



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DONDURULMUŞ VE ÇÖZÜLMÜŞ OVARYUM
DOKUSUNDA OTOFAJİK ÖLÜM YOLAĞINDA YER
ALAN SİNYAL PROTEİNLERİNDEN mTOR VE PmTOR
EKSPRESYONUNU İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
GÖSTERİLMESİ**

Ümray TOPRAK

**NİSAN 2019
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DONDURULMUŞ VE ÇÖZÜLMÜŞ OVARYUM DOKUSUNDA
OTOFAJİK ÖLÜM YOLAĞINDA YER ALAN SİNYAL
PROTEİNLERİNDEN mTOR VE PmTOR EKSPRESYONUNUN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK GÖSTERİLMESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Ümray TOPRAK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Denizli, 2019

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Ümray DEDE TOPRAK tarafından Prof.Dr Gülçin ABBAN METE yönetiminde hazırlanan “Dondurulmuş Ve Çözülmüş OvaryumDokusunda Otofajik Ölüm Yolağında Yer Alan Sinyal Proteinlerinden mTOR ve PmTOR Ekspresyonunun İmmunohistokimyasal Olarak Gösterilmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Pamukkale Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr.Hülya ÇETİN

Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr.Murat TOSUN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

.../.../..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA

Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı :

Ümray-TOPRAK

İmza :

ÖZET

Dondurulmuş Ve Çözölmüş Ovaryum Dokusunda Otofajik Ölüm Yolağında Yer Alan Sinyal Proteinlerinden mTOR VE PmTOR Ekspresyonunun İmmunohistokimyasal Olarak Gösterilmesi

Ümray DEDE TOPRAK

Yüksek Lisans Tezi Histoloji ve Embriyoloji AD

Tez Yöneticisi: PROF. Dr. Gülçin ABBAN METE

Nisan 2019, 44 Sayfa

Kadın hastalarda görölen erken ovaryum yetmezliğı veya kanser tedavisi gibi fizyopatolojik durumlar fertilizasyonu olumsuz etkilemektedir. Fertilitiyi korumak için oosit, embriyo ve ovaryum dokusu kriyoprezervasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Kriyoprezervasyon yöntemlerinin içinde vitrifikasyon yöntemi daha az toksik olması nedeniyle tercih edilir. Ancak bazı durumlarda en uygun yöntemler seçilmesine rağmen yine de hücre ölümü görölebilir. Otofaji, programlı hücre ölüm mekanizmalarından biridir. Otofajik aktivitenin kontrolünde belirteç olan mTOR hücrede protein sentezi ve hücre sel büyüme kontrol eden bir kinazdır. Bu proteinin baskılanması, otofajiyi aktif hale getirir. Çalışmamızda ovaryum dokusunda vitrifikasyon işlemi öncesi ve sonrasında mTOR ve aktif hali olan PmTOR ekspresyonları immunohistokimyasal yöntemle incelenmesi amaçlandı.

Bu çalışmada 12 haftalık Wistar Albino cinsi sıçanlardan alınan ovaryumlar kontrol (n=6) ve vitrifikasyon (n=6) olmak üzere iki grup oluşturuldu. Kontrol grup için alınan ovaryumlar formalin içinde 48 saat tespit edildi. Vitrifikasyon grubu için alınan ovaryumlar, içinde vitrifikasyon solüsyonu bulunan kriyoviallere konularak -120 C° de sıvı azot tankı içinde donduruldu. Bir hafta sonra dokular çözdüröldü. Her iki grup rutin parafin takibine alındı. Her bir dokudan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen&Eozin boyama ve immünohistokimya işlemi uygulandı. Histolojik boyama yapılan doku örneklerinden tüm foliköller ışık mikroskopunda incelenerek sayımları yapıldı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Folikül sayıları kontrol grubu ve vitrifikasyon grubunda istatistiksel olarak farklı değildi. Ovaryum dokusunda gelişimin her aşamasındaki foliköller izlenmekteydi. mTOR ekspresyonu her iki gruptaki bütün foliköllerin granülosa hücrelerinde ve oositlerinde kuvvetli pozitif. PmTOR ekspresyonu ise kontrol grubundaki oositler ve granülosa hücrelerinde pozitif ekspresyon gösterirken vitrifikasyon işleminin uygulandığı gruptaki oositlerde ve granülosa hücrelerindeki negatif ekspresyon olmuştü.

Sonuç olarak bulgularımıza göre vitrifikasyon işleminin ovaryum dokusunda otofajiyi indüklemediğini saptadık. Literatürde oosit kalitesiyle ilişkilendirilen PmTOR aktivitesinin vitrifiye edilen ovaryum dokularında olmaması vitrifikasyon yönteminin oosit kalitesini bozduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ovaryum, Vitrifikasyon, Otofaji, mTOR, PmTOR

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2017SABE007).

ABSTRACT

Immunostochemical Demonstration Of Protein Mtor And P Mtor Expression InAutophagic Death Pathway In Frozen And Thawed Ovarian Tissue

DEDE TOPRAK, Ümray

M.Sc.Thesis in Histology and Embryology AD

Supervisor: PROF. Dr. Gülçin ABBAN METE

April 2019, 43 Pages

Physiopathological conditions such as early ovarian failure and cancer treatment negativ affect fertilization in female patient. Cryopreservation method was used oocytes, embryos and ovarian tissues to protect fertility. The vitrification method is minimizing toxic due to vitrification is preferred method in cryopreservation methods. However, in some cases, although the most appropriate methods are selected, cell death can be seen. Autophagy is one of the mechanisms of programmed cell death. Mtor is a protein kinase that controls protein synthesis and cellular growth in the cells. Suppression of this protein activates autophagy. The aim of this study was to investigate the mTOR and active form PmTOR expressions before and after vitrification of the ovary tissue by immunohistochemical method

Two groups were formed: control (n= 6) and vitrification (n= 6) of Ovaries from 12-week-old rats in this study. Control group fixed for 48 hours in buffered formalin. Vitrification group were placed in cryovials with vitrification solution and frozen in liquid nitrogen tank at -120 C°. One week later the tissues were thawed. Both groups performed routine paraffin tracking. 5µm sections were taken with microtome from each sample. Immunohistochemistry examination for mTOR and PmTOR expression and Hematoksilen&Eozin staining were performed. All foliküllicles in histologically stained tissues were counted and examined by light microscope. Data were evaluated by using statistical methods.

Foliküllicle numbers were not statistically different in the control and vitrification groups. foliküllicles showing different developmental stages in ovarian tissue. Mtor ekspression were strongly positive in granulosa cells and oocytes in all foliküllicles in two groups. Although PmTOR has positive expression in oocytes and granulosa cells in control group, it is negative in oocytes and granulosa cells in the vitrification group.

In concluding, based on our findings, we found that vitrification methods did not induce autophagy in ovarian tissue. The PmTOR activity associated with oocyte quality in the literature. However, the absence of PmTOR activity in frozen over tissues suggested that vitrification deteriorates the quality of oocyte.

Key Words: Ovary, Vitrification, autophagy, mTOR, PmTOR

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2017SBE007

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yanımda olan, manevi yönden desteğini hissettiren; tezimin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında, tez çalışması için ortamın sağlanmasında ve tezin her aşamasında özverilerini, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında deneylerin yapılmasında laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalı hocalarına, tez çalışmam sırasında tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan, deneylerin yürütülmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen Doktor öğretim üyesi: Nazlı ÇİL'e ve deney aşamasında her türlü imkanı sağlayan Veteriner Hekim Barbaros ŞAHİN'e Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalında çalışan ve emeği gecen herkese ve beni bugünlere getiren, her koşulda destek olan eşim, çocuklarım ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç.....	3
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	4
2.1. Kadın Genital Sistem.....	4
2.1.1. Ovaryum embriyonik gelişimi ve histolojisi.....	5
2.1.2. Ovulasyon	8
2.2. Kriyoprezervasyon.....	8
2.2.1. Tanımı ve tarihçesi	8
2.2.2. Memeli hücrelerinde kriyoprezervasyon.....	9
2.2.3. Vitrifikasyon	10
2.2.3.1. Vitrifikasyonda solüsyon seçimi.....	12
2.3. Hücre homeostazisinin sağlanması ve Otofaji	13
2.3.1. Otofaji.....	13
2.3.2. Otofajik Hücre Ölümünün Düzenleyici Mekanizmaları.....	14
2.3.2.1. MTOR ve PmTOR'un otofajideki düzenleyici rolü	15
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	17
3.1. Deney Gruplarının oluşturulması	17
3.2. Vitrifikasyon Protokolü	17
3.3. Uygulanan Teknikler	19
3.3.1. Doku takip Yöntemi	19
3.3.2. Hematoksilen&Eozin Boyama Protokolü:.....	20
3.3.3. İmmunohistokimyasal boyama protokolü	21
3.4. Folikül Sayımı Yöntemi.....	23
3.5. İstatistiksel Analizler	23
4. BULGULAR	24
4.1. Histolojik Bulgular	24

