive therapies are damages through reproductive cells and organs. Fertility preservation therapies would be offered to patients meanwhile and carry out with most feasible option and nearly 60 cases of gestation are announced to present day. It is restricted evidence based information about injury mechanisms due to retransplanting frozen tissue into body. Transitioning from primordial to primer follicle form, there are controlled activators and suppressors for balancing signalisation of reserving primordial follicle pool like a seesaw. In some cases of imbalancing these activators and suppressors, result in activation of follicles globally then burn-out high percentage of primordial follicle pool, known as "premature ovarian insufficiency" (POI) at clinically. In respect of this, late angiogenesis and period of hipoxia may damage intrinsic mechanisms of ovary. In our study, we evaluated expressions of pTEN, Tsc1, p27 and AMH molecules for asking reasons of follicle lost after ovarian tissue cryopreservation and transplantation. Our findings show that, primordial follicles are decreasing after freezing-thawing and transplantation litterateurly correlate. We criticize expressions of pTEN, Tsc1, p27 molecules for primordial follicles but growing follicles for AMH molecules. There is not much difference between K and DÇ group. Between T and DÇT group, we almost detected hardly any expressions of these molecules. With our study, we firstly point out expressions of supressor mechanisms at ovarian cryopreservation and transplantation period. Our data represents new aspects underlying process of primordial follicle activation after ovarian cryopreservation and transplantation. New functional studies about activator and inhibitor mechanisms about primordial to primer follicle transition will provide new point of view about preserving follicle pool.

**Key Words:** Cryopreservation, Ovarian tissue cryopreservation, Primordial follicle activation, p27, Tsc, AMH, pTEN

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ'ye,

Laboratuvar imkanlarını esirgemeyen ve tecrübeleriyle yol gösteren Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocalarım Prof. Dr. Alp CAN'a, Uzm. Dr. Ferda TOPAL ÇELİKKAN'a, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKCU'ya,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına, asistan arkadaşlarıma ve çalışanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak, beni yalnız bırakmayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Derya ÇELİK ve ailemin tüm üyelerine en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

**Soner ÇELİK**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xi
<b>GİRİŞ</b>	1
2.1. Ovaryumun Anatomisi	4
2.2. Ovaryumun Embriyolojisi	5
2.3. Ovaryum Histolojisi	9
2.4. Folikül Gelişimi	10
2.4.1. Primordiyal Folikül	11
2.4.2. Primer Folikül	11
2.4.3. Sekonder Folikül	13
2.4.4. Tersiyer (Graaf) Folikül	13
2.5. Ovulasyon	15
2.6. Primordiyal Folikül Seçilim Mekanizması	17
2.7. Ovaryan Doku Kriyoprezervasyonu	19
2.8. Kriyoprezervasyon Yöntemleri	21
2.8.1. Yavaş Dondurma Yöntemi	22
2.8.2. Vitrifikasyon Yöntemi	22
2.9. Kriyoprotektanlar ve Genel Özellikleri	24
2.10. Hayvanlarda Ovaryan Doku Kriyoprezervasyonu	24
2.11. İnsanlarda Ovaryan Doku Kriyoprezervasyonu	25
2.12. Ovaryum Doku Kriyoprezervasyonu İçin Endikasyonlar	26
2.13. Çalışmamızın Çıkış Noktası	27
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	28
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Elde Edilmesi	28
3.2. Elde Edilen Dokuların Taşınması	29
3.3. Yavaş Dondurma Tekniğinin Uygulanışı	29
3.4. Ovaryum Dokusunun Çözülmesi	29
3.5. Ovaryum Dokusunun Sırt Kasına Transplantasyonu	29
3.6. Parafin Doku Takibi	30
3.7. Folikül Değerlendirmesi ve Sayımı	30
3.8. İmmünohistokimya	30
3.9. H-Score Analizi	31
3.10. İstatistiksel Analiz	31

<b>BULGULAR</b>	32
4.1. Folikül Sayıları ve Oranları	32
4.2. Phosphatase and Tensin Homolog (pTEN) Bulguları	34
4.4. p27 Bulguları	38
4.5. Anti-Müllerian Hormon (AMH) Bulguları	40
<b>TARTIŞMA</b>	42
<b>SONUÇLAR</b>	49
<b>KAYNAKLAR</b>	50
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	57



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AKT</b>	:	Protein kinaz B
<b>AMH</b>	:	Anti-mullerian hormon
<b>AML</b>	:	Akut miyeloid lösemi
<b>bFGF</b>	:	Fibroblast büyüme faktörü
<b>BMP</b>	:	Bone morphogenetic protein
<b>BRCA</b>	:	Akciğer kanseri
<b>Ca</b>	:	Kalsiyum
<b>CDK</b>	:	Siklin bağımlı kinaz
<b>CDK2</b>	:	Siklin bağımlı kinaz 2
<b>DAB</b>	:	3,3' Diaminobenzidine
<b>DMSO</b>	:	Dimetil sülfoksit
<b>EG</b>	:	Etilen glikol
<b>eIF4B</b>	:	Ökaryotik başlatıcı faktör 4B
<b>FBS</b>	:	Fetal sığır serumu
<b>FGF-9</b>	:	Fibroblast growth factor
<b>FoxL2</b>	:	Forkhead box protein L2
<b>FoxO3a</b>	:	Forkhead box O3
<b>FSH</b>	:	Folikül stimüle edici hormon
<b>GDF9</b>	:	Growth differentiation factor 9
<b>GLY</b>	:	Gliserol
<b>HCL</b>	:	Hidroklorik asit
<b>ICSI</b>	:	İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu
<b>Ig</b>	:	Immunoglobulin (Ig)
<b>IVF</b>	:	In vitro fertilizasyon
<b>IVM</b>	:	In vitro maturasyon
<b>KL</b>	:	Kit ligand
<b>L-15</b>	:	Lebowitz - 15
<b>LH</b>	:	Lüteinize edici hormon
<b>mTOR</b>	:	Mammalian target of rapamycin
<b>mTORC1</b>	:	Mammalian target of rapamycin complex 1
<b>mTORC2</b>	:	Mammalian target of rapamycin complex 2

<b>OMI</b>	:	Oosit maturasyonunu inhibe edici peptid
<b>p27</b>	:	Siklin bağımlı kinaz inhibitör 1B
<b>PAS</b>	:	Periyodic acid schiff
<b>PBS</b>	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PCR</b>	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PDK1</b>	:	Fosfoinositid-bağımlı kinaz-1
<b>PGH</b>	:	Primordial germ hücresi
<b>PI3K</b>	:	Phosphoinositide 3-kinase
<b>POF</b>	:	Primordial ovarian failüre
<b>PrOH</b>	:	Propanodiol
<b>PTEN</b>	:	Phosphatase and tensin homolog
<b>RT-PCR</b>	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>S6K1</b>	:	P70-S6 kinaz-1
<b>SOX-9</b>	:	SRY-box 9
<b>SRY</b>	:	Sex determining region Y
<b>TBF</b>	:	Testis belirleyici faktör
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	:	Transforming growth factor beta
<b>TOR</b>	:	Rapamisin hedefi
<b>TSC1</b>	:	Tuberoz skleroz kompleks 1
<b>TSC2</b>	:	Tuberoz skleroz kompleks 2
<b>VEGF</b>	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>Wnt-4</b>	:	Wingless-type 4
<b>ZP</b>	:	Zona pellusida

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Ovaryumların şematik olarak gösterilen anatomik yapısı	4
2.2.	Ovaryumun farkanması	5
2.3.	Primordiyal germ hücrelerinin göçü	7
2.4.	Ovaryumların embriyolojik gelişimi	8
2.5.	Folikül gelişimi	10
2.6.	Ovaryum korteksinde primordiyal foliküller	11
2.7.	Ovaryumda tek katlı primer ve çok katlı primer folikül	12
2.8.	Sekonder ve tersiyer (Graaf) folikül	14
2.9.	Hipofiz-ovaryum aksı	15
2.10.	PTEN/fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) sinyal yolağı	19
4.1.A	Toplam primordiyal folikül oranları	33
4.1.B	Atretik primordiyal folikül oranları	33
4.2.	pTEN ekspresyonunun gruplardaki değerlendirmesi	35
4.3.	Tsc1 ekspresyonunun gruplardaki değerlendirmesi	37
4.4.	p27 ekspresyonunun gruplardaki değerlendirmesi	39
4.5.	AMH ekspresyonunun gruplardaki değerlendirmesi	41
5.1.A	pTEN, Tsc1, p27 ve AMH moleküllerinin ekspresyonu ile korunan folikül havuzu	45
5.1.B	pTEN, Tsc1, p27 ve AMH inhibisyonunun ortadan kalkması ile gerçekleşen prematür folikül aktivasyonu	46

## GİRİŞ

Doğurganlığı koruma teknikleri, kanser gibi yıkıcı kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları içeren hastalıkların tedavisi sonrasında, kısırlık ve hormonal yetmezliklerle başetmede önemli bir seçenektir. Üremeye yardımcı tekniklerin kullanıma sunduğu embriyo, oosit ve ovaryum kriyoprezervasyonu, kadın hastaların ovaryum rezervlerinin ve doğurganlıklarının, bu tedaviler öncesinde korunması için bir kolaylık sağlamaktadır [1]. Ancak, bekâr ve pre-pubertal hastalarda kendisini en fazla kanıtlamış yöntem olan embriyo kriyoprezervasyonu seçeneği uygun değildir. Yine, oosit dondurmak için 2 ila 4 hafta sürecek hormonla uyarım tedavileri gerektiği için kanser tanısı almış ve bir an önce tedavi planına başlanması gereken hastalar için zaman kaybı olmaktadır. Yine, hormon uyarısıyla tümör dokusunu indüklemek riskinin olduğu durumlarda (örneğin östrojen reseptörü pozitif olan meme kanseri vakaları) ovaryum dokusu kriyoprezervasyonu tek seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır [2].

Ovaryum, işlevsel bir tabaka olan korteks ve ona destek sağlamak amacıyla iç bölümde yer alan medulladan oluşmaktadır. Korteks, içinde oositlerin geliştiği folikül denilen yapıları barındırmakta, bunun yanı sıra hormonlarının salgılandığı endokrin bir organ olarak da görev yapmaktadır. Bu görevler bir kadının doğurganlığı, ikincil cinsiyet karakterlerinin belirlenmesi için mutlak gerekli olan hormonların salgılanması ve oositin gelişimi için büyük önem taşımaktadır. Bu işlevlerin çeşitli nedenlerle kaybı kişiyi sadece kısırlık sorunuyla başbaşa bırakmaz, bunun yanında hormonal yetmezlik nedeniyle menapoz benzeri yakınmaların ortaya çıkmasına, tedavi edilmediğinde ise hastanın yaşam kalitesini ve süresini etkileyen komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olur.

Kanser tedavilerinde kullanılan yöntemlerin sağkalımı arttırdığı bilinmektedir. Ancak üreme sistemi üzerindeki komplikasyonların önüne geçmek kolay değildir. Ovaryum dokusunun dondurulması seçilmiş bir grup hasta için alternatifi olmayan bir doğurganlığı koruma yöntemidir [3].

Kanser insidansındaki artışa rağmen bu hastalıktan dolayı kaybedilen hasta oranında azalma görülmektedir. Kanser hastası olan tüm kadınlar ele alındığında, 1987–1999 yılları arasında kanser insidansı % 0.3/yıl artış göstermişken 1992–1999 yılları arasında tüm kanserlere bağlı ölüm hızında % 0.6 azalma kaydedilmiştir. Sağkalım oranları, etkin tedavi modaliteleri (cerrahi, kemoterapi, radyoterapi) ve kemik iliği transplantasyonu gibi yöntemlerle ve hasta izleme olanaklarının iyileştirilmesiyle giderek artma eğilimindedir. 2010 yılında her 250 bireyden birinin çocukluk çağı kanserinden iyileşmiş bir kişi olduğu hesaplanmıştır [4]. Bu da sözü edilen tedavilere bağlı komplikasyonlarla yüzyüze gelme oranında artış anlamına gelmektedir. Hücre yıkıcı bu tedavilere bağlı komplikasyonlardan en geri

dönüşümsüz olanı üreme hücreleri ve organları üzerinde olan hasarlardır. Özellikle siklofosamid gibi alkile edici ajanların kullanılması ovaryum yetmezliği riskini 9 kata kadar artırırken, 6 Gray dozunda pelvik radyasyon genellikle kalıcı kısırlığa neden olmaktadır [5]. Doğurganlığı koruyan tedaviler bu aşamada hastaya sunulmalı ve en uygun seçenek değerlendirilerek uygulanmalıdır.

Yapılan çalışmalar doğurganlığı koruyan tedavilerin kanser hastalarında hastalıkla savaşıma konusunda duygusal anlamda bir destek yarattığını da vurgulamaktadır [6].

Uzun süren hayvan deneylerinden sonra, ovaryum kriyoprezervasyonu konusunda insanlarda da başarılı sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Her ne kadar Amerikan Üreme Tıbbı Derneği tarafından halihazırda deneysel bir işlem olarak gösterilse de [3], günümüzde bildirilmiş 60 kadar gebelik olgusu mevcuttur [7].

Ovaryum dondurulmasıyla ilgili metodolojiye yönelik pek çok araştırma mevcuttur. Dondurma metodları, soğukta koruyan maddelerin konsantrasyonları ve içerikleri bunlardan birkaçıdır. Ancak dondurulan dokuların vücut içine tekrar nakledilmesi sonrası ortaya çıkan hasar mekanizmaları konusunda kanıta dayalı bulgular oldukça sınırlıdır.

Dondurulup çözülen ve re-transplante edilen dokulardaki en önemli hasar mekanizmalarından birisi beslenmedeki duraksamaya bağlı ortaya çıkan iskemik hasardır. Projemizin çalışma konusunu oluşturan diğer bir mekanizma ise Anti-Müllerian Hormon (AMH) eksikliğine bağlı olarak ovaryumdaki foliküllerin kontrolsüz ve rastgele gelişmeye uğrayarak hızla harcanması ve ovaryum folikül havuzunun tükenmesidir [8].

Ovaryum foliküllerinin gelişim süreçlerinde, aktivatör genlere zıt olarak supresör (baskılayıcı) genler de çalışmaktadır. Baskılayıcı genler, folikül havuzunu korumaya yönelik çalışırlar ve aktivasyon sinyal yolları ile denge halinde çalışarak, primordiyal folikül havuzunun tükenmesini baskırlar. Primordiyal folikülden primer foliküle büyüme aşamasında görevli baskılayıcı proteinlerden PTEN (Phosphatase and tensin homolog); bir tümör baskılayıcı gendir ve PI3K'in (fosfatidilinositol-3 Kinaz) öncül negatif regülatör proteini olarak görevlidir. PTEN geni silinmiş farelerde primordiyal havuzun erken aktivasyonu ile erken ovaryan yetmezlik (POF-primordial ovarian failure) meydana gelmektedir [9]. Tsc1/MTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) benzer şekilde primordiyal foliküllerin sessiz kalmasında görevli bir negatif düzenleyicidir [10]. p27, oositlerin erken gelişiminde rol alırlar ve p27 pregranüloza hücre farklılaşması ve proliferasyonun durdurulmasında görevlidir [11-12]. Anti Müllerian Hormon, primordiyal folikülden primer foliküle geçişte baskılayıcı rol oynayan ve büyüyen foliküllerin granüloza hücrelerinden salgılanan, klinikte ovaryum havuzunun hormonal belirteci olarak kullanılan önemli bir moleküldür [13]. Yukarıda bahsedilen ve folikülogenezde rol alan bu baskılayıcı gen yolları birbirinden bağımsız ancak dengeli bir şekilde çalışmalıdır. Baskılayıcı ve aktivatör yolların

dengeli çalışmadığı durumlarda, klinikte POF denilen, folliküllerin kitlesel aktivasyonu ve folikül havuzunun erkenden tükenmesi meydana gelmektedir.

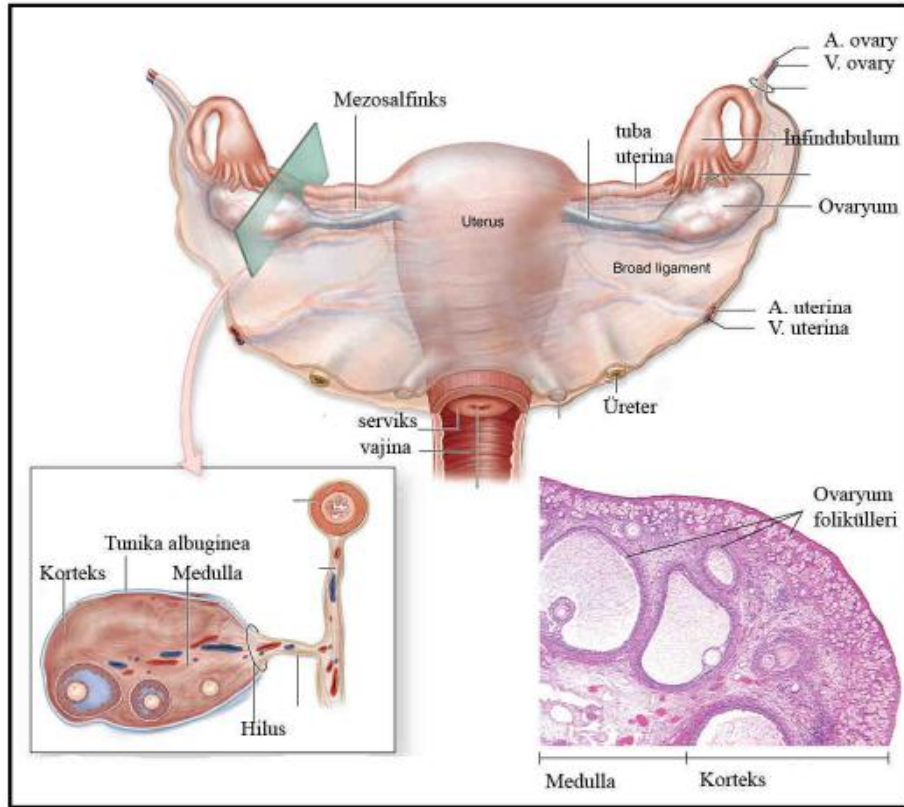
Yukarıdaki bilgilerden yola çıkarak; ovaryum doku dondurması-çözmesi ve transplantasyonu sonrasında meydana gelen primordiyal folikül kaybının nedenleri arasında foliküllerin büyümelerinin baskılanma mekanizmasının bozulmuş olabileceğini hipotez ettik.

Bu nedenle bu çalışmanın amacı; primordiyal folikülden primer foliküle geçişte baskılayıcı moleküller olarak görev alan pTEN, Tsc1, p27 ve AMH moleküllerinin ekspresyonlarının kriyoprezervasyon ve transplantasyon yöntemlerinden etkilenip etkilenmediğinin immünohistokimyasal yöntemle araştırılmasıdır

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ovaryumun Anatomisi

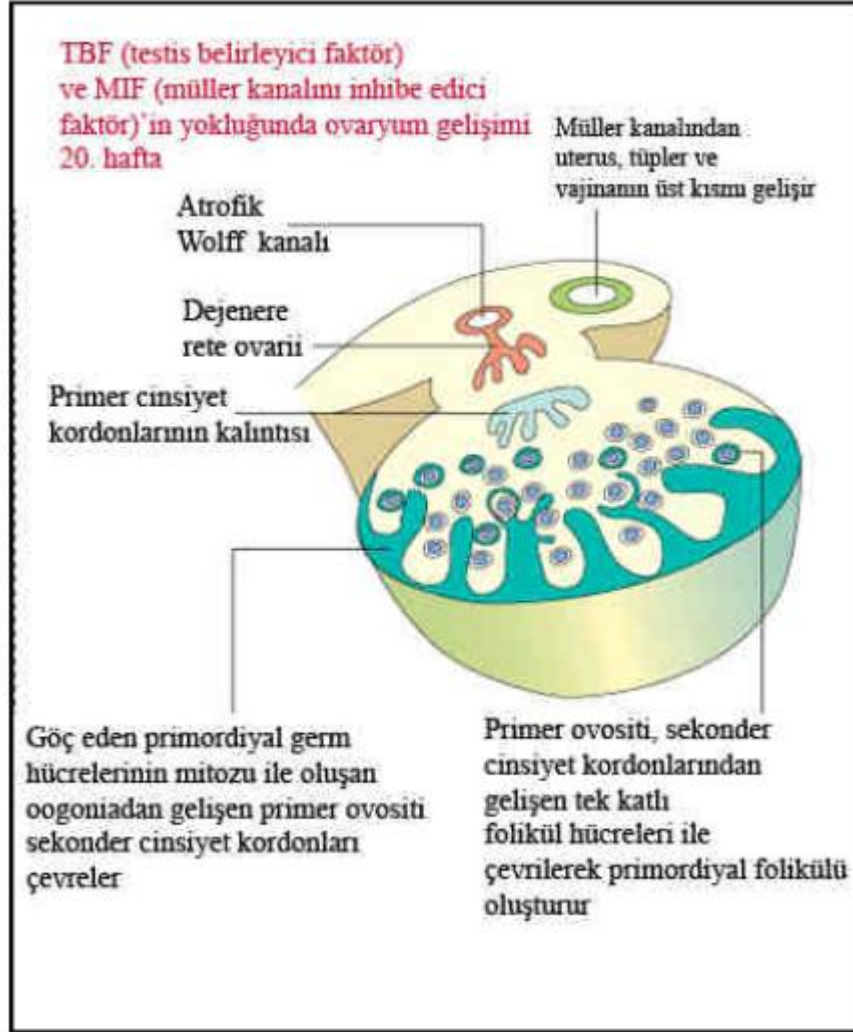
Ovaryum, doğum yapmamış kadınlarda 3 cm uzunlukta, 1,5 cm genişlikte, 1 cm kalınlıktadır ve küçük pelvisin yan duvarlarında bulunan *fossa ovarica* adı verilen çukurcularda yer alır. Ovaryumların ön kısımlarında kan damarlarının ve sinirlerin girdiği hilus adı verilen bölge bulunur. Mezovaryum (posterior), kan damarlarını ovaryumlara ileten bir periton kıvrımı olup ovaryumu uterusun yan kenarlarından uzanan broad ligamentine bağlar. Ovaryumun üst kutbu suspansory ligamentle pelvik duvara, alt kutbu ise ovarian ligament ile uterusu tutunur (Şekil 2.1). Pubertal dönemden önce ovaryumun yüzeyi düz bir yapıdadır. Üreme çağında ise tekrarlayan ovulasyonlar nedeniyle skarlı ve düzensiz bir hal alır. Postmenapozal dönemde, ovaryum boyutları üreme çağındaki boyutunun dörtte biri büyüklüğüne iner [14].