4.1.1. Folikül sayımı	24
4.1.2.Hematoksilen&Eosin boyama	26
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	27
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ	37
7. KAYNAKLAR	38
8. ÖZGEÇMİŞ	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: Kadın genital sistem anatomik görünümü (Netter, 1989)	4
Şekil:2 (A): primordial germ hücrelerinin göçüşü (kırmızı) (Wear vd 2016). (B): primordial germ hücrelerinin son bağırsak ve dorsal mezenter boyunca genital kabartıya doğru göçü (Sadler 2010).....	6
Şekil 3: Ovaryum, ovum ve foliküllerin histolojik görünümü (Netter , 1989)	7
Şekil 4: Otofaji mekanizmasında yer alan aktivatörler ve inhibitörlerin gösterilmesi (https://www.invivogen.com/autophagy-inducers)	15
Şekil 5: A: Sıçanlarda ovaryum dokusunun gösterilmesi. B,D: Kriyovial içinde ovaryum dokusu. C: Deney aşamasında kullanılan sıvı azot tankı	18
Şekil 6: İstatiksel verilerin grafikleri. A; Primordial folikül, B; Primer folikül, C; Gelişen folikül, D; sekonder folikül, E; Tersiyer folikül, F; Korpus luteum, G; Atretik folikül	25
Şekil 7: Kontrol grubu ovaryum dokusunda oositlerin çeşitli aşamalarındaki foliküller izlenmekte. P; Primer folikül, PR; Primordial folikül, SF; Sekonder folikül, GF; Gelişen folikül, TF; Tersiyer folikül. Hematoksilen&Eozin Boyama. Bar=500µm	26
Şekil 8: Vitrifikasyon işlemi uygulanmış ve çözünmüş ovaryum dokusu. P; Primer folikül, PR; Primordial folikül TF; Tersiyer folikül, SF; Sekonder Folikül, KL; Korpus Luteum. Hematoksilen-Eozin, Bar=500µm.....	26
Şekil 9: Vitrifikasyon işlemi uygulanmış ve çözünmüş ovaryum dokusu. P; Primer folikül, PR; Primordial folikül, DF; Dejenere folikül, Ok; Oosit sitoplazmasındaki boşluk. Hematoksilen-Eozin. Bar=50µm	27

Şekil 10: Kontrol grubu ovaryum dokusunda mTOR ekspresyonu. P; Primer folikül. Pr; Primordial folikül, S; Sekonder Folikül. CL; Corpus Luteum. Artı; Oositlerdeki kuvvetli ekspresyon. İmmunoperoksidaz-hematoksilen. Bar=50µm, 28

Şekil 11: Vitrifikasyon işlemi uygulanmış ve çözünmüş ovaryum dokusunda mTOR ekspresyonu. P; Primer folikül, CL; Korpus Luteum, Yıldız; oositlerdeki kuvvetli ekspresyon. İmmunoperoksidaz-hematoksilen. Bar=500,200, 50µm 29

Şekil 12: Kontrol grubu ovaryum dokusunda PmTOR (PSer2481mTOR) ekspresyonu. P; Primer folikül, Pr; Primordial folikül, S; Sekonder Folikül. Yıldız; Oositlerdeki kuvvetli ekspresyon. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar: 50µm..... 29

Şekil 13: Vitrifikasyon işlemi uygulanmış ve çözülmüş ovaryum dokusunda PmTOR (PSer2481mTOR) ekspresyonu. P; primer folikül, S; Sekonder folikül. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µm, 100µm..... 29

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1: Kontrol ve Vitrifikasyon grupları arasındaki folikül sayılarının istatistiksel sonuçları. Mean±SD.....	25
Tablo 2: Kontrol grubu ve vitrifikasyon işlemi uygulanmış ovaryum dokusunda mTOR ekspresyonu ve yerleşimi.....	27
Tablo 3: Kontrol grubu ve vitrifikasyon işlemi uygulanmış ovaryum dokusunda PmTOR ekspresyonu ve yerleşimi.....	28

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKT.....	Protein kinase B
ATG.....	Autophagy-related genes
CF.....	Corpus luteum
CVT.....	cytosol to vacuole targeting pathway
DAB.....	3,3'-diaminobenzidine
DF.....	Dejenere folikül
DMSO.....	Dimetil sulfoksit
EG.....	Etil Glikol
FBS.....	Fetal bovine serume
HCl:.....	Hidroklorik asit
KPA.....	Kriyoprotektif Ajan
M.....	Molar
Mtor.....	Mamalian target of rapamycin
Mtorc1.....	Mammalian target of rapamycin complex 1
Mtorc2.....	Mammalian target of rapamycin complex 2
P.....	Primer folikül
PAS.....	Periyodik asit schiff
PBS.....	Phosphate buffered saline
PGH.....	Primordial germ hücreleri
PMtor.....	Phosphorylated- serine 2448
PI3F.....	Sınıf III phosphoinositol 3 fosfat
PI3K.....	Sınıf I fosfotidilinositol 3-kinaz
PTEN.....	Phosphatase and tensin homolog
Pr.....	Primordial folikül
ROS.....	Reaktif oksijen türleri
S.....	Sekonder folikül
T.....	Tersiyer folikül

IVM.....In vitro maturasyon

Vid.....Vacuolar improt and degradation pathway

1. GİRİŞ

Canlıların yaşam döngüsünde doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölüm temel unsurlardır. Yaşamın sürdürülmesi için hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge olması gerekmektedir. Dejeneratif hastalıklar, kanser ve otoimmün hastalıklar fazla hücre çoğalması ya da normalden fazla hücre ölümü olduğunda, yani bu denge kaybolduğunda ortaya çıkar.

İnsan ovaryumu, doğumda, yüz binlerce olgunlaşmamış primordial folikül içerirken, 50 yıl içerisinde oositler dereceli olarak azalır ve sonunda tükenerek menopoz oluşur. Ovaryum operasyonları veya kanser tedavileri gibi durumlarda oosit azalması erken ortaya çıkabilmekte ve hayatın geri kalan dönemlerinde çok önemli fonksiyonların kaybına yol açmaktadır. Erken infertiliteyi önlemek için olgun oositlerin dondurularak saklanması, genç yumurta hücrelerinin vücut dışında olgunlaştırılması gibi yöntemler üzerine önemli çalışmalar bulunmakta ancak olgun bir oosit oldukça kompleks bir yapıya sahip olduğu için dondurma çözme işlemleri sırasında zarara uğradığından çok başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Bundan dolayı özellikle pre-pubertal kızlarda immatur oositlerin korunabilmesi açısından ve son yıllarda daha çok kanser hastalarında fertilitenin korunmasına yönelik ovaryum dokusu dondurulması araştırmaları hız kazanmıştır. Şimdiye kadar dondurulmuş ovaryum dokusunun transplantasyonu sonucu yaklaşık 60 bebek dünyaya gelmiştir (Donnez ve Dolmans 2015). Bu sonuçlar bu yöntemin klinik açıdan oldukça kullanışlı olduğunu ve özellikle genç hastalarda fertilitenin korunmasında önemli bir yöntem olduğunun göstergesidir. Dondurulmuş ovaryum dokusu transplante edildiğinde hormon işlevlerinin ve fertilitenin yerine geldiği gösterilmiştir (Mol ve Zoll 2015). Doku korunumu için hücrelerde fiziksel ve mekanik hasara neden olduğu bilinen buz kristali oluşumunu önlediğinden dolayı over dokularının infertilite tedavileri için dondurularak korunmasına yönelik optimal vitrifikasyon protokolleri kullanılmaktadır (Suzuki vd 2015). Ancak vitrifikasyon ve diğer dondurma protokolleri sırasında ovaryum folikül hücrelerinde ölümler olmakta bu da folikül

sayısında azalmaya neden olmaktadır. Bu hücre ölümlerin apoptotik yolla olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Tsai vd 2014, Jee vd 2010). Dondurma işlemi sırasında oluşan folikül kaybının mekanizması tam olarak belli değildir. Pek çok çalışmada bu kayıpların başlıca nedeninin apoptozis olduğu bildirilmiştir (Hemadi 2009, Abdi 2014). Foliküllerin apoptozis yoluyla kaybını önlemek için antiapoptotik ajanlar dondurma işleminde kullanılmaya başlamıştır. Ancak bu ajanların kullanıldığı çalışmalarda dondurma sonrası ovaryum dokusunda apoptozis azalmasına hatta izlenmemesine karşın folikül kayıpların halen devam ettiği belirlenmiştir (Jee vd 2010, Tsai vd 2014). Bu sonuçlar apoptosisten farklı bir ölüm yolağında otofajinin de folikül kaybına neden olabileceğini düşündürmektedir. Otofaji lizozomları kullanan Tip 2 programlı ölüm sürecidir. Otofaji ile ölüm başlatıldığında endoplazmik retikulum ve Golgi gibi organellere ait endomembranlar izolasyon membranını oluşturur. Bu membranlar cep gibi kendi içlerine doğru kıvrılıp genişleyerek otofagozomları (autophagosomes) oluştururlar. Otofagozomlar lizozom membranları ile kaynaşarak otofajik vakuollerini oluşturur (Levine 2005, Merhpour 2010). Otofajik vakuollerin oluşumundan sonra degradasyon işlemi gerçekleşir. Bu süreç sırasında organeller fagolisozomların içerisinde erir (Merhpour 2010, Shintoni 2004). Otofajik mekanizma yaklaşık 30 proteini kodlayan ATG genleri (Autophagy-related genes) tarafından kontrol edilir (Shintoni 2004, Melendez 2009). Tor protein kompleksi otofajide önemli rol oynamaktadır. Tor, hücrede protein sentezi ve hücresel büyümeyi kontrol eden bir kinazdır. Bu proteinin baskılanması, hem mayalarda hem de memelilerde otofajiyi aktif hale getirir (Papinski 2014). Aminoasit ve/veya büyüme faktörü yokluğunda Atg13 defosforile olarak Atg1 adlı serin treonin kinaza bağlanarak Atg1 kinazının aktivasyonuna ve direkt olarak otofajinin uyarılmasına neden olacaktır (Papinski vd 2014). Besin yeterli ise mTOR, Atg 13'ü fosforile ederek otofajiyi baskılayacaktır. Tor yolağında yer alan proteinlerden ribozomal S6 proteinin hedefi olan S6K proteinin fosforilasyonu ise otofajinin baskılanmasının bir işaretidir (Scott 2004). Önceki çalışmalarda oosit ölümüyle oluşan primordial folikül kayıplarında ve granuloza ölümüyle oluşan primordial, primer, sekonder ve tersiyer folikül kayıplarında otofajinin yer aldığı gösterilmiştir (Komoda 2000, Yang 2013). Fetal oositlerde hem apoptotik hemde otofajik proteinlerin varlığı gösterilmiştir (Klinger 2015). Bundan başka germline hücre ölümlerinde otofajinin ve apoptozisin de etkili olabileceği bildirilmiştir (Peterson 2015). Bazı çalışmalarda otofajinin folikül rezervinde, önemli olan primordial havuz oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir.