Şekil 2.1. Ovaryumların şematik olarak gösterilen anatomik yapısı. [15] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

## 2.2. Ovaryumun Embriyolojisi

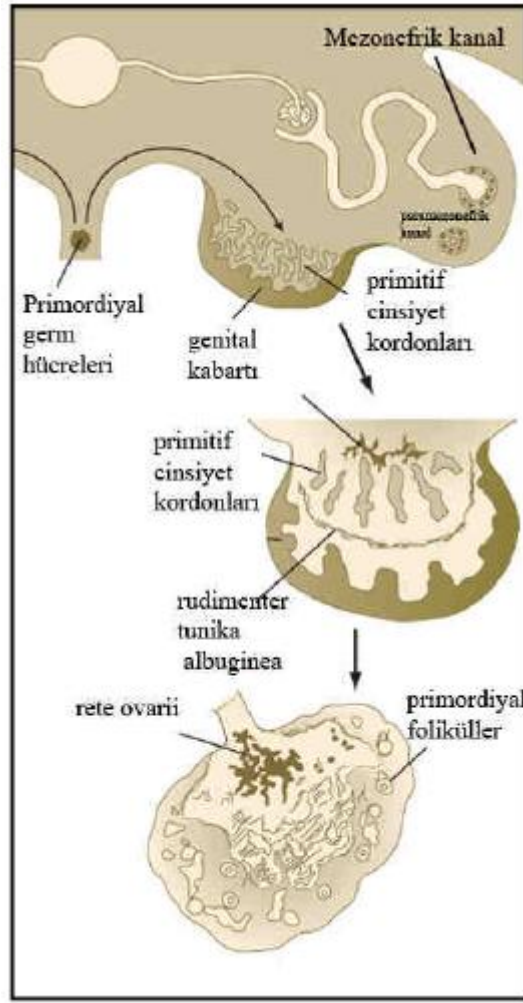
Cinsiyetin farklanması, bazıları otozomal çok sayıda genin rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı, kısa kolunda (Yp11) SRY genini taşıyan Y kromozomudur. Bu genin eksprese ettiği protein, cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteini testis belirleyici faktördür (TBF). Bu faktörün varlığıyla fetüsün cinsiyeti erkek tipinde, yokluğunda da kadın tipinde gelişir [16] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Ovaryumun farklanması. [17] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

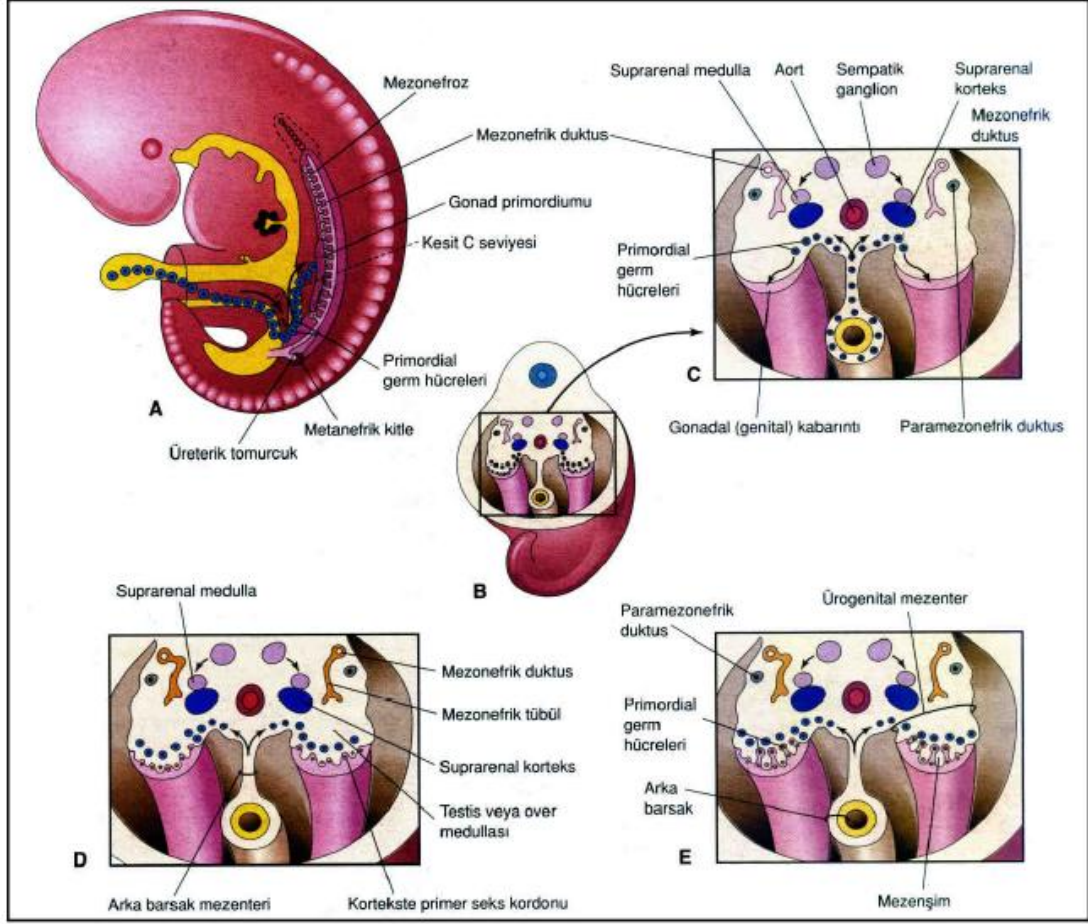


Gonada gelen hücrelerden erkek ya da dişi gamet gelişmesi, gonaddaki somatik hücrelerin çevresel koşullarına bağlıdır, kendi genetik içeriklerine bağlı değildir. Kadın gonadına transplante edilen XY primordiyal germ hücrelerinden oosit, erkek gonadına transplante edilen XX hücrelerinden spermatogonia gelişir. Ovaryumun farklanmasına neden olan moleküler faktörler günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Bir hipoteze göre; Wnt-4, FGF-9 ekspresyonunu inhibe ederek SOX-9 un azalmasına neden olur. Bu azalma testis gelişimini inhibe eder, ovaryumun gelişimine yol açar. Testisin tersine, canlı germ hücrelerinin varlığı, ovaryum farklanması için önemlidir. Primordiyal germ hücreleri genital tüberküle ulaşmaz ise ya da anormal, dejenere yapıdaysa (XO gibi) gonad geriler ve “streak ovaryum” meydana gelir. Primordiyal germ hücreleri gelişecek olan ovaryuma girdikten sonra dış kortikal bölge ya da kortikomedullar sınıra yakın bir yerde yoğunlaşırlar. Primordiyal germ hücreleri, gelişimin erken evrelerinde vitellus kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler. Son bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek, 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır, 6. haftada da genital kabartıyı işgal ederler [16] (Şekil 2.3). Yeni oluşan gonaddan sekrete edilen kemotaktik faktörler de bu hücrelerin göçünü etkiliyor olabilir. Yaklaşık 1000-2000 kadar hücre genital kabartıya ulaşır. Buraya ulaşan hücrelerin göç davranışları son bulur [18]. Bu hücreler genital kabartıya ulaşmazsa gonadlar gelişemez. Gonadların over ve testise farklanmasında primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır.



Şekil 2.3. Primordiyal germ hücrelerinin göçü. [18] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartı epiteli proliferer olur ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine ilerler (Şekil 2.4). Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen belirgin bir düzeni olmayan kordonları oluştururlar. Hem erkek hem de dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir. İşte bu devredeki gonad farklanmamış gonad olarak bilinir [16].



Şekil 2.4. Ovaryumların embriyolojik gelişimi [19]

Ovaryum folikülünü oluşturan folikül epitel hücrelerinin köken aldığı üç bölge tahmin edilmektedir:

1. Sölm epitel (sekonder cinsiyet kordonları)
2. Mezonefrik primitif cinsiyet kordonları
3. İlk iki seçeneğin kombinasyonu

Son olasılık erken foliküler epitel içindeki açık ve koyu boyanan iki belirgin hücre tipinin varlığıyla da uyumludur. Bu evrede oogonia olarak adlandırılan primer germ hücreleri, 4. ayın başına gelene kadar mitozla çoğalır. Sonrasında oogonialar mezonefrozun sekrete ettiği retinoik etkisi altında ovaryumun iç medulla bölgesinde I. mayozun profaz safhasına girerler. Bu etki de mezonefrik hücre kümelerinden oluşan rete ovarii olarak adlandırılan epitelyum ile ilişkili olabilir. Oosit olarak adlandırılan mayotik oogoniumlar foliküler hücreler ile ilişki içerisindedirler ve primordiyal folikülü oluştururlar. Bu sırada, ovaryumun kortikal bölgesindeki

oogoniumlar mitoz bölünmelerine devam ederler. Oogonium ve erken oositler gelişimlerinde senkronizasyonu sağlayan hücreler arası sitoplazmik köprülerle bağlıdırlar. 22. haftaya kadar foliküler gelişim tüm ovaryumda gerçekleşir. Oositler I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında diploten safhasına ulaşana kadar bölünmelerini sürdürürler. Mayoz durur ve blokaj kalkana kadar oositler bu safhada kalır. Adölesan dönemde, ovulasyondan önce tüm oositler bu şekildedirler [18]. Yüzey epiteli, korteksteeki foliküllerden, tunika albuginea adı verilen, ince bir fibröz kapsülle ayrılır [19].

### 2.3. Ovaryum Histolojisi

Kadın gonadı olarak ovaryumun birbiriyle ilişkili iki fonksiyonu vardır: gametlerin (gametogenez) oluşturulması ve steroid hormon üretimi (steoidogenez). Kadında gamet üretimi oogenez adını alır. Ovaryumdan östrojen ve progesteron olmak üzere iki ana hormon sekrete edilir. Östrojen: iç ve dış genital organların gelişimini indükler ve pubertede kadın cinsiyet özelliklerinden sorumludur, ayrıca meme dokusunda kanalların ve yağ dokusunun oluşumuna önemli katkısı vardır.

Progesteron, başta uterus olmak üzere iç genital organların gelişimini indükler. Gebelik için endometriumda sekretuar değişiklikleri sağlar. Progesteron ayrıca lobüler çoğalmayı başlatarak meme bezini laktasyon için hazırlar. İki hormon da fertilize oositin uterusu implantasyonunu sağlamak için menstrüel siklusta önemli rol oynar. İmplantasyon gerçekleşmezse uterus endometriumu dejenere olur ve menstrüasyon siklusu devam eder [14].

Ovaryum korteks ve medulladan oluşan bir organdır. Medulla, gevşek bağ dokusu, geniş kıvrılmış kan damarları, lenf damarları ve sinirler içeren ovaryumun orta bölgesidir. Korteks ise medullanın etrafını çevreleyen periferik ovaryum bölgesidir. Zengin hücresel bağ dokusu içine gömülü ovaryum folikülleri burada yer alır. Folikül çevresinde düz kas hücreleri bulunur. Korteks ve medulla sınırı belirgin değildir [14].

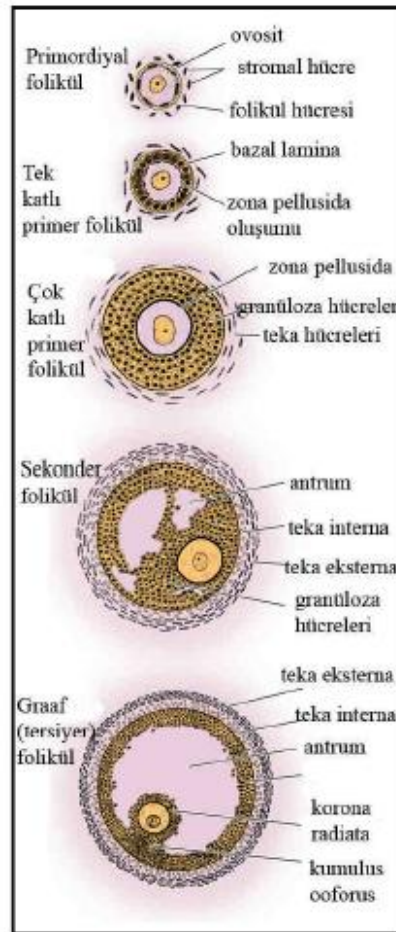
Ovaryum yüzeyi basit yassı ya da kübik epitel ile kaplıdır; bu epitel germinal epitel olarak adlandırılır [15, 17]. Mezovaryumu çevreleyen mezotel ile devam eder. Geçmişte, embriyonik gelişimde germ hücrelerinin buradan köken aldığı düşünülerek bu ad verilmiştir. Ancak bugün primordiyal germ hücrelerinin ekstragonadal yerleşimli olduğu ve farklılaştıkları embriyotik gonadın korteksine vitellus kesesinden göç ettiği bilinmektedir [14]. Ovaryumun beyazımsı rengini veren *tunika albuginea*, germinal epitel ve korteks arasında sıkı bağ dokusu katmanı olarak bulunur [15]. Ovaryum folikülleri oosit gelişimi için bir mikroçevre sağlar. Ovaryum folikülleri, primer oosit içeren, her biri farklı büyüklükte, korteks stroması içine dağılmış yapılardır. Folikül çapları gelişen oositin evresini gösterir. Fetal hayat boyunca oluşan oogenezin erken safhalarında mitotik bölünmeyle oogonium sayısı artar. Oositler doğumda I. mayoz bölünmenin profaz safhasında duraklamış olarak bulunurlar. Puberte boyunca çok az folikül büyür ve olgunlaşır. Folikül olgunlaşması, ovulasyon bir süre sonra menstrüel siklus ile paralel hale gelir. Normalde her siklusta tek oosit tam olgunluğa ulaşır ancak birden fazla oositin

atıldığı durumlar çoklu zigot oluşumuna neden olabilir [14]. Her menstrüel siklus döngüsünde (ortalama 28 gün) genellikle tek bir oosit serbest bırakılır. Kadının doğurganlık çağı yaklaşık 30-40 yıl sürer ve yalnızca 450 kadar oosit atılmış olur [15].

Tüm üreme çağı boyunca bir kadın yaklaşık 400 olgun oosit üretir. Doğumda 600.000 ile 800.000 arasında olan primer oositlerin hepsi maturasyonunu tamamlayamaz ve atreziye gider. Bu süreç fetal hayatın 5. ayında başlar ve oosit çevresindeki hücreler de apoptoz ile bu duruma eşlik eder. Primer oosit sayısı atreziyle doğuma kadar %20'ye iner. Menapoz sürecinde ise oositler birkaç yıl içinde dejenere olur [14].

#### 2.4. Folikül Gelişimi

Kadında bir menstrüel siklus üç evreden oluşur; foliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre. Foliküler evrede primordiyal folikülden olgun folikül ya da Graaf folikülü gelişir [17] (Şekil 2.5). Gelişen folliküller, primer ve sekonder folikül olarak iki kategoriye ayrılır. Ovaryumda tüm evrelerde foliküller bulunur ancak primordiyal folikül sayısı daha fazladır.



Şekil 2.5. Folikül gelişimi [15]

#### 2.4.1. Primordiyal Folikül

Folikül gelişiminin erken aşamasıdır. İlk olarak fetal gelişimin 3. ayında ortaya çıkar. Primordiyal folikül gelişiminin erken evreleri gonadotropin etkisinden bağımsızdır. Olgun ovaryumda primordiyal foliküller korteks stromasında tunika albugineanın altında bulunurlar (Şekil 2.6). Tek katlı yassı folikül hücreleri oositi çevreler. Folikül hücrelerinin dış yüzü bazal membran ile sınırlandırılmıştır. Foliküldeki oosit çapı yaklaşık 30 µm çapındadır ve büyük, iyi dağılmış kromatin içeren asentrik çekirdeği ve bir ya da birden fazla çekirdekçisi vardır. Oosit sitoplazmasında Golgi vezikülleri, endoplazmik retikulum, mitokondriyon ve lizozom kümelerinin oluşturduğu Balbiani cisimciği bulunur.



Şekil 2.6. Ovaryum korteksinde primordiyal foliküller [15]

#### 2.4.2. Primer Folikül

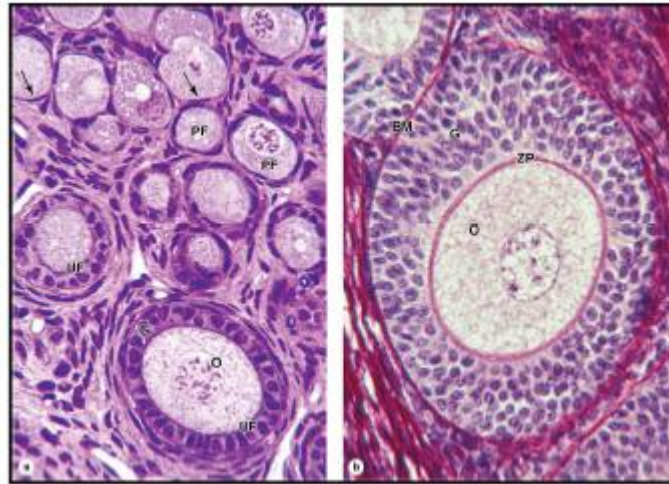
Oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler meydana gelir. İlk olarak oosit genişler, çevresindeki yassı folikül hücreleri çoğalır ve kübik hale gelir. Gelişen bu foliküle primer folikül adı verilir [14]. Oositler kalın, amorf bir örtü olan ve asidofil boyanan zona pellusida (ZP) ile çevrilidir ve bu katman en az üç farklı glikoprotein içerir [15]. Folikül hücreleri tek katlı kübik ya da prizmatik olup oosit çapı 50-80 µm'e ulaştığında, ZP ışık mikroskopunda görülebilir [14]. Glikozaminoglikanlar, glikoproteinlerden zengin ve periyodic acid- Schiff (PAS) reaksiyonu ile boyanan ZP' nin sentezine hem oositlerin hem de folikül hücrelerinin katkıda bulunduğu düşünülmektedir [15].

Primer foliküller iki tipe ayrılır;

1. Tek katlı primer foliküller. Bunların etrafında tek sıralı kübik veya prizmatik foliküler hücreler bulunur (Şekil 2.7).
2. Çok katlı primer foliküller. Çok katlı ve çoğalan kübik hücrelerle çevrilidir. Foliküler hücreler, kendilerini ovaryumun stromasından ayıran bir bazal lamina tarafından desteklenir [17] (Şekil 2.7).

Tek katlı folikül hücreleri hızlı mitotik çoğalmayla çok katlı folikül hücreleri haline gelir ve granüloza hücreleri olarak tanımlanır. Foliküler gelişim sırasında, granüloza hücreleri arasında çok sayıda gap junction oluşur. Granüloza hücrelerinin bazal bölümü *zonula okcludens* denilen sıkı bağlantılara sahip değildir, bu nedenle ki kan-folikül bariyeri yoktur.

Granüloza hücrelerinin çevresindeki stroma hücreleri kılıf şeklinde folikülü sarar. Bu yapıya teka folikülü adı verilir. Daha sonra iki tabakaya ayrılır; teka interna ve teka eksterna. Teka interna damardan zengin bir yapıya sahiptir. Buradaki hücreler steroid üreten hücrelerin ince yapı özelliklerine ve çok sayıda Luteinize edici hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. LH stimülasyonu ile östrojen prekürsörü olan androjenlerin sentez ve salınımı artar. Teka internada sekretuar hücrelere ek olarak fibroblast, kollajen fibrilleri ve endokrin organlarda olduğu gibi iyi gelişmiş bir damar ağı mevcuttur. Teka eksterna ise bağ dokusunun dış katmanıdır. Ana olarak, düz kas hücreleri ve kollajen lifleri içerir. Teka tabakaları arasındaki ayrım belirgin değildir. Ancak bazal lamina, granüloza hücre tabakası ile teka interna arasında belirgin bir sınır çizer. Bu yapı teka internadaki zengin damar yatağı ile avasküler granüloza katımı ayırır. Oosit olgunlaşırken organel dağılımı da değişir. Serbest ribozomların, mitokondriyonların, küçük veziküllerin ve düz endoplazma retikulumlarının sayısı artar. Seyrek olarak yağ damlacıkları ve lipokrom pigmentine de rastlanabilir. Memelilerdeki oositlerde kortikal granüller adı verilen sekretuar veziküller bulunur. Oosit membranının hemen altında yer alırlar. Oosit, sperm tarafından aktive edildiğinde bu granüllerin proteaz içerikleri ekzositozla salıverilir. Perivitellin aralıkta çok sayıda mikrovillus, oosit ve ZP çevresindeki granüloza hücreleri arasında uzanır. Bu uzantılar sayesinde membranlar arasında temas sağlanır ancak sitoplazmik devamlılık saptanmamıştır [14].



Şekil 2.7. Ovaryumda tek katlı primer ve çok katlı primer folikül [15].

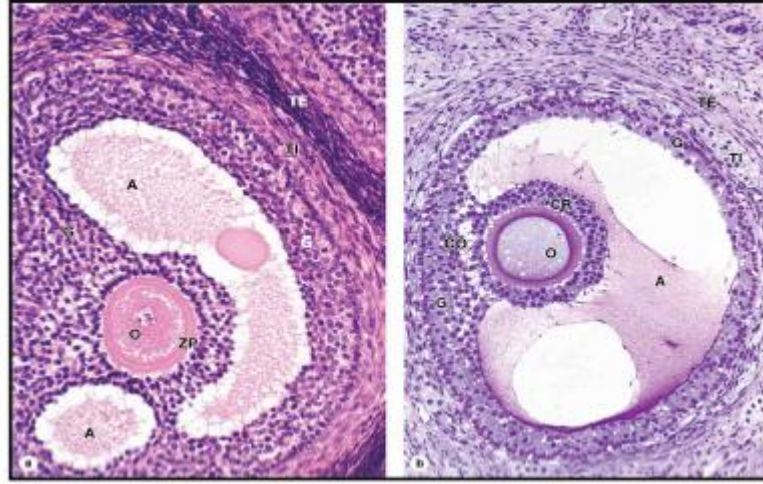
### 2.4.3. Sekonder Folikül

Antrumdaki sıvı içeriği ile karakterizedir. İlk olarak primer folikül kortikal stromanın derinlerine doğru gider. Granüloza hücrelerinin mitozla çoğalması sonucu folikülün boyutu artar. Oosit ve folikül hücrelerinin gelişimi için birçok faktör gerekir; Folikül stimüle edici hormon (FSH), Büyüme faktörleri; epidermal büyüme faktörleri, insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), Kalsiyum iyonu ( $Ca^{2+}$ ) bu faktörlerin başlıcalarıdır. Granüloza hücre tabakası 6-12 hücre katına ulaştığında, hücreler arasını sıvı dolu bir kavite ortaya çıkar (Şekil 2.8). Hyalüronandan zengin, folikül sıvısı olarak adlandırılan bu sıvı granüloza hücreleri arasında birikmeye devam eder. Kaviteler birleşerek tek, yarımay şeklinde, antrum adı verilen bir boşluğa dönüşür. Bu foliküle sekonder ya da antral folikül adı verilir. Asentrik çekirdekli oositin çapı yaklaşık 125  $\mu m$ 'ye ulaşır ve daha fazla büyümeyebilir. Granüloza hücrelerinden antral sıvıya salınan oosit maturasyonunu inhibe edici peptit (OMI), oositin büyümesini duraklatır. Sekonder folikülün boyutu ve OMI konsantrasyonu arasında direkt bir bağlantı vardır. Konsantrasyonu küçük folikülde en az, olgun folikülde en fazladır. Folikül sıvısının ilk ortaya çıktığı erken sekonder folikül evresinde folikül çapı 0,2 mm, olgun folikül evresinde ise 10 mm ya da daha fazla çapa ulaşır. Sekonder folikülün boyutu arttığında, atrum da genişler ve çevresinde birkaç kat granüloza hücresi bulunur. Oositle bağlantılı olduğu kutup hariç granüloza hücre katının kalınlığı her yerde aynıdır. Granüloza hücrelerinin oositle ilişkili olduğu yerde, granüloza hücreleri antruma doğru uzanan *kumulus ooforus* adı verilen tepeciği oluştururlar. Oositi çevreleyen kumulus ooforus hücreleri korona radiata adını alırlar ve ovulasyonda oosit ile birlikte atılırlar.

### 2.4.4. Tersiyer (Graaf) Folikül

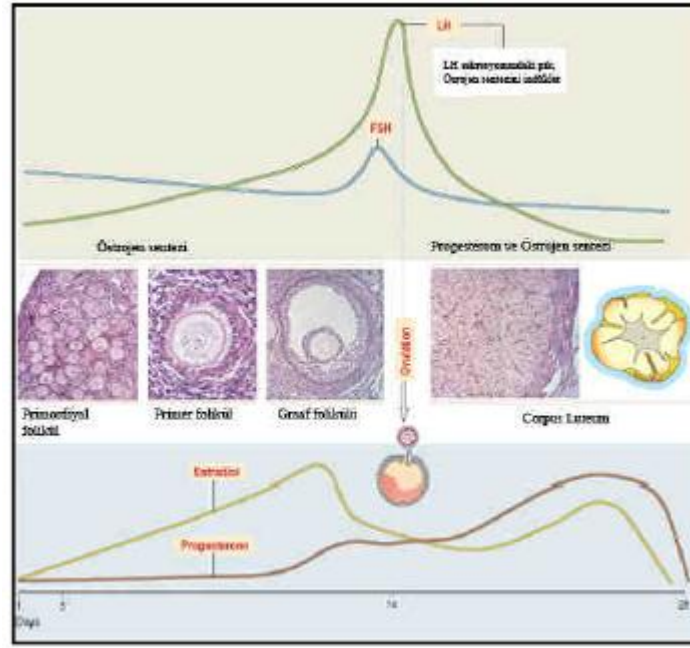
Olgun primer oosit içerir. 10 mm ya da daha fazla çapa sahiptir. Folikülün boyutu nedeniyle, ovaryum kortesinin kalınlığı artar ve bulunduğu ovaryum yüzeyinde bir şişkinlik oluşturur. Folikül maksimum boyuta ulaştığında granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Antrum boyutu artarken granüloza hücre tabakası inceler. Ovulasyona hazırlanırken, granuloza hücreleri arasındaki boşluklar genişler, oosit ve kumulus hücreleri ile geriye kalan granüloza hücreleri arasındaki bağlar gevşer (Şekil 2.8). Ovulasyonda oositin çevresinde sadece tek katlı korona radiata hücre katı vardır.





**Şekil 2.8.** Sekonder ve tersiyer (Graaf) folikül [15].

Folikül gelişimi sırasında teka hücre tabakası belirginleşir. Teka interna hücrelerinin sitoplazmasında yağ damlacıkları görülmeye başlar. LH uyarısıyla teka interna hücrelerinden östrojen prekürsörü olan androjenler salınır. Androjenlerin bazıları granüloza hücrelerinin düz endoplazma retikulumlarına taşınır. Granüloza hücreleri FSH etkisi ile androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizler. Granüloza hücreleri, östrojenlerin doğrudan üretimi için gerekli olan enzimlere sahip değildir. Bu nedenle foliküler hücreler folikülogenez sırasında steroid prekürsörlerini üretemezler [17]. Östrojen granüloza hücrelerinin çoğalmasını ve böylece folikül boyutunun artmasını sağlar. Folikül ve sistemik kaynaklı artmış östrojen seviyesi ile gonadotrop hücrelerin gonadotropin serbestleştirici hormona duyarlılığı arasında korelasyon vardır (Şekil 2.9). FSH ya da LH salınımının dalgalanması adenohipofizi ovulasyondan 24 saat önce indükler. LH dalgalanması, granüloza hücreleri üzerindeki reseptörleri duyarsızlaştırır ve LH yüksekliğine rağmen granüloza hücreleri östrojen üretmezler. Bu dalgalanmanın kesilmesi ile primer oosit I. mayozunu tamamlar. Bu olay LH pikinden 12-24 saat sonra olur, sekonder oosit ve I. polar cisimcik oluşumu ile sonuçlanır. Granuloza ve teka hücreleri lüteinize olur ve progesteron üretmeye başlar.



Şekil 2.9. Hipofiz-ovaryum aksı [17].

## 2.5. Ovulasyon

Ovulasyon, Graaf folikülünden sekonder oositin atılması sürecidir. Her menstrüel siklusun başlangıcında birçok primer folikülden biri ovulasyon için önceden belirlenir. Menstrüel siklusun ortasında sekonder oositin atılmasından hormonal değişiklikler ve enzim etkileri gibi faktörler sorumludur. Bu faktörlerin bazıları;

- Folikül sıvısının hacim ve basıncının artması,
- Plazminojen aktivasyonu ile foliküler duvarda enzimatik proteoliz,
- Oosit-kumulus kompleksi ve granüloza hücreleri arasındaki glikozaminoglikan birikiminin hormonal etkiyle kaldırılması
- Teka eksterna tabakasındaki düz kas hücrelerinin kasılması [14].

Ovulasyondan hemen önce, olgun folikül ovaryum yüzeyinden dışarıya doğru stigma denilen bir çukuru yapar [17]. Bu alanda kan akımı durur ve ovulasyonda buradan yırtılma olur [14]. LH düzeyinin artması sonucu uyarılan teka eksterna ve tunika albuginea içindeki proteolitik etkinlik, olgun folikülün yırtılmasını kolaylaştırır. Dışarıya atılan gamet, ovaryuma çok yaklaşmış olan tuba uterinanın fimbriaları tarafından yakalanır [17]. Oosit, ovulasyondan 24 saat sonrasına kadar canlı kalır. Eğer fertilizasyon gerçekleşmezse, sekonder oosit tüplerde dejenere olur. Normalde her sıklusta tek oosit olgunlaşıp atılırken, bazı sıkluslarda aynı anda iki oosit olgunlaşıp atılarak çoklu zigot oluşumuna neden olabilir.

Primer oosit, embriyonal yaşamda primordiyal folikül içerisinde mayoz bölünmenin profaz safhasında duraklar. I. mayoz bölünmenin profaz safhası

ovulasyona kadar tamamlanmaz. Oosit bu aşamada 12 den 50 yıla kadar kalabilir. Bu uzun periyotta primer oosit çevresel etkenlere maruz kalarak mayozu hatalı tamamlayabilir. Bu hatalar nedeniyle anomalili zigotlar ortaya çıkabilir. I. mayoz, olgunlaşan follikülde tamamlanır. Primer oositte her kardeş kromatin eşit dağıtılır ancak biri sitoplazmanın çoğunu alarak sekonder oosit oluşur. Bu aşamada oosit 150µm çapındadır. Diğer oosit, minimal sitoplazma ile birlikte kalarak I. polar cisimcik adını alır. Oosit, birinci mayoz bölünmeyi tamamlar tamamlamaz ikinci mayoz bölünmeye başlar. Bu bölünmede metafazda duraklar, yalnızca sekonder oosit spermle fertilize olduğunda ikinci mayoz tamamlanır. II. polar cisimcik de bu sırada oluşur. Polar cisimcik bölünemeyeceği için, fertilize oosit II. polar cisimciğin oluşmasıyla tanınır.

Ovulasyondan sonra ilk olarak teka internadaki kılcal damarlardan çıkan kanla ortada bir pıhtı oluşur. Bu yapıya *korpus hemorajikum* adı verilir. Stromadaki bağ dokusu foliküler kavitenin içini işgal eder. Folikül duvarında kalan granüloza ve teka hücreleri folikülün içine yayılır ve içleri lipid damlacıklarıyla dolarak lüteinize olurlar. İnce yapı düzeyinde izlenen tübüler kristal mitokondriyonları, bol düz endoplazma retikulumlarıyla steroid salgılayan hücre özelliğini ortaya koyarlar.

Kortekste yer alan, yüksek düzeyde vaskülarize olan bu yapı progesteron ve östrojen salgılar. Bu hormonlar zigotun implantasyonu için uterusunda endometriyumun gelişim ve sekretuar aktivitesini indükler. Fertilizasyon ve implantasyon olmaz ise korpus luteum yalnızca 14 gün aktif kalır. Hormon düzeylerinin azalması ile ovulasyondan 12 gün sonra korpus luteum dejenere olur. Hücreler lipid ile dolar, boyutları küçülür ve otoliz başlar. Dejenere hücreler üzerine hiyalin çöker ve beyaz bir skar halini alır ve birkaç ay sonra kaybolur. Bu yapıya korpus albicans adı verilir [14].

Gelişiminin herhangi bir aşamasındaki folikül (primordiyal, primer, preantral ve antral) atreziye uğrayabilir. Bu süreç, granüloza hücrelerinde mitoz bölünmenin durması, granüloza hücrelerinin bazal laminadan ayrılması ve oositin ölümü ile belirginleşir. Hücre ölümünden kalıntıları fagosite etmek üzere folikülü makrofajlar istila eder. Daha ileri bir evrede, fibroblastlar folikülün bulunduğu alanı kaplar ve kolajen içeren bir nedbe (yara iyileşme dokusu) oluşturur; bu doku uzun süre kalabilir. Folikül atrezisi doğum öncesinden menapozun birkaç yıl sonrasına kadar görülmesine rağmen, özellikle yoğun olduğu bazı dönemler vardır. Anne hormonlarının etkisinin ortadan kalktığı doğumdan hemen sonraki dönem ile nitelik ve nicelik açısından hormonal değişikliklerin görüldüğü ergenlik (puberte) ve gebelik sırasında oldukça belirginleşir [15].

## 2.6. Primordiyal Folikül Seçilim Mekanizması

Primordiyal folikül popülasyon dinamiklerini açıklamaya yönelik pek çok model ve bir o kadar da soru işareti bulunmaktadır. Soru işaretlerinin asıl sebebi, primordiyal foliküllerin bir kısmı büyürken geri kalan kısmının sessiz halde kalması veya atreziye gitmesidir. Popüler hipotezlerden birisi Henderson ve Edwards'ın 'production-line' hipotezidir [20]. Bu hipoteze göre, embriyonik gonad gelişimi boyunca mayotik duraklamaya giren ilk oositler, yetişkin üreme hayatını tetikleyen ilk oositlerdir. Oositlerin temel başlangıç öncülleri olan primordiyal germ hücreleri (PGH) ekstraembryonik ektoderme komşu proksimal epiblasttan ekstraembryonik ektodermal kökenli bone morphogenetic protein (BMP) 4 ve BMP8b ile ekstraembryonik endoderm kaynaklı BMP2 sinyali ile gelişmektedir [21-23]. BMP4'e yanıt olarak epiblast germ hücre özellikleri kazanmaktadır. Germ hücre kompetansının kazanılması interferon ile uyarılan bir transmembran proteini olan Fragilis'in germ hücresi üzerinde eksprese olması ile başlar. Fragilis daha sonra germ hücrelerinin arka bağırsak (hindgut) mezenteri üzerinden gonada yolculuğu esnasında sadece germ hücrelerinde bulunan Stella isimli genin ekspresyonunu uyararak somatik hücre kaderinden (somatic cell fate) kaçması ve pluripotensinin devam ettirilmesini sağlar [24-25]. Primordiyal germ hücreleri ilk olarak insanda 3-4 gebelik haftalarında vitellus kesesinin dorsal duvarının endoderminde 100 kadar hücre olarak kendilerini belli ederler. Endodermal hücrelerden daha büyük olmaları, daha az organel içeren şeffaf sitoplazmaları ile ayırt edilirler [26]. Yedinci haftaya kadar gonadın germ hücreleri ile kolonizasyonu tamamlanır. Aslında germ hücreleri overin oluşumu ve devamı için gereklidir zira hiç germ hücresi veya oosit olmayan over dokusu kord benzeri yapılara dejenere olmaktadır [27]. Gonada ulaşan PGH daha hızlı mitoz geçirerek sayıları kısa sürede 6. haftada 10 bin iken 8. haftada 600 bine, 20. haftada ise 6 milyona ulaşır. Bu dönemden sonra mitoz azalır 28. haftada sona erer ve eş zamanlı başlayan atrezi 20 haftada pik yapar. Bu sebeple 20. haftadan sonra germ hücre sayısı düşmeye başlar, yenidoğanda 1 milyon, pubertede 300-400 bin kadarı kalır. Sadece %1 i ovulatuvar aşamaya kadar ulaşan bu hücrelerin çoğu atreziye gider ve menopoz sonrası bin kadarı overde kalır [28].

Ovaryan rezerv, ovaryumdaki primordiyal sayısı tarafından belirlenir. Sessiz primordiyal foliküller antral aşamaya ulaşmadan önce kademeli olarak gelişip büyürler. Sonra bir grup antral folikül daha fazla büyümek amacıyla gonadotropinlerin siklik stimülasyonu etkisiyle baskın hale gelir.

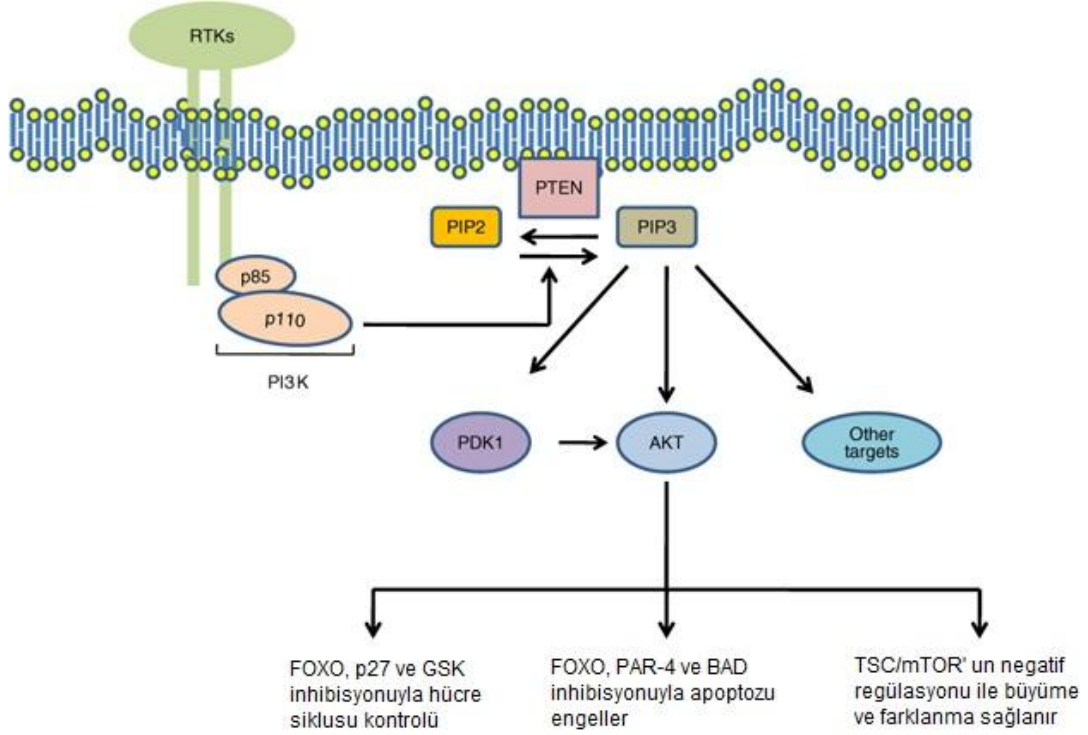
Primordiyal folikül havuzunun büyümesini tetikleyen mekanizma/mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Mutant fare modellerinde yapılan çalışmalar, primordiyal foliküllerin dormant halde kalmasının bir takım inhibitör moleküllerin etkisi altında kalmasından kaynaklanabileceğini önermektedir. Bu inhibitörler; Foxo3a, FoxL2, phosphatase and tensin homolog (pTEN), tuberous sclerosis complex (Tsc1), siklin bağımlı kinaz inhibitör 1B (p27kip1 veya p27) ve anti-Mullerian hormondur (AMH). Kemirgenlerde pTEN, Tsc1 ve Foxo3a genlerin oosit-spesifik delesyonu sonucu dormant primordiyal foliküllerin toplu aktivasyonu görülmüştür. Diğer oosit ve somatik hücre kökenli büyüme faktörleri (GDF9 ve bazı BMP ailesi üyeleri büyüme faktörleri) de gonadotropin bağımsızdır. Bu faktörlerin etkileşimleri, erken foliküler fazda granüloza hücreleri ve teka hücrelerinden salgılanan hormon ve androjenler ile

kontrol edilir. İlginç olarak, bu faktörlerden bazıları dominant folikülün seçilimi, prematür lüteinizasyonun inhibisyonu ve gonadotropinlere yanıt gibi folikülün büyüme aşamalarında kritik rollere sahiptir [29].