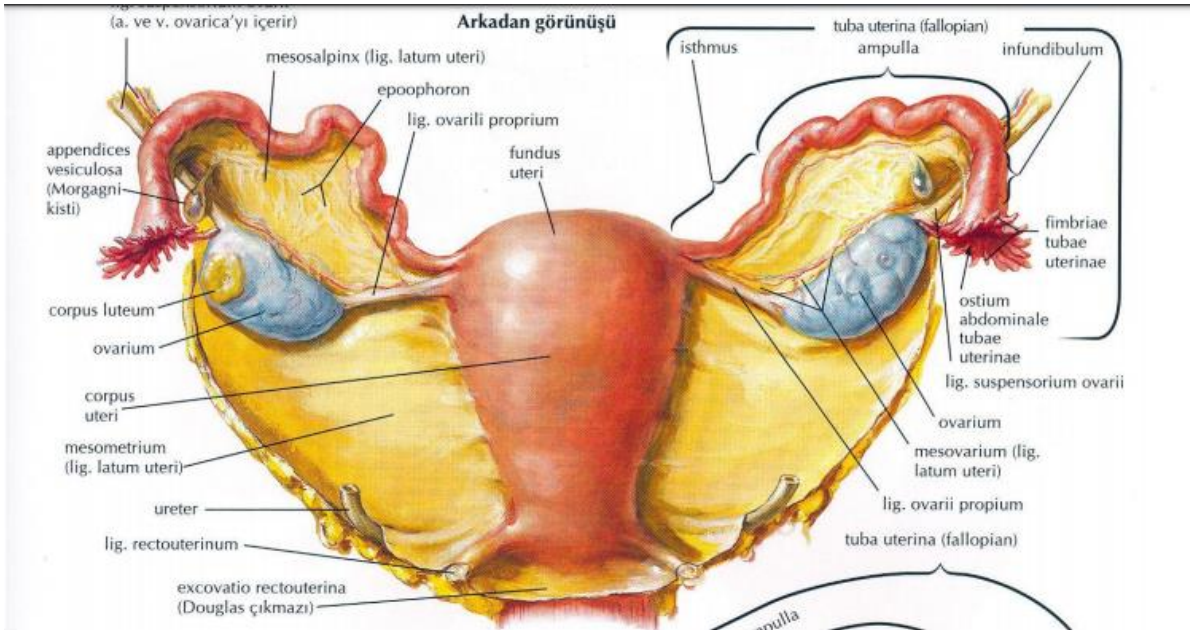
1.1. Amaç

Dondurulmuş ovaryum dokusunda ovaryan folikül kaybının mekanizması tam olarak açık değildir. Ovaryum dokusunun dondurma işleminde folikül kayıpların irdelenmesi, foliküllerin korunmasında ve işlevini devam ettirmesinde yeni yöntemlerin gelişmesine olanak sağlayacaktır. Bu da kanser hastalarında, preovaryan yetmezlik tanısı almış hastalarda fertilitiyi anlamlı olarak arttıracaktır. Biz çalışmada vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş ovaryum dokusunda apoptozisten farklı tip 2 hücre ölüm yolağı olan otofajik yolağı araştıracağız. mTOR, hücre içi sinyal kaskatlarında merkezi bir noktaya yerleşmiş olan hücre içi bir serin/treonin protein kinazdır. Hücre metabolizması ve büyümesinde önemli bir role sahiptir. Granüloza hücrelerinde bol bulunan mTOR ve onun aktif hali PmTOR (phospho-serine 2448) baskılandığında aktivitesi azalmasıyla pleiotropic etkiye neden olur ve sonucunda da hücre boyutunda azalma ile birlikte otofaji başlamış olur. Fare ovaryumu üzerinde yapılan çalışmada nükleusa kıyasla sitoplazmada mTOR ekspresyonunun daha yoğun olduğu bulunmuş, primer granüloza hücre kültürlerinde mTOR inhibisyonunun hücre ölümü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yaba 2008). Çalışmamızda vitrifikasyon işlemi uygulanmış ve çözülmüş ovaryum dokusunda otofajik ölüm yolağında yer alan sinyal proteinlerinden mTOR ve PmTOR ekspresyonunu immunohistokimyasal olarak araştırılacaktır. Elde edilen sonuçlar vitrifikasyon yöntemindeki folikül kaybının en aza indirilmesinde önemli olacaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kadın Genital Sistem

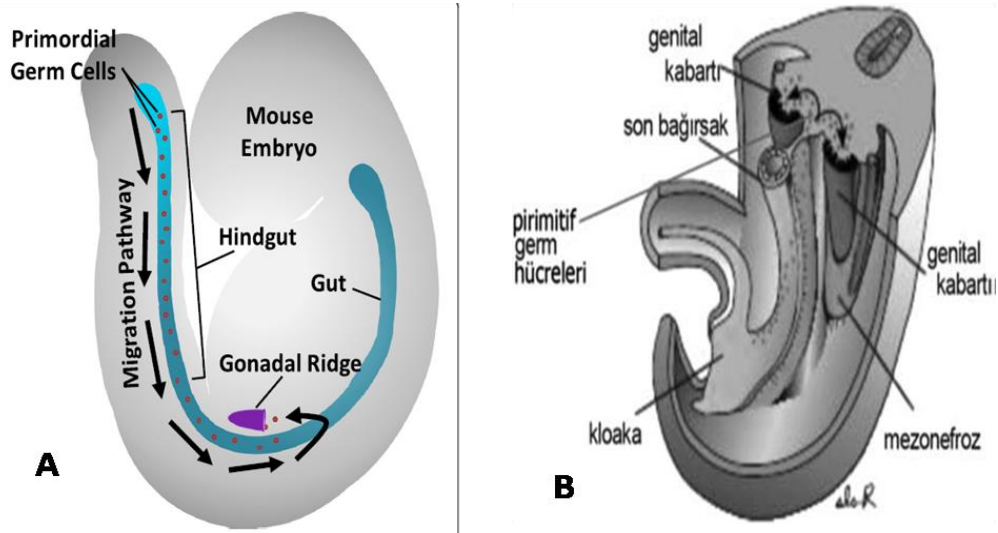
Kadın üreme sistemi ovaryumları, genital kanalları (tuba uterina, uterus, vajina) ve dış genital yapıları kapsar. Hormonlar ve sinirler tarafından kontrol edilen bu sistemin temel fonksiyonu oogenez (ovaryumlarda yumurta oluşması) ile oosit (yumurta) üretimi ve fertilizasyon (döllenme) sonucu implantasyon (yerleşme) ile doğuma kadar destek sağlamaktır (Junqueira vd 1998). Ovaryumlar bir çift badem şeklinde pembemsi renkte 1 cm kalınlığında 1,5 cm eninde ve 3 cm boyundadır. Peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin posterior yüzeyine bağlıdır (Şekil 1). Gametlerin ve steroid hormonların üretiminden ovaryumlar sorumludur. Ovaryumlar tarafından steroidlerin iki ana grubu olan progesteronlar ve östrojenler salgılanmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).



Şekil 1: Kadın genital sistem anatomik görünümü (Netter, 1989)