Primordiyal folikülden primer foliküle geçişteki en önemli baskılayıcılardan birisi de p27'dir [29]. p27, TGF- $\beta$  gibi sinyallere yanıt olarak ekspre olur ve hücre siklusunun G1 fazında tutuklu kalmasından sorumludur [30]. Büyüme faktörlerinden mahrum kalan, G<sub>0</sub> fazında bulunan veya kontakt inhibisyona maruz kalan hücrelerde p27 ekspresyonu artarken, hücre siklusuna giren hücrelerde ise azalır [31]. p27'nin degradasyonu G<sub>1/S</sub> geçişi için kritik bir önem taşır. p27, D tip siklinler/CDK4 kompleksleriyle güçlü ve siklin E/CDK2 kompleksiyle de zayıf etkileşimdedir. D tip siklinler ve CDK4 kompleksleriyle etkileşime girdiğinde CDK4'ün katalitik aktivitesini ve böylece CDK4'ün Rb proteinini fosforlamasını (pRb oluşumunu) inhibe eder. Gerçekten de p27, siklin D veya pRb genlerini içermeyen farelerle yapılan bazı çalışmaların fenotipik sonuçları, p27 ve pRb eksik olan farelerde hiperplazi ve tümör oluşumu göstermiştir [32-37]. p27 geninden yoksun farelerde vücut büyüklüğünün artması, birçok organda hiperplazi ve tümör oluşumu, p27'nin büyümeyi sınırlamadaki ve tümör baskılanmasındaki önemine işaret etmektedir [38-39].

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar p27'nin, primordiyal foliküllerin oosit ve folikül hücrelerinde ekspre edilerek, primordiyal folikülün dormant olarak kalmasını düzenlediğini göstermektedir. p27 geni silinmiş farelerde oositin büyümesi ve pregranüloza hücrelerinin farklanıp proliferasyonu sonucu prematür folikül aktivasyonu görülmüştür [40]. Mevcut çalışmalar, p27 geninin memeli ovaryum gelişiminde önemli bir belirleyici olduğunu önermektedir [41].

pTEN ve Tsc ile ilgili literatürde pek çok çalışma bildirilmiştir. pTEN, fosfoinositid-bağımlı kinaz-1 (PDK1) inhibisyonu ile P70-S6 kinaz 1 (S6K1)'in fosforile halde tutulmasını sağlar ve böylece S6K1, ribozomal protein S6 (rpS6) ve ökaryotik başlatıcı faktör 4B'yi (eIF4B) fosforilleyerek oosit gelişimini sağlayan protein translasyonu meydana gelmektedir. Daha açık bir ifadeyle, primordiyal havuzun tükenmemesi için pTEN molekülünün PDK1'i aktive etmesi ve böylece oosit gelişiminin duraklatılması gerekmektedir. pTEN'in AKT yolağını düzenlemesi ile hücre siklusu, apoptoz, büyüme ve farklanma ile ilgili pek çok yolda çok önemli görevleri olduğu bilinmektedir (Şekil 2.10). Tsc molekülü de pTEN molekülüne benzer biçimde aynı yolağı mTORC1 yolağı üzerinden inhibe etmektedir. Bu inhibisyon sayesinde primordiyal havuzu sessizliğini korumaktadır. pTEN ve Tsc1 geni silinmiş kemirgenlerle yapılan çalışmalar, pTEN ve Tsc delesyonlarında primordiyal folikül rezervin tükendiğini doğrulamaktadır [8, 10].



**Şekil 2.10.** PTEN/fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) sinyal yolağı. [42] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

AMH, ovaryumda gelişen foliküllerin granüloza hücreleri tarafından üretilir ve primordiyal folikülden primer foliküle geçiş evresinde primordiyal folikül havuzunu korumada görev alır. AMH seviyesi küçük antral folikül sayısı ile orantılı olarak serumda ölçülebilir. Kadınlarda AMH seviyesi yaşa ve post-menopozal evreye bağlı olarak geriler. Prematür ovaryan yetmezliğe sahip olan kadınlarda ise antral folikül sayısının yokluğuna bağlı olarak ölçülemeyecek kadar azalır. AMH seviyesi son zamanlarda ovaryan folikül havuzunu gösteren bir belirteç olarak klinikte kullanılmaktadır [43].

## 2.7. Ovaryan Doku Kriyoprezervasyonu

2001'de Amerika'da 625.000'den fazla kadın invaziv kanser tanısı almıştır. Bu kadınların yaklaşık %8'i 40 yaş altındadır. Agresif kemoterapi, radyoterapi ve kemik iliği transplantasyonu dahil şimdiki tedavi protokolleri ile bazı kanserlerin tedavi başarısı %90'a kadar artmıştır. Amerika'da 2010'a kadar yapılan çalışmalar, çocukluk kanserlerinin 1/200 oranında yaşadığını göstermiştir. Artmış yaşam beklentisiyle birlikte yaşam kalitesi de önemli hale gelmiştir [44].

Çocuk sahibi olmak, gonadlara toksikliği kanıtlanmış kemo ve radyoterapiden sonra kanser hastaları için zor olabilir. Kanser tedavisinden sonra prematür ovaryum yetmezliği görülür ve sonuçta birçok kadın kanser hastası kemoterapi ve radyoterapi nedeniyle folikül kayıplarından etkilenir [45].

Üreme çağındaki çoğu kanser hastasının fertilitelerini korumak için uygulanan uygun bir yardımcı üreme tekniği yoktur. Günümüzde kanser tedavisinden önce fertilitenin korunması kanserle ya da kanser tedavisi ile ortaya çıkan infertilitenin üstesinden gelmek için önemli bir tercihtir. Kadın kanser hastalarının fertilitesi çeşitli araçlarla korunabilir. Örneğin; pelvik radyasyondan korunmak için ovaryumların periton altındaki yeri değiştirilebilir [46]. Ancak bu uygulama kemoterapi alacak hastalar için uygun değildir.

Yardımcı üreme, kontrollü ovaryum stimülasyonuna gidecek hastalarda fertilitayı korumak için diğer bir yaklaşımdır. Toplanan oositler, eşinin spermeleriyle *in vitro* fertilizasyon (IVF) ya da intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yoluyla döllenebilir ve oluşan embriyolar dondurulabilir. Hastalar kanserleri tedavi edildikten sonra bu embriyoları kullanabilirler ancak bu uygulamada bazı sorunlar olabilir. Bunların ilki; hastaların tanı- tedavi ve yardımcı üreme tekniği uygulaması arasında yeterli zaman olmayabilir. İkinci olarak; puberte öncesi genç kızlar ve partneri olmayan hastalar genellikle yardımcı üreme tekniği uygulanmasına uygun değildir. Üçüncü olarak; ovaryum stimülasyonunda kullanılan gonadotropinler östrojen-duyarlı kanserler için uygun değildir.

Oosit kriyoprezervasyonu bazı merkezlerde başarılı doğum sonuçları vermiştir ancak bu konudaki deneysel çalışmalar ve teknik henüz yeterli değildir. Oosit vitrifikasyonu sonrası yaşam oranı yüksek olmasına rağmen, oositlerin yavaş dondurma işlemi birçok merkezde altın standarttır. Oositler, östrojen duyarlı olmayan kanser hastalarında gonadotropin stimülasyonundan sonra elde edilebilir. İmmatür oositler de toplanabilir ve kriyoprezervasyondan sonra *in vitro* matürasyona (IVM) indüklenir. Alternatif olarak oositler, izole edilebilir ve kriyoprezerve edilmiş tüm ovaryum ya da ovaryum doku biyopsisinden sağlanabilir. Eğer hastanın eşi var ise, IVM'den sonra bu oositler fertilize edilebilir ve sonuçta ortaya çıkan embriyolar dondurulabilir ancak, gebelik şansı saklanan embriyo ve oosit sayısı ile sınırlıdır [47]. Buna ek olarak etik ve kanuni konularda bazı problemler ortaya çıkabilir. Oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu yapılırsa, ovaryumda birçok primordiyal follikül boşa harcanmış olur [48].

Ovaryumda küçük, inaktif, farklanmasını tamamlamamış, zonası oluşmamış, immatür oositler içeren yüzlerce primordiyal follikül vardır [49]. Bu olgunlaşmamış oositler, zona pellusidanın ve kortikal granüllerin yokluğu nedeniyle kriyoprezervasyonu tolere edebilir. Kanser tedavi prosedüründe gecikme olmadan, evlilik durumu ve yaşı hesaba katılmaksızın, herhangi bir kanser hastasından ovaryum korteksi sağlanabilir [50]. Amorim ve arkadaşları dondurulmuş ovaryumda, hormonal ve doku korunumunun iyi olduğunu göstermişlerdir. Tüm bu avantajlar, kadın fertilitasının korunması için ovaryum doku kriyoprezervasyonunu diğer yöntemlerden daha iyi bir seçenek yapar. [51]

## 2.8. Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Öncelikle gıda endüstrisinde dondurma, taşıma ve saklama ihtiyaçlarına yönelik başlayan çalışmalar farklı boyutlar kazanmıştır. 1779 yılında gliserolün keşfi ile kriyobiyolojik çalışmalar başlamıştır. Luyet, 1934 yılında “Sıvı nitrojen canlı bir dokuyu birkaç saniyede öldürebildiği gibi, yıllarca belki de yüzyıllarca koruyabilir” fikriyle kriyoprezervasyonun temellerini atmıştır [52]. 1949 yılında Polge ve arkadaşları yapay dölleme için sperm dondurması çalışmaları başlamıştır [53]. Gliserol ile sıvı azot buharında dondurulan spermatozoonlarla ilk doğum gerçekleştirilmiştir [54]. İlk insan sperm bankası şirketi 1973’te Fransa’da kurulmuştur. Uzun süren hayvan deneylerinden sonra, ovaryum kriyoprezervasyonu konusunda insanlarda da başarılı sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Dondurulup çözülen embriyo, yardımcı üreme teknikleri kullanılarak 1983 yılında başarı ile sonuçlanmıştır. Henüz deneysel aşamada olarak tanımlansa bile günümüzde kadar bildirilmiş çok sayıda canlı doğum mevcuttur [55].

Ovaryum dondurulmasıyla ilgili metodolojiye yönelik pek çok araştırma mevcuttur. Dondurma metodları, soğukta koruyan maddelerin konsantrasyonları ve içerikleri bunlardan birkaçıdır. Ancak dondurulan dokuların vücut içine tekrar nakledilmesi sonrası ortaya çıkan hasar mekanizmaları konusunda kanıta dayalı bulgular oldukça sınırlıdır.

Isı, konsantrasyon, maruziyet süresi gibi durumlar da toksisiteyi direkt etkiler. Sıcaklığı düşürmek toksisiteyi azaltır ama kriyoprotektif ajan kullanımı penetrasyonunu da düşürecektir. Kriyoprezervasyonda iki önemli tehlike: Solüsyon etkisi ve hücre içi buz formasyonudur. Diğerleri ise hücre içi dehidrasyon ve hücre dışı buz formasyonu oluşumu olarak söylenebilir.

Başarılı kriyoprezervasyonda temel üç anahtar faktör;

- Dondurma – çözme hızı,
- Kriyoprotektan bileşimi,
- Numune hacmidir.

Kriyoprezervasyon uygulamaları genel olarak iki yöntemle yapılabilmektedir: Yavaş dondurma (slow freezing) yöntemi ve vitrifikasyon yöntemi.



### **2.8.1. Yavaş Dondurma Yöntemi**

Yavaş dondurma yöntemi, bilgisayar destekli bir program yardımıyla, sıcaklığın kademeli olarak düşürülmesi prensibine dayalı bir kriyoprezervasyon yöntemidir [56]. Söz konusu bilgisayar programı ile hücre içi buz kristali oluşumu, dokunun dışında buz kristali oluşturularak önlenir (seeding). Çözme esnasında kristal formasyonunu önlemek için hızlı çözmek gerekir. Avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Rutin kullanımı daha uygulanabilir olduğu için kliniklerde günümüz itibarıyla daha sık tercih edilen bir yöntemdir [57]. Vitrifikasyon yöntemine göre işlemler daha çok maliyetli ve daha az beceri istemektedir. Kriyoprotektif ajan kullanımı, dengelenme (equilibration) işlemi düşük yoğunlukta kullanılması durumunda mümkündür. İnsan ovaryan doku kriyoprezervasyonu için rutin uygulaması deneysel aşamada olsa da kliniklerde yaygın olarak kullanılmaktadır [58].

### **2.8.2. Vitrifikasyon Yöntemi**

Buz çekirdeklenmesi gerçekleşmeden, çok hızlı soğutmayla ya da gradient oluşturmaya yönelik kriyoprotektan madde kullanımıyla dokunun kristalsiz cam-fazında donması durumudur. Moleküller kimyasal reaksiyonlara giremeyecek şekilde hareketsiz kalarak hapsolurlar (saf su için 106 °C/sn). Dokunun hareketsiz kalacak şekilde hapsolmesi için uygun solüsyonların uygun derişimlerde kullanılması gerekmektedir. Vitrifikasyon yönteminin en büyük dezavantajı da kullanılacak olan kriyoprotektan madde/maddelerin derişimlerinin uygun olarak ayarlanması işlemidir. Ancak bu şekilde doku içindeki su ile dışarıdaki kriyoprotektif madde alış verişi sırasında dokunun maruz kalacağı toksik hasar engellenebilir. Kriyoprotektan oranı çok yüksekse, hızlı difüzyon sayesinde doku hızlı bir şekilde dondurulur. Fakat bu durumda kriyoprotektan kaynaklı toksik ajan maruziyeti yüzünden soğutma hızının bir önemi kalmaz. Örnek olarak %41-50 propanediol'de heterojen çekirdeklenme ısısı, vitrifikasyon ısısının altındadır. Bunun anlamı vitrifikasyon sıcaklığında buz kristalleri oluşmamasıdır [59].

Vitrifikasyonun başlıca özellikleri şunlardır:

- Doku ile nitrojen arası direkt temas,
- Buz kristali oluşumunun engellenmesi,
- Kriyoprotektan konsantrasyonunun değiştirilebilir olması toksisitenin azaltılmasını hatta giderilmesini sağlar,
- Hızlı dondurma-çözme işlemi,
- Düşük volümlü kullanım,
- Dakikada 15.000 – 30.000 °C soğutma
- Prosedür süresinin 2-10 dakika olması [60].

Ovaryan doku kriyoprezervasyonunda yavaş dondurma yöntemi, vitrifikasyon yöntemine göre klinikte daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanser hastalarına yönelik yapılan çalışmalarda yavaş dondurma ile vitrifikasyon yöntemleri insan ovaryan doku sağkalımına göre karşılaştırıldığında, yavaş dondurma yönteminin daha umut verici olduğu önerilmektedir [61]. Biz de, mevcut çalışmalar ışığında çalışmamızda yavaş dondurma yöntemini kullandık.

## 2.9. Kriyoprotektanlar ve Genel Özellikleri

İki tip kriyoprotektif ajan vardır. Hücre içine giren (permeable), ve hücre dışında kalan (non-permeable) kriyoprotektan.

Dondurma öncesi hücrelere eklenen ve hücrelerin sağkalımını arttıran maddelerdir. Hücrede donuk olmayan kısmın oranını arttırmaya çalışırlar. İyonik kompozisyonu azaltırlar. Böylece doku ile kriyoprotektif ajan arasında dengelenme sağlanır, bu dengelenme sonucunda ise doku ile çözgen arasında “camsı form” yapısı oluşur. Bu camsı form, doku karşısında maruz bırakılan kriyoprotektanın yoğunluğuyla orantılıdır [62]. Su, çekirdeklenmeden (nükleasyon) önce dondurulursa kristalizasyon engellenir. Molarite, çözünürlük, ozmolarite ve hücre geçirgenliği buz kristal oluşumunda ve camsı forma geçişte hayati rol oynayan faktörlerdir [63].

Camsı forma geçiş esnasında dokunun daha az toksik hasara maruz kalması amaçlanarak hücre dışında kalan (non-permeable) kriyoprotektif ajan kullanılabilir. Kriyoprotektanlar buz kristali oluşumunu önler ve camlaştırmaya yardım ederler (antifiriz etkisi). Donma ısısını düşürürler ve viskoziteyi artırarak hücre hasarını önlerler.

Günümüzde hücre içine giren (permeable) kriyoprotektan olarak kullanılan maddeler;

- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Etilen glikol (EG)
- Propanodiol (PrOH)
- Gliserol (GLY)

Hücre dışında kalan (non-permeable) kriyoprotektan olarak kullanılan maddeler;

- Şeker kökenli olarak; Sükroz, trehaloz ve rafinoz
- Hayvan kökenli makromoleküller; Serum ve yumurta sarısı
- Polimerler; Fikol, dekstran, polietilen glikol, polivinil alkol,
- Antifiriz proteinlerdir.

## 2.10. Hayvanlarda Ovaryan Doku Kriyoprezervasyonu

Ovaryum dokusu kriyoprezervasyonu 1950’ lerin başından beri uygulanmaktadır [64]. Parrot, farelerde dondurulup çözülmüş ovaryum dokusunda ortotopik greftlemeden sonra fertilizasyonun yeniden düzenlenmesinin mümkün olduğunu göstermiştir. Gosden ve arkadaşları ise koyun ovaryum dokusunun dondurulup çözümlenerek transplante edilmesiyle meydana gelen canlı doğum rapor etmişlerdir [56]. Benzer raporlar, sıçan ve tavşanlarda da bildirilmiştir [65]. Hayvanlardaki bu başarılı çalışmalar, ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonunun insan için mümkün olan bir uygulama ve fertilitate korunmasının uygulanabilir bir aracı olduğunu kanıtlar [66].

## 2.11. İnsanlarda Ovaryan Doku Kriyoprezervasyonu

Parrot ve arkadaşlarının fare ovaryum çalışmasından yaklaşık 30 yıl sonra, iki farklı grup insan ovaryum dokusu kriyoprezervasyonunda başarılı sonuçlar bildirmişlerdir. Hovatta ve arkadaşları, insan ovaryum doku kriyoprezervasyonunun uygulanabilir olduğunu göstermiştir [57]. Ondokuz hastadan ovaryum dokusunu 2 farklı kriyoprotektan protokolü kullanarak dondurdular. İki dokuda da follikül ve oosit morfolojisinde farklılığa rastlanmamıştır. İkinci grup; Newton ve arkadaşları, 8 donörden ovaryum korteksi olarak 4 farklı kriyoprotektanla 2 ay sonra immün baskın farelere transplante etmiş ve histolojik değerlendirmede folliküllerin %14-84 oranında canlı olduğunu göstermiştir [67]. Hovatta ve arkadaşları kriyoprezerve ovaryum dokusundaki folliküllerin 10-15 güne kadar canlılığını koruduğunu göstermiştir [57]. İnsanda ovaryum korteksinin kriyoprezervasyonundan sonra ovaryum fonksiyonunun *in vivo* geri dönüşümü ilk olarak Oktay ve Karilkaya tarafından gösterilmiştir [68]. Bu ortotopik transplantasyon, menapozal gonadotropin stimülasyonuna cevaben sol periton altına laparoskopik yolla transplante edilen ovaryum doku parçalarında follikül gelişimi ile sonuçlanmıştır. Oktay ve arkadaşları çalışmalarında ovaryum korteksini ön kola transplante ederek iki hastada foliküler gelişimin ve endokrin fonksiyonların geri geldiğini göstermişlerdir [69]. Bu hastalardan birinden, gonadotropin stimülasyonundan sonra perkütanöz oosit elde edilmiştir. Alınan üç oositten ikisi postmatür, biri metafaz I evresindedir. *In vitro* olgunlaştırılan oosite ICSI yapılmasına rağmen, fertilizasyon gerçekleşmemiştir. 2004' ün sonlarında aynı grup, akciğer kanserli bir hastadan alınan ovaryum kortikal bantlarının dondurulup çözüldükten sonra karın derisine transplante edilmesi sonrası elde edilen oositlerden normal bir embriyo gelişimi sağlamıştır [70].

Otolog ortotopik transplantasyondan sonra dondurulup çözülen ovaryum korteksinden elde edilen ilk canlı doğum, Donnez başkanlığındaki Belçikalı bir grup tarafından rapor edilmiştir [71]. Başka bir çalışmada Hodgking lenfomalı hastanın ovaryumu, kanser tedavisinden önce kriyoprezervasyonla dondurulmuş, çözülen kortikal bantlar inaktif sağ ovaryum hilumuna peritoneal bir pencere açılarak transplante edilmiştir. Bu, spontan bir gebelik ve Tamara adında bir kız çocuğunun doğumu ile sonuçlanmıştır. Oktay ve Tilly, bu gebeliğin kaynağının, transplante edilen doku mu, inaktif ovaryum mu olduğu konusunda şüpheye düşmüşlerdir. Donnez ve arkadaşları, endokrinolojik, laparoskopik ve ekografik olarak gebeliğin transplante edilen tarafta gelişen follikülden kaynaklandığını göstererek bu soru işaretlerini cevaplamışlardır. Diğer bir spontan gebelik dondurulup çözülmüş ovaryum dokusunun ortotopik transplantasyonundan elde edilerek bildirilmiştir [72]. Dondurulup çözülmüş ovaryum dokusunun transplantasyonundan sonra IVF ile oluşan gebelik, canlı doğum ile sonuçlanmıştır [73].

Canlı doğumlarla sonuçlanan araştırmalar, bu tedavi seçeneğini erken ovaryum yetmezliği olan kadınlar için umut verici hale getirmiştir [74].