2.1.1. Ovaryum embriyonik gelişimi ve histolojisi

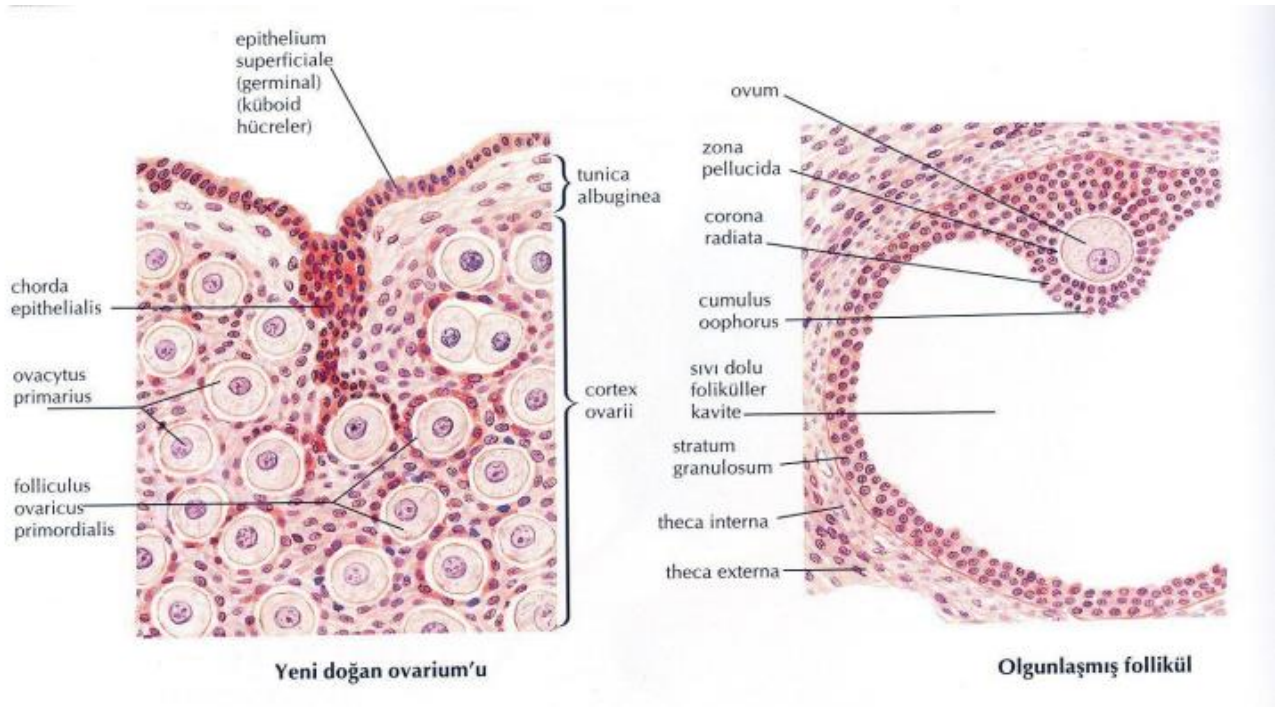
Kadın ve erkekte başarılı ve sağlıklı fertilizasyon için üreme organlarının gelişimi belli başlı faktörlere bağlıdır. Dişilerde üreme organları gelişirken çeşitli sayıda hücreler oluşur. Bunlar üreme için gerekli yapı ve fonksiyonları oluşturur. Memelilerde over gelişimi iki aşamada tamamlanır. İlk aşamada overler gelişir ve primordial folikül havuzu oluşur. İkinci aşamada foliküllerin olgunlaşması ve puberte döneminde fertilize olmaya hazır oositlerin salınmasıdır. Ovarian gelişimin ilk aşaması embriyonik gelişim sırasında başlar. Farelerde over gelişimi embriyonik gelişimin 5. gününde başlayıp iki günlük olduğunda tamamlanır (Wear vd 2016). Embriyonun cinsiyeti genetik olarak fertilizasyon aşamasında belirlenir. İnsan embriyosunda ürogenital sistemin gelişmesinde ara mezodermden primitif gonadların oluşumu ilk basamaktır. Notokordun her iki yanında simetrik olarak izlenen gonadlar paraksiyal mezoderm ile lateral mezoderm arasındaki ara mezodermden gelişir. İnsan embriyosunda primitif gonadlar fertilizasyonun 32. gününde gelişmeye başlar. Gonadların oluşum sürecinde birçok transkripsiyon faktörleri ve genler rol almaktadır. Primordial germ hücreleri (PGH) pluripotent epiblast hücrelerinden köken alır ve bu hücreleri oluşturacak öncü hücrelerin posterior primitif çizgiye doğru göçü iki hafta süre (Akıncı vd 2015). Memelilerde embriyonik gelişimin birinci ayında, PGH primitif yarık içerisinden geçerek vitellus kesesine sonrasında ise gonadlara (üreme bezi) göç eder. Bu hücreler gonadlarda bölünerek oogoniumlara (olgunlaşmamış diş üreme hücresi) dönüşür (Şekil 2). Embriyonik yaşamın ikinci ayında 600000, beşinci ayı dolaylarında ise 700000 üzerinde oogonium vardır. Embriyonun üçüncü ayında oogoniumlar birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girer. Bölünme mayozun diploten evresinde durur. Mayoza giren oogonia artık oosit olarak isimlendirilir. Primer oosit adı verilen bu hücreler foliküler hücreler olarak adlandırılan yassı hücrelerle çevrilidir. En erken primordial folikül 15. haftada, ilk graf folikülü 23. haftada izlenir (Pyrase vd 1971, Akıncı vd 2015,). Gebeliğin yedinci ayında, oogoniumların çoğu primer oositlere dönüşmüş olur. Ancak, primer oositlerin çoğu, atreziye (folikül gelişmesinin gerileyip kaybolması) uğrar. Atrezi üreme çağı boyunca sürdüğünden dolayı puberta (ergenlik) evresinde overlerde yaklaşık 300000 oosit 40-45 yaşlarında yaklaşık 8000 oosit kalır. Her menstrual siklusta (ortalama süre 28 gün) genellikle tuba uterinaya tek bir oosit serbest bırakıldığından ve kadının doğurganlık çağı boyunca, yaklaşık 400 kadar oosit salınır. Diğer oositlerin tümü atreziye uğrar.



Şekil: 2 (A): primordial germ hücrelerinin göçü (kırmızı) (Wear vd 2016). **(B):** primordial germ hücrelerinin son bağırsak ve dorsal mezenter boyunca genital kabartıya doğru göçü (Sadler 2010).

Oosit iri bir nükleolus ve geniş veziküller bir nükleusa sahip bir hücredir. Opak ve granüler bir sitoplazmaya sahiptir. Gri bir golgi kompleksi, annulata lamella ile çok sayıda mitokondri ve küçük veziküllere sahiptir. Oositi çevreleyen foliküler hücrelerin tek tabakası, bazal bir lamina ile ovarial stromadan ayrılır (Junqueira vd 1998). Folikül gelişimi pubertadan sonra meydana gelir ve ovumun (yumurta hücresi) gelişmesi, farklılaşması ve stromal hücrelerin bağ doku ile sarılmasını kapsar. İlk olarak hacim artışı meydana gelen immatur oositin etrafında glikoprotein içeren *zona pellusida* belirir. Canlı iken homojen görünürken periyodik asit schiff (PAS) boyası ile parlak boyanır. Yassı foliküler hücreler önce kübik sonra prizmatik şekle dönüşür. Granüloza hücrelerinin meydana getirdiği *stratum granulosum* ve ovumun çevresinde bu hücreler çok katlı bir tabaka oluşturmak üzere aktif olarak bölünürler. Böylece tek tabakalı primordial folikül çok tabakalı *primer foliküle* dönüşür. Primer folikülün hacmi arttıkça komşu stroma hücreleri bir kapsüle organize olur. Bu dönemde *teka hücreleri* ortaya çıkar (Junqueira vd 1998). Teka hücreleri testiküler leyding hücrelerinin eş değeri olarak görülür ve granüloza hücrelerinin kontrolü altında over stromasındaki fibroblast benzeri öncü hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir (Orisaka vd 2005, Akıncı vd 2015). Teka hücreleri bir bazal lamina ile granüloza tabakasından ayrılır. İçteki vasküler tabakaya *teka interna*, dıştaki fibröz tabakaya *teka eksterna* adı verilen 2 tabakaya farklılaşır. Teka interna salgı yapan geniş stromal hücreler içerir. Ayrıca çok sayıda kapiller içerirler. Periferde ovarial stroma ile birleşen teka eksterna ise sıkıca paketlenmiş kollajen fibrillerden ve içi hücrelerden oluşur. Foliküler hücrelerin gelişimi oositin her tarafında aynı hız ve boyutta olmaz.

Stratum granulosum 8-12 tabakalı olduğu zaman foliküler kitleden meydana gelen sıvı ile düzensiz küçük boşluklar doldurulur. Foliküler tabakanın iç tarafındaki bu boşluğa *antrum boşluğu* denir. Folikül ise *antral folikül* ya da *sekonder folikül* olarak tanımlanır. Sekonder (ikincil) foliküldeki antrum boşluğu hiyaluronik asitten zengin viskos bir folikül sıvısı içerir. Granüloza hücresi ile çevrelenmiş olan oosit, antral kavitenin bir kenarında ovulasyona hazır olacak şekilde durur. Bu eksentrik tümsek *kumulus ooforus* olarak tanımlanır. Kumulus ooforusun granüloza hücreleri oosit ile ilişkilidir ve ışınal şekilde sıralanarak *korona radiatayı* oluşturur ve oosit zona pellusida ile birlikte ayrılır. Korona radiata hücreleri oositin hücre membranı ile temas halindedir ve zona pellusida boyunca uzanır. Ayrıca oositin mikrovillusları da zona pellusida içine doğru uzanır. Granüloza hücrelerinin oluşturduğu epitelyum hücreleri antrum boşluğunun çevresinde düzensiz tabakalar halinde bulunur. Bir folikül 10-14 gün içinde olgunlaşır. 18-20 mm çapa sahip olan olgun folikül kortekse yerleşmiştir ve medullada bir çentik oluşturur. Bu ovaryumun yüzeyindeki şişlik *stigma* adını alır. Tunika albuginea ve teka hücre tabakaları incelmıştır. Folikül sıvısı ile genişlemiş antrum stratum granulosuma bağlıdır. Oosit kalın bir zona pellusida ve göze çarpan bir korona radiata ile sarılmıştır (Şekil 3). Folikül maturasyonu (olgunlaşma) sağlandığı zaman düzensiz küçük boşluklar folikül sıvısı ile dolar. Böylece stratum granulosum ile oosit arasındaki bağlantı zayıflar (Junqueira vd 1998).



Şekil 3: Ovaryum, ovum ve foliküllerin histolojik görünümü (Netter 1989)

2.1.2. Ovulasyon

İmmatur (olgunlaşmamış) olan sekonder oosit olgunlaşırken bir seri nukleer değişiklikler de geçirir. Diploid(2n) sayıda kromozom içeren oogonia ya da primitif ovum mitotik bölünmeler geçirerek fetal ovaryumda primer oositleri oluşturur. Foliküler gelişim sırasında primer oositler büyür ve sonra 2 maturasyon bölünmesi geçirerek matür hale gelir. Kromozomlar haploid (n) sayıya iner. ilk olgunlaşma bölünmesi ovulasyondan hemen önce ve matür folikülün içinde meydana gelir. Kardeş hücreler arasında kromozomlar eşit olarak paylaşılır. Fakat sitoplazma bölünmesinde eşit bir paylaşım olmaz. Kardeş hücrelerden birisi sekonder oosit olarak isimlendirilir ve ana hücrenin sitoplazmasının tamamını alır. Diğer hücre ise birinci polar cisimdir ve sonra dejenere (bozulma) olur. Her iki hücre de 23 kromozoma sahiptir. Bu sırada ovulasyon (yumurtlama) meydana gelir ve sekonder oosit folikülden serbestleşir. Bu süreçte sekonder oositin nukleusu sekonder maturatik bölünmeye başlar. Bölünme metafazda durur ve fertilizasyona (döllenme) kadar bu durumda kalır. Sperm (erkek üreme hücresi) başının oosite penetre olması ile bu 2. mayoz bölünme stimüle (uyarılma) olur ve tekrar eşit olmayan sitoplazmik bir bölünme meydana gelir. Büyük sitoplazmaya sahip olan hücre matür oositir. Diğer hücre ise 2. polar cisimdir. Böylece bir primer oositin yalnızca bir kardeş hücresi fonksiyonel hale gelir. Diğer dejenere olur (Kalaycı 1986). Maturasyonu tamamlanan folikülde sıvı sekresyonu artar, preovulatuvar şişme oluşur. İnce bir korteks ile kaplanmış olan folikül stığmadan rüptür (yırılma) olur ve foliküler sıvı periton (karın zarı) boşluğuna sızar. Korona radiata ve zona pellusida ile çevrili oosit kumuloslara doğru yırtılarak uzaklaşır ve sıvı içerisinde dağılarak ovulasyon gerçekleşir. Serbest hale gelen oosit genellikle fallop tüplerinin infundibulumuna doğru gider ve fertilizasyon kapasitesi 24 saat sürer.

2.2. Kriyoprezervasyon

2.2.1. Tanımı ve tarihçesi

Kriyobioloji yaşayan organizmaların düşük sıcaklıklarda özelliklerinin incelenmesidir. Kriyobiolojinin tarihçesi 1600'lü yılların sonlarına kadar uzanır. İnsanlar uzun yıllar düşük sıcaklıkların hücre ve dokulara zararlı etkilerinin olduğuna inanmışlardır ancak soğuk hakkında hipotez kuran ve soğüğün öldürücü etkisinin olmadığını bulan ilk kişi Henry Power'dır. Bir kavanoz içindeki tuzlu suda yılan balığını dondurmuş çözme sonrası, dondurmadan önceki kadar aktif olduğunu görmüştür. Robert Boyle 1683 yılında yazdığı "New Experiments and Observations Touching Coll" adında bir monografide yaşayan hayvanlarda soğüğün etkilerini tanımlamıştır (Luster 2004). Lazzaro Spallanzani Kriyobiolojideki diğer öncü isimlerdendir. 1700'lü yılların sonlarında birçok türün dokusunda geniş çalışmalar yapmış, onların düşük sıcaklıklarda reaksiyonlarını incelemiştir.

Polge ve ark (1949) Cambridge Üniversitesi'nde tesadüfen gliserolün koruyucu etkisini keşfetmişler ve horoz ve kedi spermatozoasını başarılı bir şekilde dondurmışlardır. Donma hasarlarına karşı hücreleri korumak için gliserolün keşfi, kriyobioloji biliminin gelişiminde öncülük etmiştir (Luster 2004). Daha sonra kriyoprezervasyon alanındaki gelişmeler aşağıdaki gibi özetlenebilir.

- 1970 yılında propanediol, EG (Etil glikol), DMSO (Dimetil sulfoksit) keşfi.
- 1972 programlanabilen dondurucuların kullanıldığı yavaş dondurma tekniğinin geliştirilmesi .
- 1984 dondurulmuş-çözülmüş insan embriyosundan elde edilen ilk canlı doğum.
- 1986 dondurulmuş-çözülmüş insan oositinden elde edilen ilk canlı doğum.

Kriyobiolojide laboratuvar başarısı; kullanılan indüksiyon ajanlarına, mikromanipulasyon tekniğine, kültür mediumun içeriğine, ortamına ve pH'ına bağlıdır. Kriyoprezervasyon başarısı ise gamet, zigot ve embriyo kalitesine, kullanılan malzeme ve yöntem kadar yöntemi uygulayan kişinin tekniğine ve becerisine de bağlıdır (Durmaz 2013).

2.2.2. Memeli hücrelerinde kriyoprezervasyon.

Bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları ilk sperm hücresini dondurma ile başlamıştır. Daha sonra kriyobioloji hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bilim dalı olarak önem kazanmıştır. Soğuk şokuna maruz bırakılarak membransel ve ozmotik değişikliklere uğrayan hücrelerin çözülme sonucunda yaşamı ve fonksiyonel özellikleri olumsuz etkilenmektedir.

Özellikle gamet ve embriyoların soğuk şoku ve ozmotik hasara karşı ortamlarına KPA (kriyoprezervatif ajan) eklenmesi, çözme sonrası canlılığı ve fertilitiyi optimize etmektedir. KPA'ların ortama hangi oranda katılacağına saptanmasında son zamanlarda geliştirilmiş bazı membransel parametreler kullanılır. Bu parametreler, ozmotik inaktif hacim, hidrolitik iletkenlik, eriyik permeabilitesinin (geçirgenliğin) aktivasyon enerjisi ve hücre yüzey/hacim oranıdır. Hücreler, hacimlerine, soğutulma hassasiyetlerine, su içeriklerine ve hücre membranının (zarının) sıvı permeabilite katsayısına göre spesifik soğutulma oranlarına sahiptir. Donma sırasında gametin su alışverişinin belirlenmesi, hücrenin donmaya ve KPA'lara karşı ozmotik tepkisinin belirlenmesi, öldürücü etkili intrasellüler (hücre içi) donma insidansının azaltılması ve KPA'ların optimum ilave oranlarının saptanması bu membran parametrelerinin belirlenmesine bağlıdır (Mazur 1990). Hücre sıcaklığının 37 °C'den 7 °C' ye kadar düşmesi bazı değişiklikler meydana getirmektedir. Enzim reaksiyonlarında azalış meydana gelir. Hücrelerin dondurulmasında suyun biyolojik yapısının değişimi ile yani suyun biyolojik olarak kristalleşmesi meydana gelir. Hücrelerin dondurulma işlemi sırasında, ekstrasellüler solüsyonda -5°C ile -100°C arasında buz kristalleri şekillenir. Ancak intrasellüler ortam, hücre membranının etkisiyle henüz donmamıştır. Meydana gelen farklı yapı nedeniyle bir kısım sıvının hücre dışına çıkışı ile hücre içinde bulunan bir kısım erimiş maddelerin yoğunluğunda yükselme meydana gelir ve hücre içerisinde de kristaller oluşur (Delilbaşı 2008).

İnfertilite sorunu yaşayan bayanlarda oosit, embryo ve ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonu işlemi uygulanmaktadır. Ancak bazı durumlarda embriyo ya da oosit dondurulması yapılamamaktadır. Oosit toplamadan önce sitimülasyon tedavisi yapılması, tedaviye erken başlanması gerektiği durumlarda zaman kaybına neden olmaktadır. Bekar ve prepupertal dönemdeki bayanlar için oosit toplama işi uygun değildir. Ovaryum kriyoprezervasyonu doğurganlığı korumada en başta gelen yöntemlerden biridir. Ovaryum dokusu dondurulması ile ilgili yeterli veri bulunmadığından kemoterapi almış hastalar veya diğer hastalara çok önerilmemekle beraber canlı doğum bildirilmiştir. Ovaryum dokusu yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurulabilir (Erdemli 2010).

2.2.3. Vitrifikasyon

İnsan gamet ve embriyoları in vivo (canlı ortam) ortamda canlı kalabilmek için farklı gelişimsel hücre evrelerinde değişik fizyolojik ihtiyaçlar göstermektedirler. Tüm laboratuvar prosedürleri insan gamet ve embriyolarının hasar görebileceği in vitro ortamlardır. Embriyoların dondurulmasında ilk olarak geleneksel bir yöntem

olan yavaş dondurma tekniği uygulanmış ancak pahalı ve komplike cihazlara gereksinim olduğundan tercih edilmemiştir. Hızlı dondurmada ise yüksek donma hızları ve en az iki kriyopektan gereklidir. 1985 yılında yapılan çalışmalar sonucunda vitrifikasyon yöntemi bulunmuştur. Dondurma ve çözündürme işlemleri sırasındaki uygulanan donma ve çözünme hızları, embriyonun büyüklüğü ve gelişim dönemleri, KPA'ların toksitesisi ve ozmotik özellikleri aynı zamanda hücrenin geçirgenliklerine bağlı olarak türler arasında farklılıklar göstermektedir (Sağırkaya ve Bağış 2003). Tek bir hücrenin dondurulması, hücre kitlelerinin dondurulmasına göre daha başarılıdır ancak memeli oositleri için aynı durum geçerli değildir. Zigot ve embriyo dönemine göre memeli oositleri, dondurma işlemine karşı daha duyarlıdır (Mavrides ve Morroll 2002). Vücudun en büyük hücrelerinden biri olan oositler, ısı değişikliklerinden oldukça etkilenirler. Soğutulan oositlerde hücre iskeleti organizasyonunun bozulması, kromozom ve DNA anomalilikleri, iç hasarı, prematüre kortikal granül dağılımı ve zona pellusida hasarı gibi bozukluklar bildirilmektedir. Preovulatar folikülden elde edilen olgun oositlerin depolanmasını gerektiren oosit dondurulması ile over dokusunun dondurulup korunması karşılaştırıldığında pre-pubertal kızlarda immatur oositlerin korunabilmesi açısından ve erken foliküller içindeki olgun olmayan oositlerin depolanması yönünden over dokusunun dondurulması daha avantajlıdır. Dondurularak saklanan over dokularının Hodgkin lenfomalı bir hastaya ortotopik transplantasyon ile ilk başarılı canlı doğum başarısını rapor etmişlerdir. Over dokularının dondurularak saklanmasında yavaş dondurma protokolleri uygulanmıştır. Radyoterapi ve kemoterapi alan özellikle genç hastalarda fertilitiyi önlemek amacıyla vitrifikasyon yöntemi ile over kriyoprezervasyonu oldukça faydalı bir yöntemdir. Over dokularının dondurularak korunmasında özel ve pahalı ekipman gerektirmeden hızlı ve kolay bir yol olması, nedeniyle cazip bir prosedürdür (Suzuki vd 2015). Vitrifikasyon tekniğinde hızlı dondurmaya göre doku korunumu daha fazladır (Erdemli vd 2011). Ancak vitrifikasyon sırasında kryoinjury (soğuk etkisiyle zarar görme), ozmotik stres ve transplantasyondan sonra iskemi, over foliküllerinin özellikle primer foliküllerin kaybına neden olur. Primordial foliküllerin vitrifikasyon sırasında kaybını açıklayan mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Çalışmaların çoğunda over foliküllerinin kayıp ve ölümlerinin sebebi apoptoz olduğu gösterilmiş bundan dolayı işlem sırasında antiapoptotik ajanlar kullanılmıştır. Ancak over folikül ölümlerinin bir kısmı azaltılabilmektedir. Folikül kaybına neden olan bir başka önemli pathway (yolak) olabileceği yönünde araştırmalar önem kazanmıştır. *Otofaji* uygun olmayan koşullar altında hücresel yaşamı düzenler. Stres koşulları aktive olduğunda hücre ölümüne neden olur (Yang vd 2016). Ancak son zamanlarda dondurma-çözme tekniklerindeki

gelişmelerle birlikte oositlerin canlı ve normal morfolojileri korunarak başarı oranı yükselmiştir (Kim vd 2006).