## 2.12. Ovaryum Doku Kriyoprezervasyonu İçin Endikasyonlar

Ovaryum doku kriyoprezervasyonu için potansiyel olasılıkları birçok yazar listelemiştir [75]. Bu tanıların başlıcaları; akciğer kanseri, serviks kanseri, lösemi, lenfoma, Hodgkin hastalığı, sarkom, ovaryum ya da endometriyum kanseri, otoimmün hastalıklar ve nöroblastom vb. hastalıklardır. Diğer iyi ve kötü huylu hastalık tanısı alan hastalara radyo ya da kemoterapiden önce ovaryum doku kriyoprezervasyonu önerilir. Kemik iliği ya da kök hücre transplantasyonuna giden hastalar transplantasyondan önce ovaryum yetmezliği ile sonuçlanan yüksek doz kemo ya da radyoterapi almaları nedeniyle ovaryum doku kriyoprezervasyonu için potansiyel adaydırlar [76]. Ovaryum doku kriyoprezervasyonu Turner sendromu gibi kanser olmayan vakalara da önerilebilir [77] ancak ovaryumda kanser saptanan hastalara ototransplantasyon için ovaryum doku dondurulması önerilmemelidir [70]. Bu nedenle, ovaryum kriyoprezervasyonu önerilmeden önce, ovaryumun metastaz için taranması gereklidir. Akciğer kanserli hastalarda, ovaryum metastazı ekarte edilmelidir çünkü akciğer kanserinde (BRCA) gen mutasyonu varlığında ovaryum kanseri ve ovaryum metastazı riski artmaktadır [78]. Eğer erken ovaryum yetmezliği için monozigotik ikizlerden diğerine ovaryum doku şeritleri transplante edilirse normal gebelik ve canlı doğum mümkündür.

Ovaryum doku kriyoprezervasyonu, ovaryum kanseri hariç, fertilitesi korunacak ve düzenlenecek her kadın hastaya önerilebilir. Ovaryum kanserli hastalarda, ovaryum çıkarıldıktan sonra IVF laboratuvarında *in vitro* matüre edilen oosit eşinin spermeleri ile fertile edilebilir. Fertilize oositler, dört hücreli embriyo haline gelince hasta tedavisini tamamlayana kadar dondurulabilir. Bu uygulama, eşi olmayan kadınlarda ve prepubertal dönemdeki hastalarda uygulanamaz.

Ovaryum kriyoprezervasyonu, fertilitenin korunması için umut vadeden bir yöntemdir. Dondurulmuş ve transplante edilmiş ovaryumdan spontan gebelik bildirilmesine rağmen, tekniğin hala deneysel olduğu düşünülmektedir. Kanıtlar transplantasyon lehinde olmasına rağmen, gebeliğin kaynağının transplante edilen ovaryum dokusundan mı düzelen menapozal ovaryumdan mı olduğu henüz açıklığa kavuşmuş değildir. Ovaryum doku kriyoprezervasyonu ile ilgili etik problemler, tekniğin araştırılmasını geleceğe ertelemektedir [48].

### 2.13. Çalışmamızın Çıkış Noktası

Primordiyal folikül aktivasyonu ve folikülogenezde rol alan aktivatör ve baskılayıcı faktörlerin normalde dengeli bir şekilde çalıştıkları bilinmektedir [79]. Bu baskılayıcı ve aktivatörlerin dengesinin bozulması durumunda, folliküllerin kitlesel aktivasyonu nedeniyle prematür ovaryan yetmezlik meydana gelmektedir.

Öktem ve arkadaşları 2011 yılında vitrifiye edilmiş insan ovaryumlarının, yavaş dondurulmuş ovaryumlardan daha az primordiyal foliküle sahip olduğunu ve primordiyal havuz belirleyici olan AMH molekülünü daha az eksprese ettiğini göstermişlerdir [80]. Kim ve arkadaşları yine aynı yıl yavaş dondurmanın vitrifikasyona göre kültür ortamında da daha etkili sonuç verdiğini göstermiştir [81]. Amorim ve arkadaşları, insan ovaryum dokusundaki Kit Ligand ve AMH ekspresyonunda kriyoprezervasyon ve transplantasyonun etkisini araştırmışlar ve transplante edilen taze dokuda ve dondurulup çözülüp transplante edilen dokuda primordiyal foliküllerde azalan bir kit ligand ekspresyonu göstermişlerdir. Kit ligandın foliküldeki azalan ekspresyonu büyüme, farklanma ve apoptoz vb. olaylara etki ederek folikül aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır [82-83].

Literatürdeki bu çalışmalar ışığında, ovaryum doku kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında meydana gelen folikül kaybının nedenleri arasında foliküllerin büyümelerinin baskılanma mekanizmasının bozulmuş olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda; ovaryum kriyoprezervasyon ve transplantasyon sürecinde primordiyal folikül aktivasyonunu baskılayan mekanizmaların ekspresyonlarını değerlendirdik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Elde Edilmesi

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 17.05.2013 tarihli onayı alındıktan sonra yapılmıştır. Çalışmaların bir kısmının yapıldığı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Kök Hücre ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarları'ndan gerekli yazılı izin alınmıştır. Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarından 28 adet, 4-6 haftalık, Wistar türü, menstrüel siklusu başlamış, dişi sıçan kullanıldı.

Sıçanlar su ve besin kısıtlaması olmaksızın, 12'şer saatlik aydınlık/ karanlık döngüsünde tutuldu. Dişi sıçanlar ketalar anestezisi ile uyutulup ovaryumları elde edildi, her iki ovaryum 4'er eş parçaya bölünüp yaklaşık 1mm<sup>3</sup> lük 8 ovaryum parçası elde edildi. Anestezi almış hayvan sırt üstü yatırılıp karında, dorsal orta-lumbar bölge traşlanıp, iyodin ve alkol ile temizlendi. Deri, kaudal kısımla göğüs kafesi arasında, derinin dorsal orta hattına doğru 2-3 cm kesildi. İkinci ve 5. lumbar vertebralar hizasında *linea alba* üzerinde, karında 0.5-1.0 cm'lik bir insizyon açıldı. Hafif bir manipülasyon ile ovaryumlar ve etrafındaki yağ doku saptanıp dışarı çıkartıldı ve ovaryumlar yağ dokusu ile birlikte elde edildi. 4.0 emilebilir sutur ile uterus ve damarlarının kranial kısmı ligatüre edildi. Ovaryumlar, L-15 solüsyonu içeren bir petri kabında tutuldu. Çevre dokular makas ve pens yardımıyla ayrılıp ve aynı sıçana ait her bir ovaryum 1 mm<sup>3</sup> parçalar olacak şekilde bölünüp aşağıdaki gruplar oluşturularak bu gruplara dağıtıldı;

1-Kontrol grubu (K): Sıçanlardan (n=28) elde edilen ovaryum parçalarından iki tanesi kontrol grubu olarak doğrudan parafin takibe alındı.

2-Yavaş dondurma yöntemi ile dondurulup-çözülen grup (DÇ): Sıçanlardan (n=28) alınan ovaryum dokularından iki tanesi dondurulup-çözüldü ve parafin takibe alındı.

3-Taze alınan ve transplante edilen grup (T): Sıçanlardan (n=28) alınan ovaryum dokularının iki tanesi yine aynı sıçanın sırt kası (*m. trapezius*) içerisine transplante edildi (ototransplantasyon yapılmış heterograft). İki hafta sonunda elde edilen transplantlar parafin takibe alındı.

4-Yavaş dondurma yöntemi ile dondurulup-çözülen ve transplante edilen grup (DÇT): Sıçanlardan (n=28) alınan ovaryum dokularının iki tanesi dondurulup çözüldükten sonra yine aynı sıçanın sırt kası (*m. trapezius*) içerisine transplante edildi (ototransplantasyon yapılmış heterograft). İki hafta sonunda elde edilen transplantlar parafin takibe alındı.

DÇ ve DÇT gruplarda uygulanan dondurma işlemleri yavaş dondurma yöntemiyle "slow-freezer" cihazı (SY-LAB Ice Cube series) kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.2. Elde Edilen Dokuların Taşınması

Sıçan ovaryumları çıkarılır çıkarılmaz +4 °C de tutulan taşıma solüsyonu içerisine alınarak buz üzerinde laboratuvar ortamına taşındı.

### 3.3. Yavaş Dondurma Tekniğinin Uygulanışı

Sıçan ovaryumları 1,5 M dimetil sülfoksit (DMSO), %20 fetal sığır serumu (FBS), 0,1 M süzkroz içeren kriyoprotektana aktarılarak 1 ml dondurma solüsyonunda kriyo tüpler içinde 4<sup>0</sup>C de 30 dakika süreyle çalkalanarak bekletildi. Dengelenme sonrasında dondurma tüpleri (kriyovial) bilgisayar programlı yavaş dondurma cihazına alındı. Yavaş soğutma 0<sup>0</sup>C den başlamak üzere doku -7<sup>0</sup>C ye 2<sup>0</sup>C/dk hızla indirildi, 10 dakika -7<sup>0</sup>C de tutuldu ve manuel seeding yapılarak buz kristallesmesi kontrollü bir şekilde gerçekleştirildi. Takiben 0,3<sup>0</sup>C/dk hızla -40<sup>0</sup>C ye getirildi.

Son olarak -140<sup>0</sup>C ye 100<sup>0</sup>C/dk hızla soğutulup dondurma tüplerinde saklanmak üzere sıvı nitrojene transfer edildi.

### 3.4. Ovaryum Dokusunun Çözülmesi

Ovaryumların bulunduğu dondurma tüpleri sıvı nitrojenden çıkarıldı. Hemen 37<sup>0</sup>C deki su banyosuna transfer edilerek 1 dk. beklendi. Dondurma tüpleri 0,1 M süzkroz + 1 M DMSO içeren L-15 mediumuna alınır, burada 5 dakika bekletildi ve sonra sırasıyla 0,5 M DMSO + 0,1 süzkroz, 0 M DMSO + 0,05 M süzkroz içeren solusyonlarda her birinde 5 dakika tutuldu. Son olarak dokular L-15 kültür medyumunda tutularak fiksatif çözeltilerine aktarıldı.

### 3.5. Ovaryum Dokusunun Sırt Kasına Transplantasyonu

T ve DÇT gruplarındaki sıçanların sırt kası içerisine ovaryum doku transplantasyonu yapıldı (otolog transplantasyon, heterograft). Alıcı hayvanın sırt bölgesi açılarak taze veya dondurulup çözülen sıçan ovaryum dokuları *m. trapezius* kasının perimisyumuna 3-5 mm derinlikte bir insizyon ile yerleştirildi. Ovaryumlar sırt kası içerisinde 2 hafta bekletilip bu bölgeden elde edilen anastomozlu ovaryan doku parafin takibe alındı.



### 3.6. Parafin Doku Takibi

Tüm gruplardaki ovaryumlar parafin doku takibi yapılmak üzere alındı. Doku takibi prodesürü şöyle uygulandı: Alınan ovaryumlar, Bouin (750 mL doymuş pikrik asit, 250 mL %40'lık Formaldehit, 5 mL HCL) fiksatifine alındı. Dört saat oda ısında fiksatifte bekletilen dokular 1 saat suda yıkandıktan sonra birer gün boyunca sırasıyla %70, %80, %90 alkol serilerinden geçirilip ertesi gün son olarak 3 saat %100 lük alkolde bekletildikten sonra şeffaflaştırma işleminin ardından parafine gömüldü.

### 3.7. Folikül Değerlendirmesi ve Sayımı

Folikül değerlendirilmesi ve sayımı Gandolfi'ye göre yapıldı [84]. Her ovaryum bloğundan seri kesitler alınarak beş kesitte bir follikül sayımı gerçekleştirildi. Hematoksilen Eozin ile boyanmış preparatlar ışık mikroskopunda incelenerek her bir gruptaki sağlam (oosit küresel, pre-granüloza hücreleri düzgün) ve atretik (piknotik oosit, pre-granüloza hücreleri piknotik) primordiyal foliküller (oosit, tek tabakalı yassı epitel (pre-granüloza) hücreleri ile çevrelenmiş) sayıldı. Gruplar arasında sağlam primordiyal folikül yüzdeleri toplam folikül sayısına oranlayarak belirlendi ve karşılaştırıldı.

### 3.8. İmmünohistokimya

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler, Poli L-Lizin kaplı lamalar üzerine alınarak bir gece 56 °C'lik etüvde bekletildi. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirilip her birinde 5 dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Kesitler distile suda çalkalandı ve fosfat tuzu tamponunda (PBS; pH: 7.2-7.4) üç kez 5 dakika yıkandı. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 200 ml sitrat tamponuna (pH:6.0) konularak mikrodalgada 7 dakika 750W'ta kaynatıldı. Mikrodalga fırının dışına alınan kesitler 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Hidrofobik kalemle etrafi çizilen kesitler, distile sudan ve ardından PBS'ten geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla, kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edildi. PBS'te 2 defa 5 dakika yıkanan kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla, bloklama serumu ile 7 dakika muamele edildi. Serumun fazlası alınan kesitler; phosphatase and tensin homolog (p-pTEN) (Cell Signaling – Katalog No: #9551 Ser380, anti-Rabbit, 1/50µl), p27 (Santa Cruz – Katalog No: #Sc-528, anti-Rabbit, 1/400µl), tuberous sclerosis complex1 (Tsc1) (Abcam – Katalog No:ab59274 p-T1462, anti-Rabbit, 1/50µl) ve anti-Müllerian hormon (AMH) (Abcam – Katalog No: #ab84952, anti-Rabbit, 1/50µl) primer antikoru ile + 4°C'de gece boyu inkübe edildi. Kesitler inkübasyon sonunda PBS ile üç defa beşer dakika yıkandı. Daha sonra sırasıyla, 60 dakika biyotinli tavşan sekonder antikoru (Vector, katalog no: ba-1000 dilüsyon: 1/1000 µl) ve 30 dakika avidin-biyotin kompleksi (Vectastain elite kit katalog no:pk-6100) ile oda ısısında nemli ortamda inkübasyonlar yapıldı. Her iki uygulama sonrasında da PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı. Sinyalleri geliştirmek için dokular 1 dakika diaminobenzidin (Sigma- aldrich katalog no:D4293) kromojeni ile muamele edildi ve musluk suyunda yıkandılar.

Kesitlere Mayer's Hematoksilen (Merck) ile zıt boyama yapıldı ve rehidratasyondan sonra kesitler entellan (Merck) ile kapatıldı.

pTEN, p27, Tsc1 ve AMH boyanmaları ışık mikroskobunda değerlendirilerek fotoğaflandı.

### **3.9. H-Score Analizi**

Her bir kesit için ışık mikroskobu altında 40X büyütmede kesit düzleminde bulunan tüm primordiyal foliküllerinde oosit ve folikül hücrelerinin sitoplazmik veya nükleer ekspresyon yoğunluğuna göre [0 (boyanma yok), +1 (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma), +2 (orta şiddetli boyanma) ve +3 (yoğun boyanma)] araştırılan proteinlerin ekspresyon şiddeti hesaplandı. Hesaplama için HSCORE formülü kullanıldı. [ $\sum P_i(i+1)$ : 'i' boyanma yoğunluğu skorunu, 'Pi' boyanan hücrelerin yüzdesini gösterir].

### **3.10. İstatistiksel Analiz**

Non-parametrik test varsayımlarını (pTEN, Tsc1, p27 ve AMH ekspresyonları) gruplar arasında karşılaştırmak için Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi uygulandı. Normal dağılım şartını sağlayamayan değişkenler için ortanca (çeyreklikler arası genişlik) değerleri kullanıldı. Fark bulunduğu farklı grubu belirtmek için Dunn's post-hoc testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Kategorik değişkenlerin (K, DÇ, T, DÇT gruplarının) gösteriminde sayı ve yüzde değerlerine başvuruldu.

İstatistik analiz ve hesaplamalar SigmaStat versiyon 3.0 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA) ve SigmaPlot versiyon 11.0 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA) ile yapıldı. İstatistiksel kararlarda  $p \leq 0,05$  anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

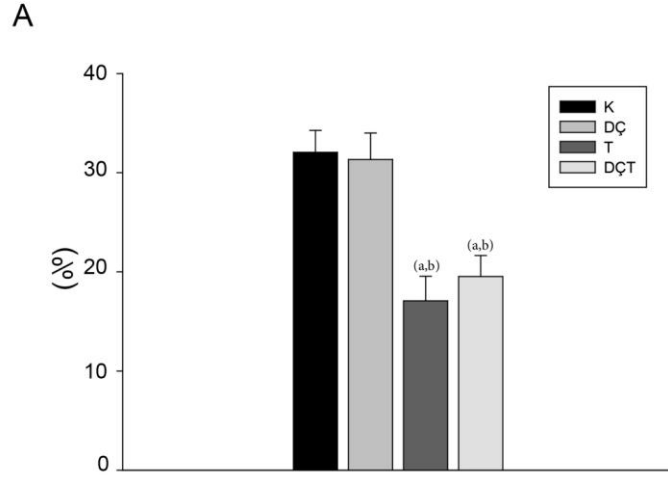
## BULGULAR

### 4.1. Folikül Sayıları ve Oranları

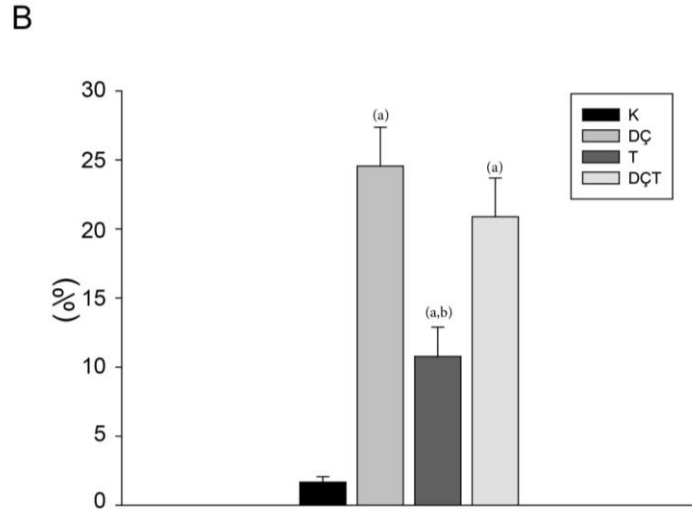
Kontrol grubu (K), yavaş dondurma yöntemi ile dondurup-çözülen grup (DÇ), taze alınan ve transplante edilen grup (T) ve yavaş dondurma yöntemi ile dondurup-çözülen ve transplante edilen grup (DÇT)' larda tüm foliküller (primordiyal, primer, sekonder, tersiyer) sayıldı. Sağlam ve atretik primordiyal foliküllerin oranları değerlendirildi.

Primordiyal foliküllerin oranları; K grubunda %32, DÇ grubunda, %31, T grubunda %17 ve DÇT grubunda %19 idi. Primordiyal folikül yüzde değerleri dört grup arasında karşılaştırıldığında; K grubu ile DÇ grubu arasında anlamlı bir fark görülmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT gruplarında primordiyal folikül oranı anlamlı olarak düşüktü ( $p<0,05$ ). Ancak, T grubu ile DÇT grubu arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.1.A)

Atretik olan primordiyal foliküllerin yüzde ortalamaları; K grubunda %1.6, DÇ grubunda %24.7, T grubunda %10.7, DÇT grubunda %21 idi. Primordiyal atretik folikül yüzde ortalamaları dört grup arasında karşılaştırıldığında; K grubundaki atretik primordiyal folikül oranı DÇ, T, DÇT gruplarına göre anlamlı olarak düşüktü ( $p<0,05$ ). Ayrıca, T grubunda DÇ grubuna göre atretik primordiyal folikül yüzdesi anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,05$ ). Fakat, T grubu ile DÇT grubu arasında atretik primordiyal folikül yüzdesi açısından anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.1.B).



**Şekil 4.1.A.** Toplam primordiyal folikül oranları  
 K: Kontrol grubu, DÇ: Dondurup-çözülen grup, T: Transplante edilen grup, DÇT: Dondurup-çözülen ve transplante edilen grup, a: K grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p<0,05$ ), b: DÇ grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p<0,05$ )



**Şekil 4.1.B.** Atretik primordiyal folikül oranları  
 K: Kontrol grubu, DÇ: Dondurup-çözülen grup, T: Transplante edilen grup, DÇT: Dondurup-çözülen ve transplante edilen grup, a: K grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p<0,05$ ), b: DÇ grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p<0,05$ )

#### 4.2. Phosphatase and Tensin Homolog (pTEN) Bulguları

pTEN proteininin primordiyal foliküllerdeki ekspresyonu tüm gruplarda değerlendirilmiştir. pTEN, K grubunda primordiyal folikülde hem oositte hem de folikül hücrelerinde sitoplazmik ve nüklear olarak ekspre olmaktadır (Şekil 4.2.A-a ve f).

DÇ grubunda primordiyal folikülün oositinde nüklear ekspresyon kaybolurken oosit sitoplazmasında ekspresyon izlenmektedir (Şekil 4.2.A-b ve g). Ancak sitoplazmik ekspresyonun K grubuna göre bir miktar azaldığı izlenmiştir. Primordiyal folikülde K grubuna benzer nüklear ve sitoplazmik ekspresyon izlenmiştir.

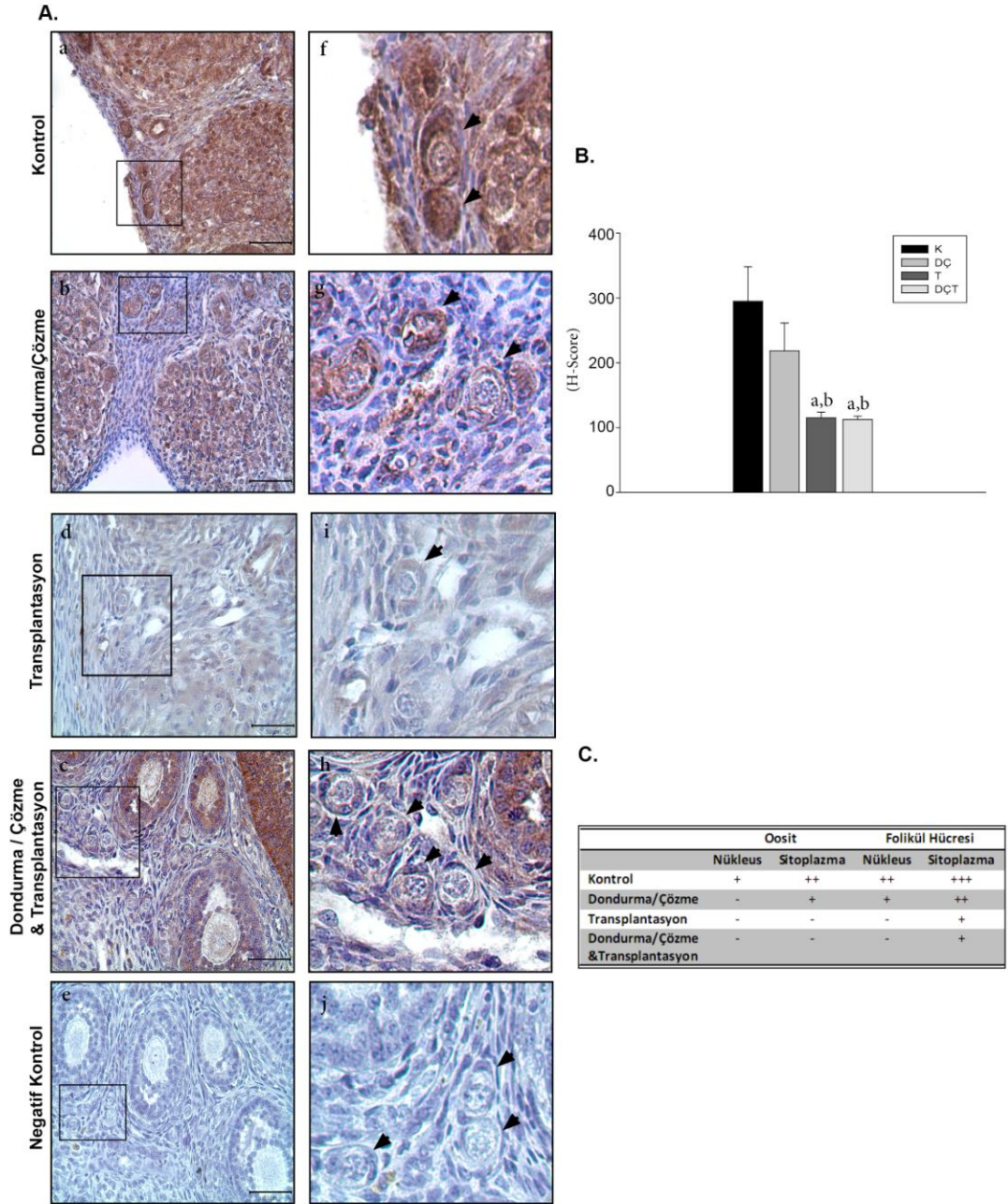
T grubunda primordiyal folikül oositinde ekspresyon belirgin şekilde azalmış hatta neredeyse ortadan kalkmıştır (Şekil 4.2.A-c ve h). Primordiyal folikül hücresi nükleusunda da pTEN ekspresyonu neredeyse yoktur fakat sitoplazmada düşük ekspresyonu izlenmiştir.

DÇT grubunda, T grubuna benzer şekilde primordiyal folikül oositinde ekspresyon neredeyse tamamen ortadan kalkmıştır. Folikül hücresi nükleusunda da ekspresyon belirgin şekilde azalmıştır. Sitoplazmada da düşük şiddette ekspresyon izlenmiştir (Şekil 4.2.A-d ve i).

Şekil 4.2.A- e ve j’de yöntemin ve pTEN antikorunun özgünlüğünü gösteren “negatif kontrol” kesiti görüntüsü verilmiştir.

Primordiyal foliküllerin pTEN ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; K ile DÇ grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT grupları arasında pTEN ekspresyon şiddetinde anlamlı düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.2.B).

pTEN ekspresyonunun primordiyal foliküldeki dağılımı Şekil 4.2.C’ deki tabloda özetlenmiştir.



**Şekil 4.2.** pTEN ekspresyonunun gruplardaki değerlendirilmesi

A) pTEN immünohistokimya sonuçları: a) Kontrol grubu, b) Dondurma/Çözme grubu, c) Transplantasyon grubu, d) Dondurma/Çözme ve Transplantasyon grubu, e) negatif kontrol, f) Kontrol grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, g) Dondurma/Çözme grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, h) Transplantasyon grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, i) Dondurma/Çözme ve Transplantasyon grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, j) negatif kontrol büyük büyütme, B) H-score analizi, a: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p < 0,05$ ), b: Dondurma/Çözme grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p < 0,05$ ), ok başları: primordiyal folikül C) pTEN ekspresyonunun primordiyal folikülde dağılımını gösteren tablo. (Skala bar = 50  $\mu$ m)

### 4.3. Tuberos Sclerosis Complex1 (Tsc1) Bulguları

Tsc1 proteininin primordiyal foliküllerdeki ekspresyonu tüm gruplarda değerlendirilmiştir. Tsc1, pTEN molekülüne benzer olarak kontrol grubunda primordiyal folikülde hem oositte hem de folikül hücrelerinde ekspresyon sitoplazmik ve nüklear olarak görülmüştür (Şekil 4.3.A-a ve f).

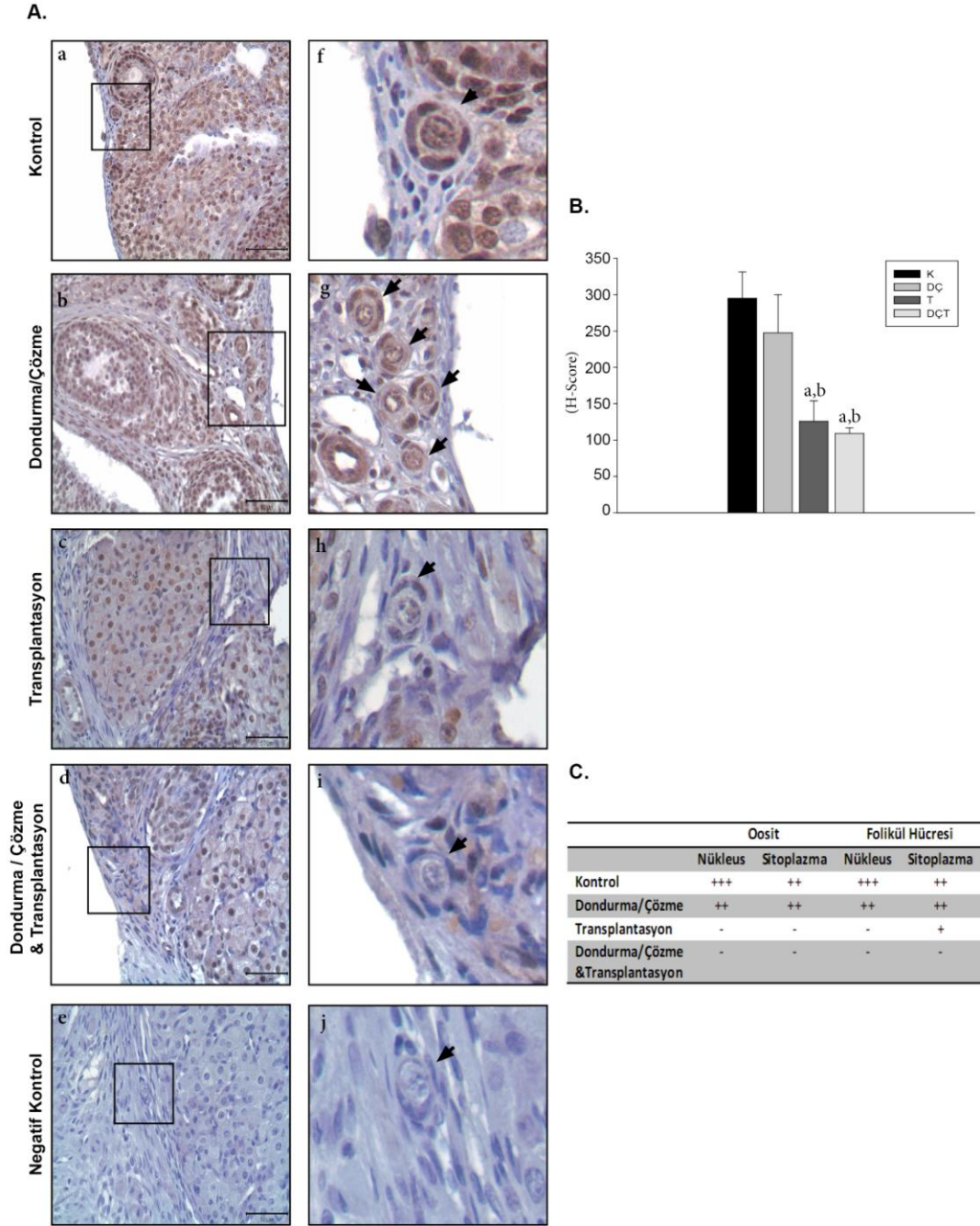
DÇ grubunda, kontrole benzer bir ekspresyon gözlemlendi fakat oosit nükleusundaki ekspresyon şiddetinde kontrole göre bir miktar azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.A-b ve g).

T grubundaki Tsc1 ekspresyonu, oosit nükleusunda ve sitoplazmasında neredeyse tamamen ortadan kalkmıştır. Folikül hücresinde de nüklear ekspresyon neredeyse görülmezken sitoplazmadaki ekspresyon seviyesi belirgin olarak azalmıştır (Şekil 4.3.A-c ve h).

DÇT grubundaki Tsc1 ekspresyonu T grubuna benzer şekilde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında neredeyse tamamen ortadan kalkmıştır (Şekil 4.3.A-d ve i).

Şekil 4.3.A-e ve j’de yöntemin ve Tsc1 antikorunun özgünlüğünü gösteren “negatif kontrol” kesiti görüntüsü verilmiştir.

Primordiyal foliküllerin Tsc1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; K ile DÇ grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT grupları arasında Tsc1 ekspresyon şiddetinde anlamlı düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.3.B) Tsc1 ekspresyonunun primordiyal foliküldeki dağılımı Şekil 4.3.C’ deki tabloda özetlenmiştir.



**Şekil 4.3.** Tsc1 ekspresyonunun gruplardaki değerlendirilmesi

A) Tsc1 immünohistokimya sonuçları: a) Kontrol grubu, b) Dondurma/Çözme grubu, c) Transplantasyon grubu, d) Dondurma/Çözme ve Transplantasyon grubu, e) negatif kontrol, f) Kontrol grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, g) Dondurma/Çözme grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, h) Transplantasyon grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, i) Dondurma/Çözme ve Transplantasyon grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, j) negatif kontrol büyük büyütme, B) H-score analizi, a: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p < 0,05$ ), b: Dondurma/Çözme grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p < 0,05$ ), ok başları: primordiyal folikül C) Tsc1 ekspresyonunun primordiyal folikülde dağılımını gösteren tablo. (Skala bar = 50  $\mu$ m)



#### 4.4. p27 Bulguları

p27 proteininin primordiyal foliküllerde gruplararası farklılıklar immünohistokimyasal düzeyde incelenmiştir (Şekil 4.4.A-a ve f). K grubunda primordiyal folikülün oositinde sitoplazmik ekspresyon ve nükleusunda düşük şiddetli ekspresyon izlendi. Folikül hücresi nükleusunda da benzer şekilde düşük şiddetli ekspresyon görülürken, sitoplazmik ekspresyon görüldü.

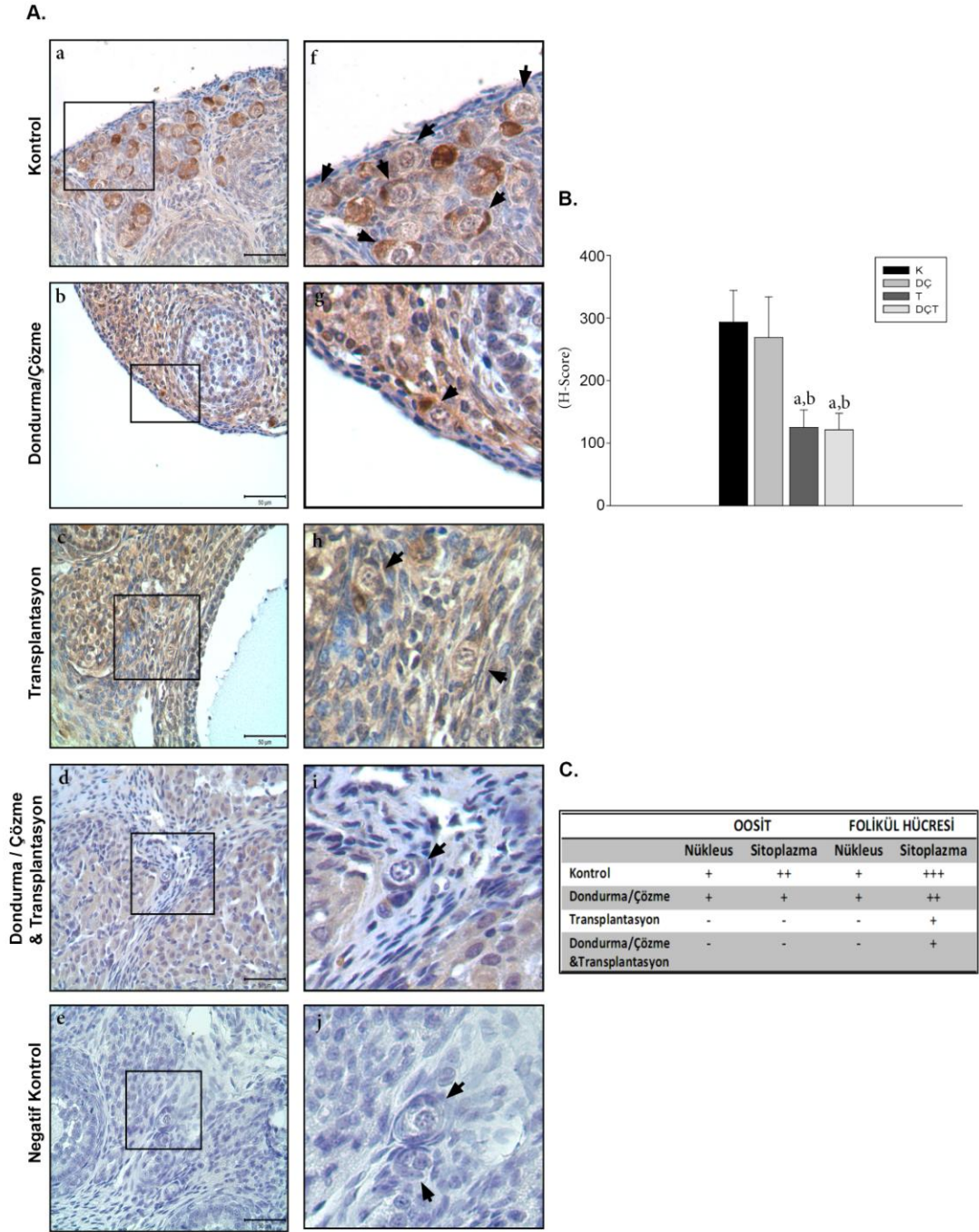
DÇ grubunda, K grubuna benzer olarak hem oositin nükleusunda ve sitoplazmasında hem de folikül hücresi nükleusunda ve sitoplazmasında ekspresyon izlendi. Ancak sitoplazmik reaksiyon K grubuna göre daha düşük şiddetli olarak izlendi (Şekil 4.4.A-b ve g).

Transplantasyon grubunda, primordiyal folikül oositinde ekspresyon belirgin olarak azalmıştır. Folikül hücresi nükleusunda da ekspresyon kalkmıştır fakat sitoplazmada düşük şiddetli ekspresyon izlenmiştir (Şekil 4.4.A-c ve h).

DÇT grubundaki p27 ekspresyonu T grubuna benzer şekilde, primordiyal folikül oositinde ekspresyon belirgin şekilde azalmıştır. Folikül hücresi nükleusunda da ekspresyon neredeyse tamamen azalmış fakat sitoplazmada düşük şiddetli ekspresyon izlenmiştir(Şekil 4.4.A-d ve i).

Şekil 4.4.A-e ve j’de yöntemin ve p27 antikorunun özgünlüğünü gösteren “negatif kontrol” kesiti görüntüsü verilmiştir.

Primordiyal foliküllerin p27 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında K ile DÇ grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT grupları arasında p27 ekspresyon şiddetinde anlamlı düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.4.B). p27 ekspresyonunun primordiyal foliküldeki dağılımı Şekil 4.4.C’deki tabloda özetlenmiştir.



**Şekil 4.4.**

p27 ekspresyonunun gruptaki değerlendirilmesi

A) p27 immünohistokimya sonuçları: a) Kontrol grubu, b) Dondurma/Çözme grubu, c) Transplantasyon grubu, d) Dondurma/Çözme ve Transplantasyon grubu, e) negatif kontrol, f) Kontrol grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, g) Dondurma/Çözme grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, h) Transplantasyon grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, i) Dondurma/Çözme ve Transplantasyon grubundaki kare ile belirlenmiş alanın büyük büyütmesi, j) negatif kontrol büyük büyütme, B) H-score analizi, a: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p < 0,05$ ), b: Dondurma/Çözme grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p < 0,05$ ), ok başları: primordiyal folikül C) p27 ekspresyonunun primordiyal folikülde dağılımını gösteren tablo. (Skala bar = 50  $\mu$ m)

#### 4.5. Anti-Müllerian Hormon (AMH) Bulguları

AMH, büyüyen foliküllerde eksprese edilen ve folikül havuzunu korumaya yönelik inhibe edici bir moleküldür. Bundan dolayı, AMH'nin immünohistokimyasal lokalizasyonunu belirlemek için büyüyen foliküllerin ekspresyonunu değerlendirdik.

Kontrol grubunda, folikül hücresi nükleusunda düşük şiddetli ekspresyon ve sitoplazmasında şiddetli ekspresyon görüldü (Şekil 4.5.A-a ve f).

DÇ grubunda, K grubuna benzer olarak folikül hücresi nükleusunda ve sitoplazmasında ekspresyon izlendi (Şekil 4.5.A-b ve g).

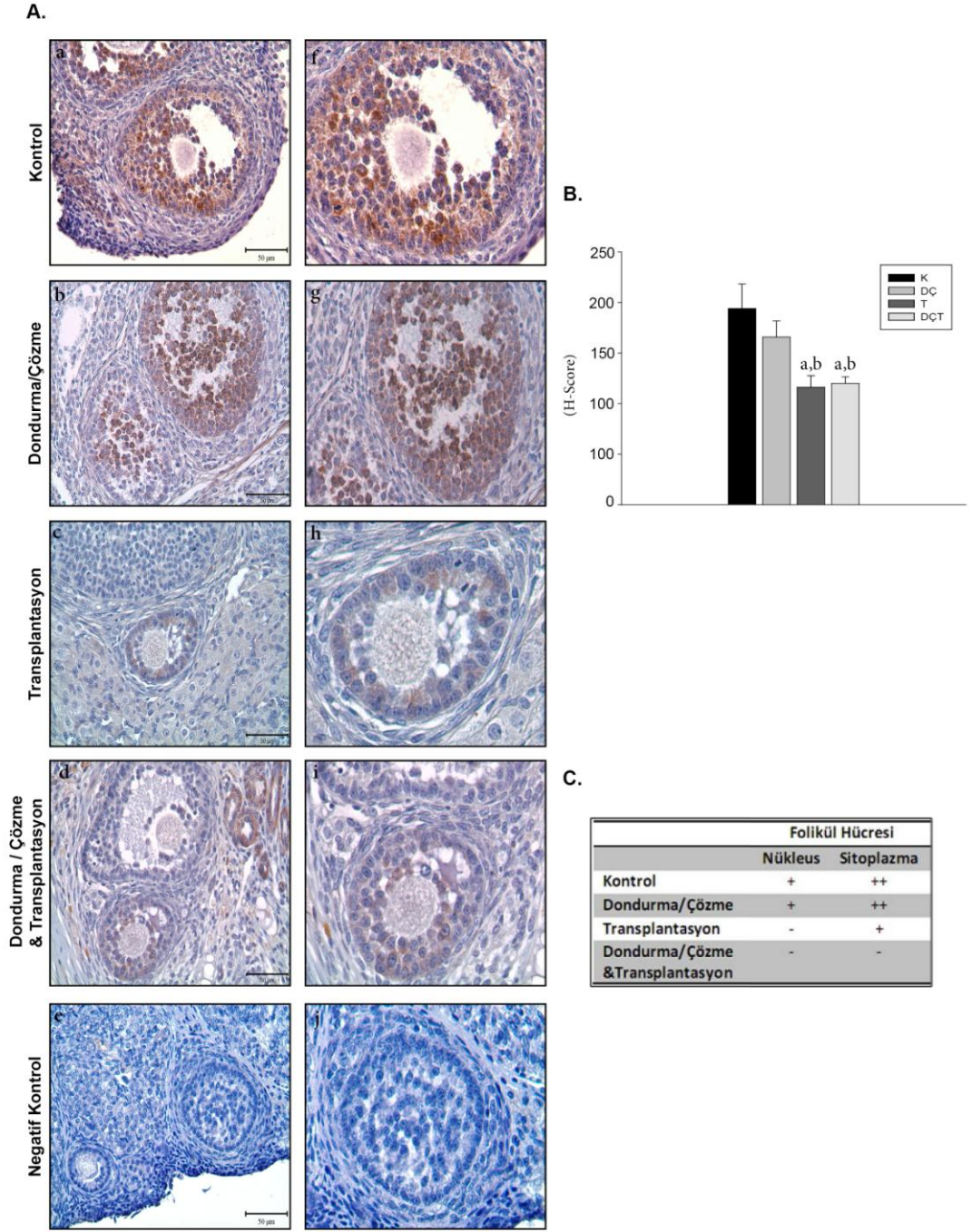
Transplantasyon grubunda, K ve DÇ gruplarına göre, büyüyen foliküldeki folikül hücresi sitoplazmasındaki ekspresyon belirgin bir şekilde azalmıştır. Folikül hücresi nükleusunda ekspresyon kalkmıştır (Şekil 4.5.A-c ve h).