2.2.3.1. Vitrifikasyonda solüsyon seçimi

Kriyoprezervasyonda temel prensip donma ve çözünme sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek, oositlerin zarar görmelerini engellemektir. Bunu sağlamak amacıyla hücre içi sıvısının, hücre membranından nüfuz edebilen kriyoprotektif ajanlarla (KPA) yer değiştirmesi hedeflenmektedir. Kriyoprezervasyon ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda, vitrifikasyon geliştirilmiştir. Vitrifikasyonda KPA'ların dondurma işleminde buz oluşumunu önlenerek, solüsyon tümüyle viskoz bir hal alarak sonunda camsı bir faza geçmektedir (Şaylan 2011). Oositlerin morfolojik görüntüleri ve fertilizasyon oranları çözme sonrası değerlendirilmiş olup insan oosit vitrifikasyonu için optimal (uygun) bir method bulunması amaçlanmıştır. Dondurulacak hücreler, KPA solüsyonlarında 30-180 sn arasında bekletildikten sonra sıvı azot sıcaklığına (-196 °C) geçiş yapılmaktadır. Bu yöntemde genellikle geçirgen özellikli bir KPA ile geçirgen olmayan özellikteki bir KPA birlikte kullanılmaktadır (Çetin 2004). KPA'ların toksik etkilerini önlemenin yolu, yüksek konsantrasyonda KPA'ya maruz bırakma süresinin kısaltılması veya daha düşük KPA konsantrasyonu kullanarak equilibasyon periyodunun arttırılmasıdır (Martins vd 2005). Vitrifikasyonda soğutma hızlı bir şekilde yapıldığından soğuk hasarının oluşabileceği sıcaklıklar(+15°C,-5°C) çok hızlı (1/100sn hızında) geçilmektedir. Bu yöntemin yavaş dondurma gibi diğer yöntemlere göre en önemli avantajlarından biri de, çok az zaman harcanması ve pahalı ekipmanlara da gerek duyulmamasıdır. Oosit ve embriyo vitrifikasyonu için seçilen uygun olan bir KPA, soğutulma sırasında optimal konsantrasyonlarda oosit ve embriyoyu vitrifiye eder. Amaca bağlı olarak çeşitli KPA seçilir. En çok kullanılan KPA'lar Gliserol, DMSO ve EG'dir. Genel olarak kimyasal yapıları kompleks değildir. Suda yüksek çözünebilme özelliklerinin yanında hızlı penetre olurlar ve yüksek konsantrasyonlarda osmotik hasarı azaltırlar. Dehidrasyon, dondurma-çözme ve rehidrasyon sırasında hücre içindeki fizikokimyasal etkileşimlerin ve bunların özelliklerinin bilinmesi vitrifikasyon solüsyonlarının hazırlanmasında önemli ölçüde etkilidir (Ali vd 2007). KPA'lar permeabl (geçirgen) ve nonpermeabl (geçirgen olmayan) olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Yardımcı üreme tekniklerinde vitrifikasyon sıvısındaki konsantrasyonunu düşürmek amacı ile birden fazla KPA kullanılır. Yapılan çalışmalarda çift kryopektan kullanıldığında primer ve sekonder foliküllerde

tek kryopektan kullanımına göre daha fazla canlılık görülmüştür (Nasrabadi vd 2015).

2.3. Hücre homeostazisinin sağlanması ve Otofaji

Hücre homeostazisi hücresel komponentlerin sentezi ve yıkımı arasındaki dengenin düzenlenmesi ile sağlanır. Ökaryotik hücrelerde bu dengeyi sağlayan proteozom ve lizozom vakuollerini olmak üzere iki güçlü hidrolitik mekanizma vardır. Uzun ömürlü hücresel proteinlerin %90'ından daha fazlası aynı zamanda bazı sitoplazmik organeller lizozom vakuollerinde parçalanır. Hücre içinde lizozomal protein yıkımını sağlayan en az üç farklı pathway vardır. Bunlardan Cvt (cytosol to vacuole targeting pathway), Vid (vacuolar import and degradation pathway) ve otofaji bilinen önemli yollardandır. Otofaji bütün hücre tiplerinin fizyolojisinde ve patofizyolojisinde önemlidir (Yang vd 2005).

2.3.1. Otofaji

Otofaji, uzun ömürlü proteinlerin, fonksiyonu bozulmuş organellerin, hasarlı makromoleküllerin, patojenlerin ve sitolojik parçaların yok edilmesinde kalite kontrol sistemi olarak çalışır (Karadağ 2016). Hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir otofagozom olarak adlandırılan çift zarlı vezikül içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozom ile birleşerek burada parçalanmasına yol açan homeostatik fonksiyonları sürdüren katabolik bir süreçtir. Kısa ömürlü proteinlerin ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanmasına karşın, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan aminoasit gibi yapı taşları hücre kullanımı için yeniden kazandırılırlar (Arslan 2011, Karadağ 2016). Hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge kaybolduğunda dejeneratif hastalıklar, kanser ve otoimmün hastalıklar görülür. Programlı hücre ölümü çok hücreli organizmalarda morfogenezde, doku homeostazisinde ve patojenlere karşı savunmayı da içeren birçok temel fonksiyonda rol oynayan evrim sürecinde korunmuş mekanizma olup, ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından ortaya atılmıştır. Bu bilim adamları 2 tip hücre ölümü tanımlamışlardır. Genetik olarak kontrol edilen hücre ölümüne apoptozis, programlı olmayan hücre ölümü, nekrozis olarak tanımlamışlardır. Daha sonraki yıllarda apoptozis programlı hücre ölümü olarak adlandırılırken 1990 yılında Clarke'ın yaptığı çalışmalarla 3 tip hücre ölümü daha tanımlanmıştır. Clarke bu sınıflandırmayı

hücre ölümlerinin morfolojilerine göre yapmış ve en az 8 çeşit programlı hücre ölümüne daha işaret etmiştir. Morfolojik tanımlar ve moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucu apoptoza ek veya alternatif olarak düşünülen temel ölüm yollarından birisi de otofaji olmuştur. Apoptozisten farklı olarak otofajinin, besin yokluğunda veya hücrel stres durumunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak homeostazisinin korunmasında yardımcı olduğu gösterilmiştir (Gözüaçık ve Kimchi 2007).

Otofaji patojen enfeksiyonu, hipoksi, besin azalması ya da reaktif oksijen türleri (ROS) gibi hücrel stres ile tetiklenebilir. Hücre gerekli besini bulamadığı durumunda, kendini içten yiyerek varlığını sürdürebilir ayrıca zor koşullara uyumunu sağlayan bu özelliği ile yaşamsal organları tüketerek hücrenin ölümüne de yol açmaktadır. Çalışmalar genellikle açlık tarafından tetiklenen, hücrenin hayatta kalmasında otofajinin fonksiyonu üzerine odaklanmıştır. *Otofajik hücre ölümü* Tıp II hücre ölümü olarak tanımlanmış olup Yunanca'da '*self-eating*' anlamına gelen '*kendi kendini yeme*' terimi otofaji olarak adlandırılmaktadır (Karadağ 2016). Apoptozise göre nükleer değişiklikler otofajik hücre ölümünden sonra gözlenmektedir ve apoptoziste görülen DNA fragmantasyonu ve apoptotik cisimciklerin oluşumu yoktur. Fagositoz tarafından ölü hücrelerin temizlenmesi apoptozise göre daha geç ve oldukça düzensiz olarak meydana gelebilmektedir (Gözüacık ve Kimchi 2007).