DÇT grubunda AMH ekspresyonu belirgin olarak azalmıştır (Şekil 4.5.A-d ve i).

Şekil 4.5.A-e ve j'de yöntemin ve AMH antikorunun özgünlüğünü gösteren "negatif kontrol" kesiti görüntüsü verilmiştir.

Büyüyen foliküllerde AMH ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında K ile DÇ grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT grupları arasında AMH ekspresyon şiddetinde anlamlı düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.5.B).

AMH ekspresyonunun büyüyen foliküllerdeki dağılımı Şekil 4.5.C' deki tabloda özetlenmiştir.



**Şekil 4.5.** AMH ekspresyonunun gruplardaki değerlendirilmesi  
A) AMH immünohistokimya sonuçları: a) Kontrol grubu, b) Dondurma/Çözme grubu, c) Transplantasyon grubu, d) Dondurma/Çözme ve Transplantasyon grubu, e) negatif kontrol, f) Kontrol grubundaki folikülün büyük büyütmesi, g) Dondurma/Çözme grubundaki folikülün büyük büyütmesi, h) Transplantasyon grubundaki folikülün büyük büyütmesi, i) Dondurma/Çözme ve Transplantasyon grubundaki folikülün büyük büyütmesi, j) negatif kontrol büyük büyütme, B) H-score analizi, a: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p < 0,05$ ), b: Dondurma/Çözme grubuna göre anlamlı olarak farklı ( $p < 0,05$ ), C) AMH ekspresyonunun büyüyen folikülde dağılımını gösteren tablo. (Skalabar= $50\mu\text{m}$ )

## TARTIŞMA

Kanser hastası olan genç kadınlarda tedaviye yönelik yüksek doz kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları ovaryumu ve folikül rezervini olumsuz yönde etkileyerek prematür ovaryan yetmezliğe ve buna bağlı olarak infertiliteye sebep olmaktadır [76, 85-89]. Bu hastalarda fertilitiyi korumak için birkaç seçenek söz konusudur. Bunlar; oosit, embriyo ve ovaryan doku kriyoprezervasyonudur [90]. Ovaryan doku kriyoprezervasyonu, prepubertal kızlar için uygun tek seçenektir [91].

Günümüzde ovaryan doku kriyoprezervasyonu sadece seçilmiş hastalara deneysel bir protokol olarak tavsiye edilebilir. İnsan ovaryan doku kriyoprezervasyonunda yavaş dondurma yöntemi daha yaygın olarak kullanılmaktadır ve dondurulmuş dokunun ortotopik ootransplantasyon ile günümüze kadar 60 canlı doğum bildirilmiştir [7]. Ovaryan doku kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu iki teknikle uygulanabilmektedir. Bu yöntemler, yavaş dondurma ve vitrifikasyondur.

Araştırmalar hastaların tedaviye uygunluğu, dokuların toplanma metodu, optimal doku büyüklüğü, kriyoprotektan ve kriyoprezervasyon protokolleri, oositlerin *in vitro* maturasyonu (IVM) üzerinde odaklanmaktadır. Huang ve arkadaşlarının 26 hastadan aldıkları ovaryum doku parçalarını vitrifikasyon ve yavaş dondurma tekniklerini kullanarak karşılaştırdıkları çalışmada, primordiyal foliküllerin diğer foliküllere göre daha iyi korunduğu gösterilmiştir [91]. Isachenko ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yavaş dondurmanın, hızlı dondurmaya göre dokuyu daha iyi koruduğunu; morfolojik, endokrinolojik ve moleküler biyolojik değerlendirmelerle göstermişlerdir [92].

Ovaryum dokusunun dondurulması, araştırma merkezleri ve tüp bebek klinikleri için yeni bir hedef olarak görülmektedir [93]. Ovaryum farklı hücrelerden oluşan bir dokudur. Kriyoprotektanların hücrelere difüzyon hızı farklıdır ve buz kristal oluşumu her hücre ve doku tipine özeldir [94]. Bu nedenle, ovaryum kriyoprezervasyonunun doku üzerindeki etkisi oositler, folikül hücreleri ve stroma üzerindeki etkilerinin bir bileşimidir.

Ovaryan doku kriyoprezervasyonu, özellikle kanser hastalarında oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu ile karşılaştırıldığında bazı avantajlara sahiptir. Ovaryumdaki tüm foliküllerin %70-90'ını oluşturan primordiyal foliküller, dondurma ve çözme hasarına karşı daha dayanıklıdır. Küçük olması, düşük metabolik aktivite, zona pellusida ve periferik kortikal granüllerin yokluğu gibi karakteristik özellikler primordiyal foliküllerdeki bu toleransın nedenleridir. Ovaryan doku, menstrüel siklus ve kanser terapisinin gecikmesinden bağımsız olarak herhangi bir zamanda alınabilir. Bildiğimiz gibi, ovaryum folikülleri stroma hücreleri, kan

damarları, sinirler, ekstraselüler matriksten oluşan stroma dokusu içine gömülü halde bulunurlar. Stroma hücreleri, granüloza hücrelerinin çoğalması ve farklanmasında rol oynayan folikül bazal laminanın dışındaki teka interna ve teka eksternaya dönüşürler. Ekstraselüler matriks, ekstraselüler sinyal moleküllerinin dağılımını ve hücre proliferasyonu, adezyonu ve hareketini etkileyen hücre yüzeyindeki olayları düzenler. Bu nedenle organ içerisindeki primordiyal foliküller, kültüre edilenlerden daha iyi gelişirler [95-96]. Organ kültürlerindeki dondurulmuş ve taze primordiyal ve primer foliküllere ekstraselüler matriks eklemek folikül gelişimini iyileştirir. Bu bulgular, folikül gelişiminde ovaryum stroma hücrelerinin ve ekstraselüler matriksin destekleyici bir rol oynadığını gösterir [97].

Çözme işleminin hücre şişmesine, doku ödeme ve damar hasarına neden olduğu belirtilmiştir. Oositte ve granüloza hücrelerinde vakuolizasyon artışı, endoplazmik retikulum ve mitokondri hasarını gösterebilir. Dokuda uygun olmayan dehidratasyon sonucu buz kristallerinin oluşturduğu yapılar olabilir. Oosit ve granüloza hücre çekirdeğinde piknozda artış görülebilir. Plazma, çekirdek ve organel membranlarında, buz kristali oluşumu, osmotik stres ve düşük sıcaklık nedeniyle hasar görülebilir. Mitokondri membranında, krista ve matrikste hasar ve şişme foliküler hasarın ilk belirtileridir. Yüksek kriyoprotektana maruziyet sonucu granüloza hücrelerinde boş sitoplazma alanları, hücre içeriğinin kaybına rastlanabilir. Hücreler arası bağlantılarda bozukluklar hem granüloza hücreleri arasında hem de oosit ve granüloza hücreleri arasında gözlenebilir. Folikül hücrelerinde düzensizlik, bağlantı kaybı, hücreler arası alanda vakuolize alanlar gözlenir. Folikül hücresi dejenerasyonu ve hücreler arası bağlarda kayıp bu hücrelerde apoptozu indükler. Damar yapılarında nükleer, sitoplazmik membranda çöküntüler, şişmiş sitoplazma, hücre bağlantılarının devamlılığını kaybetmesi kriyoprezervasyonda gözlenebilen hasarlardır. Bu hasarlar geri dönüşümlü olabilir. Ovaryum dokusunun dondurulması ile ovaryumun endokrin fonksiyonu korunabilir. Bu durum, oosit ve embriyo dondurulması ile sağlanamaz [98].

Başarılı bir transplantasyon için, çok küçük boyutta (1-2 mm) ovaryan korteks dokusunun kriyoprezervasyonu önerilmektedir [99]. Küçük grafların implantasyonu net bir şekilde neovaskülarizasyon sürecine bağlıdır. Böylece, yeni vaskülogenez sağlanana kadar implantlar post-transplantasyon döneminde iskemik hasara maruz kalır. Farede yapılan çalışmalar, ovaryan otograftın perfüzyon başlangıç süresinin postoperatif 3. gün olduğunu göstermiştir [100]. Sıçanda, ovaryan zenograftaki fonksiyonel damarlanma postoperatif 7. Günde gösterilmiştir [101]. İnsanda ise, transplantasyondan sonra ilk beş gün hipoksik periyodu görülür. Bunu izleyen 5 gün içinde de ovaryan graftın oksijenlenme sürecine ihtiyacı olduğu bilinmektedir [102]. Revaskülarizasyon sürecindeki gecikme büyük oranda primordiyal folikül kaybına neden olarak, ovaryan transplantın başarılı implantasyonunu sınırlandırmaktadır. Otograft süresindeki iskemik hasar, folikül rezervinin %60-95 oranında tükenmesine sebep olmaktadır [103]. Bu da, ovaryan transplantasyon sonrası neoanjiyogenez sürecinin iyileştirilmesi gerektiğini doğrulamaktadır [104].

Ovaryan anjiyogenezin düzenlenmesi pekçok anjiyogenik ve vazoaktif faktörün kompleks etkileşimiyle sağlanır [105]. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), hücre göçünde, proliferasyonda, endotel hücre farklanmasında, immatür damarların formasyonunda ve damar geçirgenliği gibi pek çok anjiyogenik olayda önemli rol oynayan bir faktördür [106]. Fibroblast büyüme faktörleri (bFGF), endotelial hücre göçü, bölünmesi, folikülogenez sürecinde granüloza hücre sağkalımında rol alması gibi birçok süreçte aktif rol oynar. Ovaryumda, VEGF ve bFGF granüloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde ekspre edilir [107]. bFGF'in kültüre edilmiş granüloza hücrelerini hücre ölümünden koruduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [108].

Erken anjiyogenezin başlatılması transplant ovaryum dokusunun korunumu için önemli bir faktördür. Anjiyogenik faktörlerin, iskemik hipoksinin engellenmesinde ve transplantasyon sonrası neovaskularizasyonun tetiklenmesinde kritik rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [109].

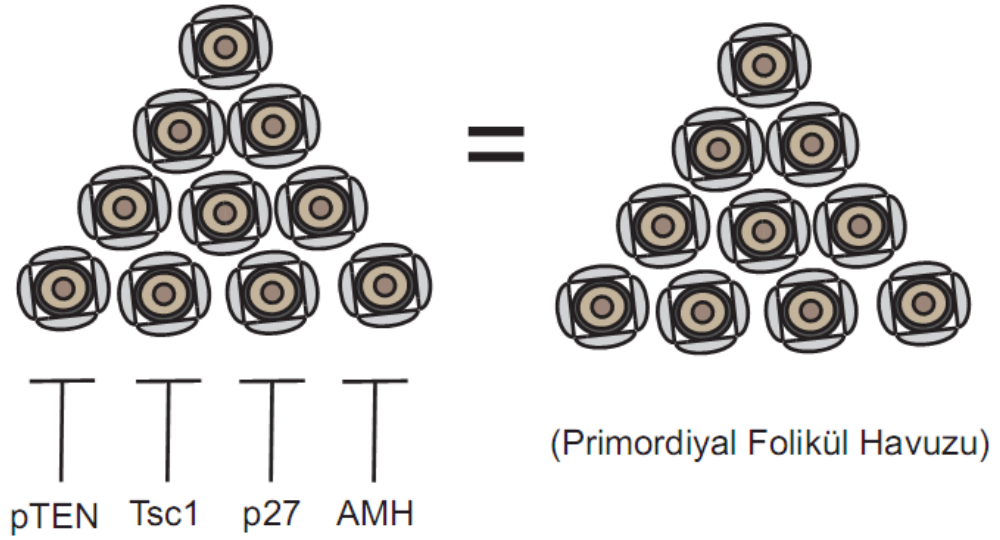
Son yıllarda, genetik ve karakteristik olarak modifiye edilen fare modelleri sayesinde memeli primordiyal folikül sağkalımı ve dormansisi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar artmaya başlamıştır. Primordiyal folikül aktivasyonu ile ilgili en önemli sinyal yollarından birisi olan pTEN, aslında bir tümör baskılayıcı yolak olarak bilinmektedir. pTEN, folikülogenez boyunca granüloza hücrelerinden ekspre edilir. pTEN ekspresyonundaki artış, alt yolağı olan Akt yolağını baskılamakta ve folikül gelişimi süresince granüloza hücrelerinin farklanmasında ve/veya proliferasyonunu etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [110].

Hücrenin hipoksiye maruziyeti ile anti-apoptotik genlerin ekspresyonuyla PI3K/Akt yolağı aktifleştiği bilinmektedir. Akut miyeloid lösemi (AML) çalışmalarında, hipoksik koşulların PI3K/Akt yolağını aktive ettiği, S fazındaki AML hücrelerinde p27 aktivasyonunun azaldığı gösterilmiştir [111]. Ovaryumdan farklı dokularda da, hipoksik koşulların, pTEN yolağının inhibisyonu ile Akt yolağını aktive ettiği ve buna bağlı olarak hipoksiyi baskılamak için hücre siklus durdurucusu olan p27 molekülünün ekspre edildiği gösterilmiştir [112]. Ayrıca, pTEN yolağındaki disfonksiyonun anjiyogenez, hipoksi ve kanser vakaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [113].

Çalışmamızda, ovaryum kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında, pTEN'in baskılanması ile primordiyal folikül havuzu koruyan inhibitörlerden biri olan p27 molekülünün baskılandığını gösterdik. Hipoksinin, AML hücrelerinde de görüldüğü gibi, ovaryumdan farklı dokulardaki ve ovaryumdaki benzer etkisi bilinmektedir. Biz de çalışmamızda pTEN ekspresyonunun azaldığını diğer çalışmalara benzer şekilde gösterdik. Dolayısıyla, primordiyal folikül havuzunun tükenmesinde bu yolak diğer dokulardaki gibi rol oynar. Aynı yolağın ovaryum dinamiklerini etkilediği de söz konusudur.

Çalışmamızın bulgularına göre; primordiyal folikül gelişimini baskılayan mekanizmaların, ovaryum kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu ve sonrasında azalmasıyla folikül havuzunun tükenmesi arasındaki ilişkinin hipotetik mekanizması Şekil 5.1' de gösterilmiştir.

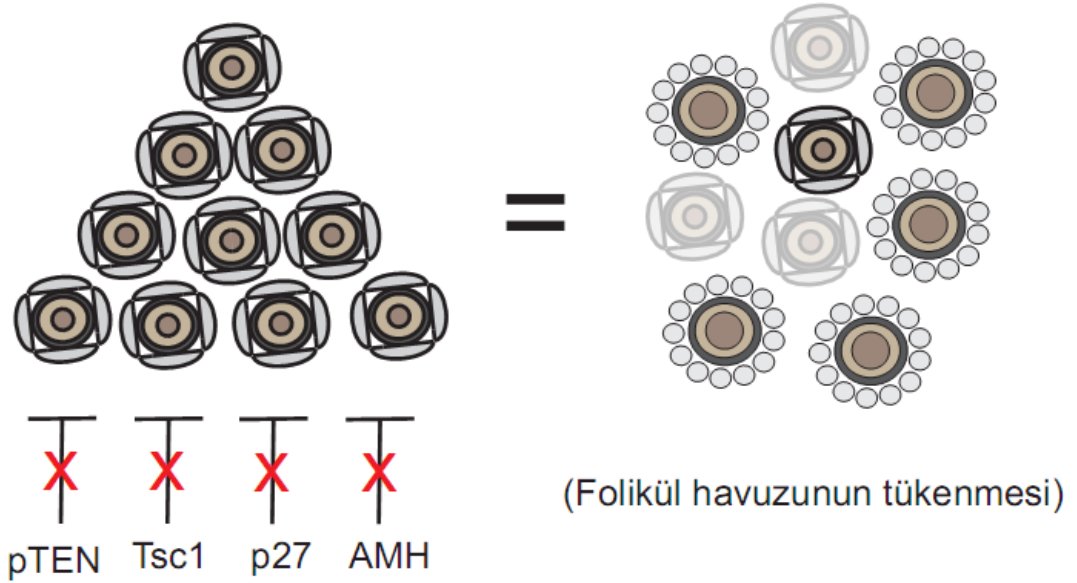
### Normal Şartlarda Primordiyal Folikül Havuzu



**Şekil 5.1.A** pTEN, Tsc1, p27 ve AMH moleküllerinin ekspresyonu ile korunan primordiyal folikül havuzu



## Ovaryum Kriyoprezervasyonu ve Transplantasyonu Sonrasında Primordiyal Folikül Havuzu



**Şekil 5.1.B** pTEN, Tsc1, p27 ve AMH inhibisyonunun ortadan kalkması ile gerçekleşen prematür folikül aktivasyonu

Mutant farelerde yapılan bazı çalışmalar birden fazla baskılayıcı molekülün sinerjik ve koordinatif bir şekilde çalışarak primordiyal folikül rezervini koruduğu, büyümelerini baskıladığını göstermiştir. Normal şartlarda, oosit ve/veya folikül hücrelerinde ekspre olan pTEN, Tsc, p27 ve AMH moleküllerinin baskılayıcı etkisi ile primordiyal foliküller dormant olarak kalırlar (Şekil 5.1.A). Ovaryum kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında pTEN, Tsc1, p27 ve AMH moleküllerinin inhibisyonu ortadan kalktığına, primordiyal foliküllerin kaybı ve erken aktivasyonu söz konusu olabilir (Şekil 5.1.B).

p27, TGF- $\beta$  gibi anti-mitojenik sinyallere yanıt olarak eksprese olur ve hücre siklusunun  $G_1$  fazında duraklamasından sorumludur [30]. Büyüme faktörlerinden mahrum kalan,  $G_0$  fazında bulunan veya kontakt inhibisyona maruz kalan hücrelerde p27 ekspresyonu artarken, hücre siklusuna giren hücrelerde ise azalır [31]. p27'nin degradasyonu  $G_{1/S}$  geçişi için kritik bir önem taşır. p27, D tip siklinler/CDK4 kompleksleriyle güçlü ve siklin E/CDK2 kompleksiyle de zayıf etkileşimdedir. D tip siklinler ve CDK4 kompleksleriyle etkileşime girdiğinde CDK4'ün katalitik aktivitesini ve böylece CDK4'ün Rb proteinini fosforlamasını (pRb oluşumunu) inhibe eder. Gerçekten de p27, siklin D veya pRb genlerini içermeyen farelerle yapılan bazı çalışmaların fenotipik sonuçları, p27 ve pRb eksik olan farelerde hiperplazi ve tümör oluşumu göstermiştir [32-37]. p27 geninden yoksun farelerde vücut büyüklüğünün artması, birçok organda

hiperplazi ve tümör oluşumu, p27'nin büyüme sınırlamadaki ve tümör baskılanmasındaki önemine işaret etmektedir [38-39]. p27 geni silinmiş farede, tüm primordiyal foliküllerde erken aktivasyon görülmüştür [40]. Böylece p27, primordiyal folikülün gelişiminde, dormant halde kalarak erken aktivasyonu önlemesinde kritik bir rol oynamaktadır [114]. Başka çalışmalarda, p27 geni silinmiş farelerin ovülasyonu ve lüteal hücre farklanmasını gerçekleştiremediği gösterilmiştir [115-116]. Bizim çalışmamızda da, primordiyal foliküllerde transplantasyon sonrası p27 ekspresyonu neredeyse ortadan kalkmıştır. Bu ekspresyonun ortadan kalkması ile folikül aktivasyonunun ilişkili olduğu önerilmektedir. Transplantasyon gruplarımızdaki primordiyal folikül sayısı ve oranlarına baktığımızda da, primordiyal folikül rezervindeki aşırı miktardaki azalma hipotezimizi güçlendirmektedir.