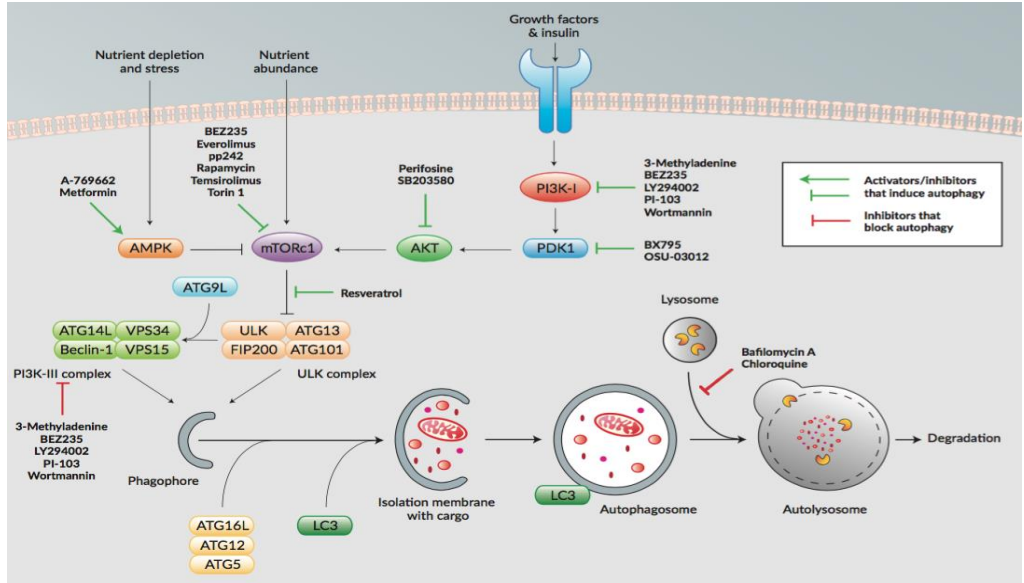
Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç farklı şekli vardır. Makrotofaji: otofajinin temel hücre ölüm mekanizmalarından biridir. Büyük sitoplazmik parçaların, organellerin otofagozom içine alınıp lizozom ile birleşerek sindirime uğratılmasıdır. Mikrotofajide ise küçük parçaların lizozom üzerinde içeriye doğru küçük bir çöküntü oluşması ile lizozom içine alınıp sindirime uğratılır. Şaperon aracılı otofaji diğer otofaji tiplerinden farklı olarak vezikül oluşmaz. Sekans dizisi bilinen sitolik proteinler şaperonlar tarafından tanınır ve lizozom membran üzerindeki lamb 2a reseptörüne bağlanır sindirim gerçekleşir (Karadağ 2016, Yang 2005).

2.3.2. Otofajik Hücre Ölümünün Düzenleyici Mekanizmaları

Otofajide temel mekanizmayı oluşturan genler farklı isimler almışlardır. APG, AUT ve CVT genleri olarak da bilinen genler, *ATG genleri* (autophagy-related genes) olarak adlandırılır. Otofaji sürecinin farklı aşamalarında yaklaşık 30 proteini içeren bir gen ailesi rol oynar. Vezikül oluşumu ve bunların genişlemesi, otofajik veziküllerin lizozomlarla füzyonu ve degradasyonunda rol oynarlar. Otofaji proteinlerini kodlayan maya genlerinin çoğu *Caenorhabditis elegans* genomu ile ortolog (Farklı türlerdeki ortak atadan türevlenmiş homolog diziler). (ATG2, ATG3,

ATG4, ATG5, ATG6, ATG7, ATG8, ATG9, ATG10, ATG12, ATG16, ATG18 genleri). Otofaji fonksiyonunda, otofajinin başlamasında (unc-51/ATG1), vezikül nükleasyonunda (Bec-1/ATG6, vps-34/VPS34), protein konjugasyon sisteminde (Atg-7/M7.5/ATG7, lgg-1/ATG8, lgg-3/ATG12), alım ve vezikül dönüştürmede (Atg-18/F41E6.13/Atg18) fonksiyon gösteren genler belirlenmiştir. Bu temel moleküler mekanizma: Atg1-Atg13-Atg17 kinaz kompleksi; sınıf III phosphoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz, Vps34'un aktivitesini düzenleyen Atg6 protein (memelilerde Beclin-1) kompleksi; iki ubikuitin benzeri sistem ve Atg9 ve döngü sistemi olarak dört basamakta özetlenebilir (Mehrpour 2010; Arslan 2011). Fosfotidilinositol 3-kinazlar (PI3K) otofajik vezikül oluşumunun kontrolünde temel sinyal moleküllerdir (Şekil 2). Otofaji, tip I ve tip III PI3K'lar tarafından düzenlenmektedir (Xie ve Klionsky, 2007, Anding ve Baehrecke 2015).

Otofagozomun membranının temeli hala bir tartışma konusu olmakla birlikte ribozomsuz düz endoplazmik retikulum'dan (ER) türediği düşünülmektedir. Ancak golgi cisimciğinden de köken aldığı tartışılan konular arasındadır. Otofagozom formasyonu 2 ubikuitin benzeri sistem ile oluşur (Yang 2005).



Şekil 4: Otofaji mekanizmasında yer alan aktivatörler ve inhibitörlerin gösterilmesi (<https://www.invivogen.com/autophagy-inducers>)

2.3.2.1. MTOR ve PmTOR'un otofajideki düzenleyici rolü

MTor 289 Dka hücre içi merkezi bir noktaya yerleşmiş olan hücre içi sinyal kaskatlarından serin/treonin protein kinazdır Fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K) ailesindedir ve evrimsel olarak korunmuştur (Laplanche 2009). PI3K

aktivasyonunun sinyal iletiminde etkilidir. PI3K/AKT sinyal yolağının bileşenlerindedir (Küçüköner 2013). MTOR iki farklı multiprotein kompleksten oluşur; beş farklı komponentten oluşan mTOR kompleks 1 (mTORc1) ve sekiz farklı proteinden oluşan mTOR kompleks 2 (mTORc2). MTOR2 hücre büyümesi ve çoğalması, protein lipid ve organellerin biyosentezinde otofaji gibi katabolik proseslerde görev alır (Laplanche 2009). Mtor inhibitörleri mTOR'un aktive olmasını engeller. İnhibitörler mTORc1 ve mTORc2 bileşenlerinden oluşan mTOR'un sadece mTORc1 kompleksini etkiler. MTORC1 sirolimusa ve besine duyarlı iken mTORc2 sirolimusa'ya duyarlı değildir. En çok bilinen mTOR inhibitörleri rafamisin ve türevleri, temsirolimus, everolimustur (Küçüköner 2013).

Otofajik aktivitenin kontrolünde, ilk olarak mayada mantara karşı kullanılmak üzere geliştirilmiş rapamisin'in hedefi olarak ortaya çıkarılmış olan *Tor protein* kompleksi önemli bir rol oynamaktadır. Tor, hücrede protein sentezi ve hücreSEL büyümeYi kontrol eden bir kinazdır. Bu proteinin baskılanması sonucu mayalarda ve memelilerde otofaji aktif hale gelir. Besinin bol olduğu koşulda maya Tor proteini, otofaji proteinlerinden biri olan Atg13'u fosforile etmekte ve otofajiyi baskılamaktadır. Açlık durumunda Atg13 defosforile olarak Atg1 adlı serin treonin kinaza bağlanmaktadır. Atg1 kinazının aktivasyonu ile otofaji uyarılır (Kamada 2000).

MTOR'un aktif hali olan fosforlanmış serine 2448 kinaz (PmTOR) mTOR'un aktivasyonu ile bağlantı gösterir. Sağlıklı foliküllerde kütlece daha zengin olmakla mitotik granüloza hücrelerinde sitokinez sırasında G2/M-fazda görülür (Yaba 2008).

Tezimizin hipotezleri şunlardır:

1. Vitrifikasyon ovaryum dokusu için uygun bir kriyoprezervasyon yöntemidir
2. Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş ve çözündürülmüş ovaryum dokusunda meydana gelen oosit kayıplarının nedenlerinden biri de otofaji olabilir.
3. Hücrenin enerji sensörü mTOR ve aktif hali PmTOR ovaryum dokusunda otofajiyi göstermek için uygun bir parametredir.

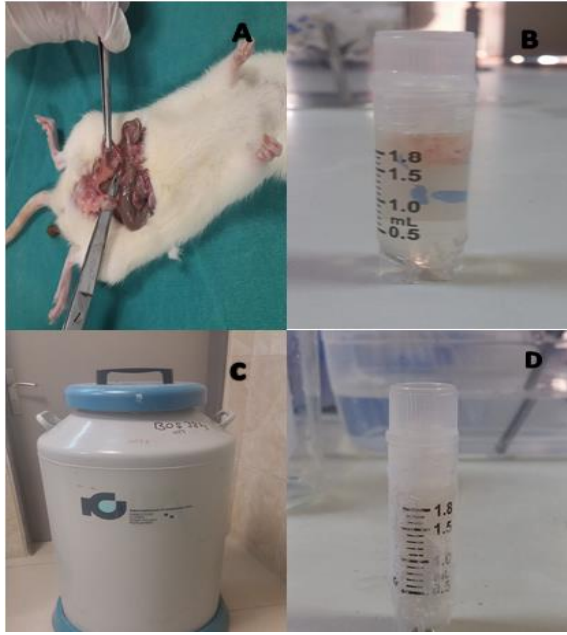
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Gruplarının oluşturulması

Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulundan 08.11.2016 tarihinde PAUHADYEK-2016/24 numarasıyla onay alındı. Çalışma için kullanılacak hayvanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama Merkezinden sağlıklı 12 adet Wistar-Albino cinsi sıçan temin edildi. Ortalama 150-160 gr ağırlığında 8 haftalık sıçanlar rastgele seçilerek 6 adet kontrol grubu 6 adet vitrifikasyon grubu olarak 2 gruba ayrıldı. Sıçanlar su ve besin kısıtlaması olmaksızın, 12'şer saatlik aydınlık/ karanlık döngüsünde tutuldu. Dişi sıçanlara ketalar anestezisi uygulanarak sakrifiye edilerek ovaryumları alındı.

3.2. Vitrifikasyon Protokolü

Sıçanlardan alınan overler PBS' de yıkandıktan sonra 1,8 ml'lik kriyoviallere alınıp üzerine vitrifikasyon solüsyonu ilave edildi. Dokular kryokutular içine yerleştirilerek 10 dk sıvı azot buharında bekletilerek sıvı azot tankına yerleştirildi (Şekil 5).