Mammalian target of rapamycin complex1 (mTORC1) aktivitesinin en önemli düzenleyicilerinden birisi, tüberoz skleroz kompleks 1 (TSC1) ve tüberin (TSC2) heterodimerlerinden oluşan tüberoz skleroz kompleks (TSC)'tir. TSC1, mTORC1 kompleksinin aktivitesini negatif yönde düzenleyen önemli bir tümör baskılayıcısıdır ve bu genin heterozigot mutasyonlarında, benign karakterli tüberoz skleroz tümörleri oluşur. mTORC2 ile ilgili yapılan çalışmalar bu kompleksin hücre iskeletinin düzenlenmesinde rolü olduğunu ve indirekt olarak mTORC1 kompleksini aktive ettiğini göstermektedir [117]. Tsc1 geni silinmiş farelerde postnatal 4.-23. günlerde yapılan çalışmalarda primordiyal foliküllerin aşırı aktivasyonu görülmüştür [10]. Transplant gruplarımızdaki primordiyal havuzun tükenmesi ile Tsc1 molekülünün ekspresyonunun azalmasının doğru orantılı olduğunu düşünmekteyiz. Transplantasyondan sonra Tsc1 ekspresyonunun azalması ile primordiyal folikül havuzunu koruyan mekanizma veya mekanizmaların dengesi bozuluyor olabilir. Çalışmamızın verileri de bu durumu destekler niteliktedir.

Başka bir TGF- $\beta$  süper ailesi üyesi olan AMH ise, büyüyen foliküllerin granüloza hücrelerinde ekpre edilir [118]. AMH'nin fonksiyonu, primordiyal foliküllerin erken aktivasyonunu önlemektir. AMH geni silinmiş farelerde yapılan çalışmalarda, postnatal 4. ayda primordiyal havuzun tükendiği görülmüştür [13]. Neonatal fare ovaryumu ile yapılan AMH kültürü çalışma sonuçlarında büyüyen foliküllerin %40-50 oranında azaldığı gözlenmiştir [119]. Bu da AMH'nin, folikül rezervini korumaya yönelik kritik bir rolü olduğunu göstermektedir. Benzer bir çalışmada kültüre edilmiş insan ovaryan kortikal dokusunda primordiyal folikül aktivasyonu rekombinant sıçan AMH'si ile baskılanmıştır [120]. Tamamlayıcı nitelikteki *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, AMH'nin primordiyal folikülden primer foliküle geçişi baskıladığını göstermektedir. Biz de çalışmamızda, büyüyen foliküllerde AMH ekspresyonunun düştüğünü gösterdik. Dolayısıyla, bu sonuçlar meydana gelen primordiyal folikül kaybında AMH'nin da rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

Önceden de belirttiğimiz gibi, ovaryum doku kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında meydana gelen primordiyal folikül kaybının nedenleri arasında primordiyal foliküllerin büyümelerinin baskılanma mekanizmasının bozulması da bir neden olabilir. Literatürde bilinmektedir ki, aktivatör ve baskılayıcı gen yollarının bozulmasıyla primordiyal folikül havuzunun erkenden tükenmesi meydana gelmektedir. Çalışmamızla, primordiyal folikülden primer foliküle geçişte baskılayıcı moleküller olarak görev alan pTEN, Tsc1, p27 ve AMH moleküllerinin ekspresyonlarının kriyoprezervasyon ve transplantasyondan sonra nasıl etkilendiğini immünohistokimyasal yöntemle araştırdık ve sonuçlarımız bu baskılayıcı moleküllerin ekspresyonlarının kriyoprezervasyondan bağımsız olarak transplantasyondan sonra ortadan kalktığını gösterdi.

Çalışmamızın sonuçları ile, primordiyal folikülden primer foliküle geçişte rol alan baskılayıcı moleküllerin ovaryum doku kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasındaki ekspresyonları literatürde ilk kez gösterilmiştir. Klinikte, insanlarda henüz düşük başarı oranları ile seyreden ovaryum re-transplantasyonu ile ilgili veriler kriyoprezervasyon ve transplantasyon protokollerinin belirlenmesi için yeterli değildir. Rodent modelleriyle yapılan kanser araştırmalarından elde edilen bulgular kadınlarda fertilitate korunumuna yönelik araştırmalara ve primordiyal folikül rezervinin korunmasında daha etkili yaklaşımlara ışık tutacaktır.

## SONUÇLAR

Primordiyal folikül yüzde değerleri dört grup arasında karşılaştırıldığında; K grubu ile DÇ grubu arasında anlamlı bir fark görülmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT gruplarında primordiyal folikül oranı anlamlı olarak düşüktü ( $p<0,05$ ). Ancak, T grubu ile DÇT grubu arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.1.A). Primordiyal atretik folikül yüzde ortalamaları dört grup arasında karşılaştırıldığında; K grubundaki atretik primordiyal folikül oranı DÇ, T, DÇT gruplarına göre anlamlı olarak düşüktü ( $p<0,05$ ). Ayrıca, T grubunda DÇ grubuna göre atretik primordiyal folikül yüzdesi anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,05$ ). Fakat, T grubu ile DÇT grubu arasında atretik primordiyal folikül yüzdesi açısından anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.1.B).

Primordiyal foliküllerin pTEN ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; K ile DÇ grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT grupları arasında pTEN ekspresyon şiddetinde anlamlı düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.2.B).

Primordiyal foliküllerin Tsc1 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; K ile DÇ grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT grupları arasında Tsc1 ekspresyon şiddetinde anlamlı düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ )

Primordiyal foliküllerin p27 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında K ile DÇ grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT grupları arasında p27 ekspresyon şiddetinde anlamlı düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.4.B).

Büyüyen foliküllerde AMH ekspresyon seviyeleri gruplar arasında H-Score ile değerlendirilip istatistiksel olarak karşılaştırıldığında K ile DÇ grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, K ve DÇ gruplarına göre T ve DÇT grupları arasında AMH ekspresyon şiddetinde anlamlı düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ )

## KAYNAKLAR

1. Sönmezer M. and Ozkavukcu S., *Fertility preservation in females with malignant disease-I: causes, clinical needs and indications*. Turkish Journal of Hematology, 2009: p. 26.
2. Sonmezer, M. and K. Oktay, *Fertility preservation in female patients*. Hum Reprod Update, 2004. **10**(3): p. 251-66.
3. Lee, S.J., et al., *American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients*. J Clin Oncol, 2006. **24**(18): p. 2917-31.
4. Hernandez, B.Y., et al., *Preview of Hawaii Cancer Facts and Figures 2010*. Hawaii Med J, 2010. **69**(9): p. 223-4.
5. Howell, S. and S. Shalet, *Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998. **27**(4): p. 927-43.
6. Saito, K., et al., *Sperm cryopreservation before cancer chemotherapy helps in the emotional battle against cancer*. Cancer, 2005. **104**(3): p. 521-4.
7. Donnez, J. and M.M. Dolmans, *Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice*. J Assist Reprod Genet, 2015. **32**(8): p. 1167-70.
8. Adhikari, D. and K. Liu, *Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles*. Endocr Rev, 2009. **30**(5): p. 438-64.
9. Reddy, P., et al., *Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool*. Science, 2008. **319**(5863): p. 611-3.
10. Adhikari, D., et al., *Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(3): p. 397-410.
11. Schmidt, D., et al., *The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance*. Development, 2004. **131**(4): p. 933-42.
12. Rajkovic, A., et al., *NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression*. Science, 2004. **305**(5687): p. 1157-9.
13. Durlinger, A.L., et al., *Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5789-96.
14. Michael H. Ross, W.P., *Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molacular Biology*. 6th edition ed. Vol. LWW. 2011: 6th edition.
15. Carneiro, J., *Basic Histology (Lange Medical Book)*. 10 edition ed. 2002: McGraw-Hill/Appleton & Lange; .
16. Sadler, T.W., *Langman's medical embryology*. 12th ed. ed. 2012, Baltimore: Williams & Wilkins.
17. Kierszenbaum, A.L. and L.L. Tres, *Histology and Cell Biology : an introduction to pathology / Abraham L. Kierszenbaum, Laura L. Tres*. 3rd ed. ed. 2012, Philadelphia: PA : Saunders.
18. Carlson, B.M., *Human Embryology and Developmental Biology*. 5th Edition ed. 2013: Saunders.
19. Keith L. Moore, T.V.N.P., *Clinically Oriented Embryology* 8ed. 2013: Nobel. 545.

20. Henderson, S.A. and R.G. Edwards, *Chiasma frequency and maternal age in mammals*. Nature, 1968. **218**(5136): p. 22-8.
21. Ying, Y. and G.Q. Zhao, *Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse*. Dev Biol, 2001. **232**(2): p. 484-92.
22. Ying, Y., X. Qi, and G.Q. Zhao, *Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7858-62.
23. Ohinata, Y., et al., *A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice*. Cell, 2009. **137**(3): p. 571-84.
24. Saitou, M., S.C. Barton, and M.A. Surani, *A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice*. Nature, 2002. **418**(6895): p. 293-300.
25. Lange, U.C., et al., *The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice*. BMC Dev Biol, 2003. **3**: p. 1.
26. Mc, K.D., et al., *Histochemical observations on the germ cells of human embryos*. Anat Rec, 1953. **117**(2): p. 201-19.
27. Merchant-Larios, H. and B. Centeno, *Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W<sup>v</sup> mouse*. Prog Clin Biol Res, 1981. **59B**: p. 383-92.
28. Oktem, O. and K. Oktay, *The ovary: anatomy and function throughout human life*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1127**: p. 1-9.
29. Oktem, O. and B. Urman, *Understanding follicle growth in vivo*. Hum Reprod, 2010. **25**(12): p. 2944-54.
30. Thomas D. Pollard, W.C.E., *Cell biology*. 2nd Edition ed. 2008: Philadelphia : Saunders/Elsevier.
31. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
32. Weinberg, R.A., *Tumor suppressor genes*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1138-46.
33. Jacks, T., et al., *Effects of an Rb mutation in the mouse*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 295-300.
34. Williams, B.O., et al., *Extensive contribution of Rb-deficient cells to adult chimeric mice with limited histopathological consequences*. EMBO J, 1994. **13**(18): p. 4251-9.
35. Fantl, V., et al., *Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development*. Genes Dev, 1995. **9**(19): p. 2364-72.
36. Sicinski, P., et al., *Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast*. Cell, 1995. **82**(4): p. 621-30.
37. Sicinski, P., et al., *Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 470-4.
38. Pagano, M., et al., *Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27*. Science, 1995. **269**(5224): p. 682-5.
39. Besson, A., et al., *Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype*. Genes Dev, 2007. **21**(14): p. 1731-46.

40. Rajareddy, S., et al., *p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(9): p. 2189-202.
41. Sicari, B.M., et al., *c-myc and skp2 coordinate p27 degradation, vascular smooth muscle proliferation, and neointima formation induced by the parathyroid hormone-related protein*. Endocrinology, 2012. **153**(2): p. 861-72.
42. Keniry, M. and R. Parsons, *The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5477-85.
43. La Marca, A., et al., *Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART)*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(2): p. 113-30.
44. Blatt, J., *Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer*. Med Pediatr Oncol, 1999. **33**(1): p. 29-33.
45. Meirow, D. and D. Nugent, *The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(6): p. 535-43.
46. Tulandi, T. and S. Al-Took, *Laparoscopic ovarian suspension before irradiation*. Fertil Steril, 1998. **70**(2): p. 381-3.
47. Revel, A., et al., *In vitro maturation and fertilization of oocytes from an intact ovary of a surgically treated patient with endometrial carcinoma: case report*. Hum Reprod, 2004. **19**(7): p. 1608-11.
48. Prasath, E.B., *Ovarian tissue cryopreservation: An update*. J Hum Reprod Sci, 2008. **1**(2): p. 50-5.
49. Lee, H.S., et al., *Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine*. Anim Reprod Sci, 2008. **103**(3-4): p. 336-47.
50. Santos, R.R., et al., *Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds*. Anim Reprod Sci, 2010. **122**(3-4): p. 151-63.
51. Luyckx, V., et al., *Evaluation of cryopreserved ovarian tissue from prepubertal patients after long-term xenografting and exogenous stimulation*. Fertil Steril, 2013. **100**(5): p. 1350-7.
52. Luyet, B., *Working hypotheses on the nature of life*. Biodynamics, 1934. **1**: p. 1-7.
53. Polge, C., A.U. Smith, and A.S. Parkes, *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures*. Nature, 1949. **164**(4172): p. 666.
54. Perloff, W.H., E. Steinberger, and J.K. Sherman, *Conception with Human Spermatozoa Frozen by Nitrogen Vapor Technic*. Fertil Steril, 1964. **15**: p. 501-4.
55. Donnez, J., et al., *Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation*. Fertil Steril, 2013. **99**(6): p. 1503-13.
56. Gosden, R.G., et al., *Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C*. Hum Reprod, 1994. **9**(4): p. 597-603.

57. Hovatta, O., et al., *Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants*. Hum Reprod, 1996. **11**(6): p. 1268-72.
58. Keros, V., et al., *Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue*. Hum Reprod, 2009. **24**(7): p. 1670-83.
59. Ri-Cheng Chian, P.Q., *Fertility Cryopreservation*. 2010.
60. Fahy, G.M., et al., *Vitrification as an approach to cryopreservation*. Cryobiology, 1984. **21**(4): p. 407-26.
61. Isachenko, V., et al., *Cryobanking of human ovarian tissue for anti-cancer treatment: comparison of vitrification and conventional freezing*. Cryo Letters, 2009. **30**(6): p. 449-54.
62. Yavin, S. and A. Arav, *Measurement of essential physical properties of vitrification solutions*. Theriogenology, 2007. **67**(1): p. 81-9.
63. Lundheim, R., *Physiological and ecological significance of biological ice nucleators*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2002. **357**(1423): p. 937-43.
64. Kim, S.H., et al., *Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for mouse mature oocyte cryopreservation*. Yonsei Med J, 2006. **47**(3): p. 399-404.
65. Wang, X., et al., *Restoration of fertility in oophorectomized rats after tubo-ovarian transplantation*. Microsurgery, 2002. **22**(1): p. 30-3.
66. Almodin, C.G., et al., *Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy*. Fertil Steril, 2004. **81**(1): p. 160-4.
67. Oktay, K., et al., *Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue*. Fertil Steril, 1997. **67**(3): p. 481-6.
68. Akyuz, C., et al., *Malignant ovarian tumors in children: 22 years of experience at a single institution*. J Pediatr Hematol Oncol, 2000. **22**(5): p. 422-7.
69. Oktay, K., *Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(6): p. 526-34.
70. Oktay, K., et al., *Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue*. Lancet, 2004. **363**(9412): p. 837-40.
71. Donnez, J., et al., *Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue*. Lancet, 2004. **364**(9443): p. 1405-10.
72. Demeestere, I., et al., *Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report*. Hum Reprod, 2006. **21**(8): p. 2010-4.
73. Meirow, D., et al., *Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy*. N Engl J Med, 2005. **353**(3): p. 318-21.
74. Dittrich, R., et al., *Pregnancies and live births after 20 transplantations of cryopreserved ovarian tissue in a single center*. Fertil Steril, 2015. **103**(2): p. 462-8.



75. Potdar, N., T.A. Gelbaya, and L.G. Nardo, *Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis*. *Reprod Biomed Online*, 2014. **29**(2): p. 159-76.
76. Meirou, D., *Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients*. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. **169**(1-2): p. 123-31.
77. Hovatta, O., *Cryobiology of ovarian and testicular tissue*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2003. **17**(2): p. 331-42.
78. Perrotin, F., et al., [*Incidence, diagnosis and prognosis of ovarian metastasis in breast cancer*]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2001. **29**(4): p. 308-15.
79. Rodriguez-Wallberg, K.A. and K. Oktay, *Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2012. **26**(3): p. 391-405.
80. Oktem O, A.E., Balaban B, Palaoglu E, Peker K, Karakaya C, Urman B., *Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimüllerian hormone than slow-frozen ovaries*. *Fertil Steril*, 2011.
81. Kim, G.A., et al., *Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue*. *Theriogenology*, 2011. **75**(6): p. 1045-51.
82. David, A., et al., *Effect of cryopreservation and transplantation on the expression of kit ligand and anti-Müllerian hormone in human ovarian tissue*. *Hum Reprod*, 2012. **27**(4): p. 1088-95.
83. La Marca, A., et al., *Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know?* *Hum Reprod*, 2009. **24**(9): p. 2264-75.
84. Gandolfi, F., et al., *Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models*. *Fertil Steril*, 2006. **85** **Suppl 1**: p. 1150-6.
85. van Balen, F., J.E. Verdurmen, and E. Ketting, *Age, the desire to have a child and cumulative pregnancy rate*. *Hum Reprod*, 1997. **12**(3): p. 623-7.
86. Krishnamurti, L., et al., *Hematopoietic cell transplantation for hemoglobinopathies*. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2008. **38**(1): p. 6-18.
87. Flanc, R.S., et al., *Treatment for lupus nephritis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004(1): p. CD002922.
88. Larsen, E.C., et al., *Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(11): p. 5307-14.
89. Jemal, A., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival*. *Cancer*, 2004. **101**(1): p. 3-27.
90. Herraiz, S., et al., *Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices*. *Fertil Steril*, 2014. **101**(3): p. 775-84.
91. Huang, J.Y., et al., *Cryopreservation of ovarian tissue and in vitro matured oocytes in a female with mosaic Turner syndrome: Case Report*. *Hum Reprod*, 2008. **23**(2): p. 336-9.

92. Isachenko, V., et al., *Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation*. *Reproduction*, 2009. **138**(2): p. 319-27.
93. *Revised minimum standards for practices offering assisted reproductive technologies: a committee opinion*. *Fertil Steril*, 2014. **102**(3): p. 682-6.
94. Fuller, B. and S. Paynter, *Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine*. *Reprod Biomed Online*, 2004. **9**(6): p. 680-91.
95. Hovatta, O., et al., *Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(10): p. 2519-24.
96. Liu, J., et al., *Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and in vitro culture*. *Biol Reprod*, 2000. **62**(5): p. 1218-23.
97. Hovatta, O., et al., *Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture*. *Hum Reprod*, 1997. **12**(5): p. 1032-6.
98. Nawroth, F., et al., *Cryopreservation in assisted reproductive technology: new trends*. *Semin Reprod Med*, 2005. **23**(4): p. 325-35.
99. Silber, S.J., *Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation*. *Mol Hum Reprod*, 2012. **18**(2): p. 59-67.
100. Nugent, D., et al., *Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts*. *J Reprod Fertil*, 1998. **114**(2): p. 341-6.
101. Israely, T., et al., *Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI*. *Magn Reson Med*, 2004. **52**(4): p. 741-50.
102. Van Eyck, A.S., et al., *Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting*. *Fertil Steril*, 2009. **92**(1): p. 374-81.
103. Demeestere, I., et al., *Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation*. *Hum Reprod Update*, 2009. **15**(6): p. 649-65.
104. Zhou, X.H., et al., *Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification*. *Cryobiology*, 2010. **60**(2): p. 101-5.
105. Hazzard, T.M. and R.L. Stouffer, *Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development*. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000. **14**(6): p. 883-900.
106. Kaczmarek, M.M., D. Schams, and A.J. Ziecik, *Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview*. *Reprod Biol*, 2005. **5**(2): p. 111-36.
107. Ravindranath, N., et al., *Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary*. *Endocrinology*, 1992. **131**(1): p. 254-60.
108. Seli, E., et al., *Basic fibroblast growth factor: peritoneal and follicular fluid levels and its effect on early embryonic development*. *Fertil Steril*, 1998. **69**(6): p. 1145-8.
109. Imthurn, B., et al., *Gonadotrophin administration can benefit ovarian tissue grafted to the body wall: implications for human ovarian grafting*. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. **163**(1-2): p. 141-6.

110. Goto, M., et al., *PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles*. J Assist Reprod Genet, 2007. **24**(11): p. 541-6.
111. Drolle, H., et al., *Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy*. Leuk Res, 2015. **39**(7): p. 779-85.
112. Di Cristofano, A., et al., *Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/- mice*. Science, 1999. **285**(5436): p. 2122-5.
113. Saal, L.H., et al., *Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7564-9.
114. Fero, M.L., et al., *A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice*. Cell, 1996. **85**(5): p. 733-44.
115. Kiyokawa, H., et al., *Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1)*. Cell, 1996. **85**(5): p. 721-32.
116. Tong, W., et al., *The absence of p27Kip1, an inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, uncouples differentiation and growth arrest during the granulosa->luteal transition*. Cell Growth Differ, 1998. **9**(9): p. 787-94.
117. Crino, P.B., K.L. Nathanson, and E.P. Henske, *The tuberous sclerosis complex*. N Engl J Med, 2006. **355**(13): p. 1345-56.
118. Baarends, W.M., et al., *Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat*. Endocrinology, 1995. **136**(12): p. 5614-22.
119. Durlinger, A.L., J.A. Visser, and A.P. Themmen, *Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone*. Reproduction, 2002. **124**(5): p. 601-9.
120. Carlsson, I.B., et al., *Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro*. Hum Reprod, 2006. **21**(9): p. 2223-7.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Yalvaç'ta doğdu. 1998 yılında Yalova Gazi Osman Paşa İlköğretim Okulu'ndan, 2002 yılında Isparta Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2009 yılında Samsun Sahra Sıhhiye Okulu'nda askerlik görevini tamamladı. 2010 – 2012 yıllarında Antalya'da özel bir hastanede biyolog olarak çalıştı. 2012 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans programına başladı. Soner Çelik İngilizce bilmektedir.