Şekil 5: A: Sıçanlarda ovaryum dokusunun gösterilmesi. B,D: Kriyovial içinde ovaryum dokusu. C: Deney aşamasında kullanılan sıvı azot tankı

Bir hafta sıvı azot tankında bekletilen ovaryumlara çözdürme protokolü (Nasrabadi vd 2015) uygulanarak doku tespit solusyonu olarak %10'luk tamponlu formalin içine koyularak 48 saatlik tespitinden sonra doku takip süreci uygulandı.

Vitrifikasyon protokolü ve solüsyonların hazırlanışı:

Vitrifikasyon protokolü için Nasrabadi ve arkadaşlarının (2015) "Preservation of mouse ovarian tissue follicle morphology and ultra-structure after vitrifying inbiotechnological protocols" makalesindeki deney protokolü temel alınmıştır. Bu çalışmada 6 farklı vitrifikasyon protokolü hazırlanmış en iyi sonuç 5. ve 6. vitrifikasyon protokolleri karıştırılıp elde edilmiştir. Buna göre: %7.5 EG (Etil Glikol), %7.5 DMSO (Dimetil sülfoksit), 0.5 M sukroz, %20 FBS (Fetal bovine serume) karıştırılarak vitrifikasyon solüsyonu elde edilmiş olur.

0,5 Molar sukroz hazırlama:

Sukroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$) molekül ağırlığı 342,2965 g/mol' dur.1 lt için 1 mol 342 g sukroz gerekli ise 0.5 M için 171 g gerekir.

50 ml için: $50 \times 171/1000:8.55$ gr gereklidir. 8.55 gr sakroz DPBS içinde çözdürülerek 50 ml' ye tamamlanır.

0,25 Molar sukroz hazırlama:

Sukroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$) molekül ağırlığı 342,2965 g/mol' dur.1 lt için 1 mol (342 g) sukroz gerekli ise 0.25M için 85,5 g gerekir.

50 ml için: 50 x 85,5/1000:4,27 gr gereklidir. 4,27 gr sukroz DPBS içinde çözdürülerek 50 ml' ye tamamlanır.

%20 FBS hazırlama:

100 ml için 20 ml FBS solüsyonu gereklidir. 50 ml için 10 ml FBS solüsyonu gereklidir. 10 ml FBS solüsyonu kaba koyularak DPBS ile 50 ml' ye tamamlanır.

%7.5 EG hazırlama:

100 ml için 7.5 ml EG solüsyonu gereklidir. 50 ml için 3.75 ml EG solüsyonu gereklidir. 3.75 ml EG solüsyonu kaba koyularak DPBS ile 50 ml' ye tamamlanır.

%7.5 ml DMSO solüsyonu hazırlama:

100 ml için 7.5 ml DMSO solüsyonu gereklidir.50 ml için 3.75 ml DMSO solüsyonu gereklidir. 3.75 ml DMSO solüsyonu kaba koyularak DPBS ile 50 ml' ye tamamlanır.

Çözdürme protokolü:

- a. Oda sıcaklığı 10 dk
- b. Su banyosu (25C°) 10 dk
- c. 0,5 M sukroz (DPBS içinde çözdürüldü) 10 dk
- d. 0,25 M sukroz (DPBS içinde çözdürüldü) 10 dk
- e. Oda sıcaklığı 10 dk

3.3. Uygulanan Teknikler

3.3.1. Doku takip Yöntemi

Tüm gruptaki ovaryumlar parafin doku takibi yapılmak üzere alındı. Doku takibi prodesürü aşağıdaki gibi uygulandı. Alınan dokular formaldehitde 2 gece bekletildi.

- a. Akarsuda 30 dk yıkanır.
- b. %50'lik etil alkolde 1 saat bekletilir.
- c. %70'lik etil alkolde 1 saat bekletilir.
- d. %80'lik etil alkolde 1 saat bekletilir.

- e. %90'lık etil alkolde 1 saat bekletilir.
- f. %100'lık etil alkolde 1 saat bekletilir.
- g. Ksilen I de 1 saat bekletilir.
- h. Ksilen II de 1 saat bekletilir.
- i. Parafin I de 1 saat bekletilir.
- j. Parafin II de 1 saat bekletilir.
- k. Dokulara parafinle gömme ve etiketlenme işlemi yapılır.

3.3.2. Hematoksilen&Eozin Boyama Protokolü:

Dokular etüvde 60 dk bekletilerek deparafinizasyon yapılmıştır. Etüvden alınan dokular sırayla şu aşamalardan geçirilir.

- a. Ksilen (Şeffaflandırma) 30dk bekletilir.
- b. Ksilen (Şeffaflandırma) 30 dk bekletilir.
- c. %100 Etil Alkol 10 dk bekletilir.
- d. %96 Etil Alkol 10 dk bekletilir.
- e. %80 Etil Alkol 10 dk bekletilir.
- f. %70 Etil alkol 10 dk bekletilir.
- g. Distile su batırılıp çıkarılır.
- h. Hematoksilen 3 dk bekletilir.
- i. Akarsu yıkama yapılır
- j. Asit-alkol batırıp çıkarma işlemi yapılır.
- k. Amonyak 1-2 saniye bekletilir.
- l. Akarsu yıkama yapılır.
- m. Eozin 10 sn bekletilir.
- n. %70 Etil alkol 10 dk bekletilir.
- o. %80 Etil alkol 10 dk bekletilir.
- p. %96 Etil alkol 10 dk bekletilir.
- q. %100 Etil alkol 10 dk bekletilir.
- r. Ksilen 10dk bekletilir.
- s. Kapatma: Üzerinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamellerle kapatılır.

3.3.3. İmmunohistokimyasal boyama protokolü

Doku takip yöntemi tamamlanan ovaryum bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µ'luk kesitler alındı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir (Reaktifler için AB-CAM Histostain-Plus kit lot: 1909932A kullanılmıştır).

- a. Lama alınmış dokular deparafinize edilir. 60 C° etüvde 2 saat bekletilir.
- b. 3 kez 10 dk ksilende bekletilir.
- c. Kurutulur.
- d. Rehidrate edilir. -Azalan alkolde 3 er dk bekletilir.
- e. Distile su ile yıkanır. Not: Bu aşamadan sonra dokular kesinlikle kurutulmamalıdır.
- f. Antigen retrieval: PAÜ Histoloji ve Embriyoloji araştırma laboratuvarı olarak en çok tercih ettiğimiz yöntem ısı ile retrieval yapmaktır. Primer antikorun antigen retrieval protokolü kontrol edilir.

Sodium citrate buffer (10 mM Sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0)

- Tri-sodium citrate (dihydrate) 2.94 g
- Distille su 1 L
- Karışımı karıştır. 1N HCl ile PH 6.0 ayarla.
- 0.5 mL Tween 20 ilave edilerek beraber karıştırılarak solüsyon hazırlanır. Sodyum sitrat buffer solüsyonu 3 hafta oda ısısında saklanabilir.

Daha sonra ev tipi mikrodalga ile uyumlu beher içine zembildeki dokular konularak mikrodalğanın güç ve zaman ayarları sonuna kadar açılır.60 C° de kaynamaya başladıktan sonra 20 dakika kaynatılır. Daha sonra sıcak beher dışarı alınıp oda sıcaklığında soğutulur. Akan su banyosunda soğutma işlemi hızlandırılabilir.

- g. 3 kez 5 dk 1X PBS ile yıkanır.
- h. Enzim bloklama: 1 birim H₂O₂ 9 birim absolut methanol ile hidrojen peroksit solüsyonu hazırlanır.
- i. 3 kez 5 dk 1X PBS ile yıkanır.
- j. Pappen ile doku sınırlanır.
- k. İmmün bloklama: Sekonder kitindeki A solüsyonu İmmün blok solüsyonudur. Pappen ile sınırlandırılmış doku üzerine damlatıp 10 dk beklenir. İmmun bloklamadan sonra yıkama yapılmaz.

- l.** Primer antikorumuzu datasheette yazıldığı şekilde dilüe edilir (mTOR: 1\100 PmTOR: 1\100). Yine datasheetde yazdığı şekilde 16 saat inkübasyona bırakılır.
- m.** 3 kez 5 dk 1X PBS ile yıkanır.
- n.** Sekonder antikorla inkübasyon: Sekonder kitteki B solüsyonu sekonder antikordur. Pappen ile sınırladığınız dokunun üstüne damlatıp 10 dk inkübe edilir.
- o.** 3 kez 5 dk 1X PBS ile yıkanır.
- p.** Enzim ile inkübasyon: Sekonder kitindeki C solüsyonu Sekonder Ab ları inkübe edeceğiniz enzimi içermektedir. 10 dk dokuları C solüsyonu ile muamele edilir.
- q.** 3 kez 5 dk 1X PBS ile yıkanır.
- r.** DAB kromojen kiti aşamasına geçilip enzimatik boyama yapılır. (hazırlanışı: DAB kromojen için 1.5 ml(50 damla) DAB substrat ile 30µl (1 damla) DAB kromojen karıştırılıp vortexlenir. Daha sonra ışık almayacak şekilde çekmeceye kaldırılıp yarım saat içinde kullanılmalıdır).
- s.** DAB kromojen solüsyonu damlatılıp 15 dk beklenir. Gözle boyamanın durumu kontrol edilip süre değiştirilebilir.
- t.** 3 kez 5 dk 1X distile su ile yıkanır.
- u.** Zemin boyama: Hematoksilene batırıp çıkarılır. (Bu aşama antijenimizin çekirdek sitoplazma veya ekstrasellüler olup olmadığına göre değişir. Çekirdeği boyayan hematoksilene kromojeni örtebilir. Bu durumlarda farklı zemin boyaları kullanılabilir).
- v.** Akan suda yıkanır.
- w.** Artan alkol serisinde dehidrate edilir.
- x.** Kurutulur.
- y.** 3 dk ksilolde bekletilip kapatılır

(+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (/+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok, (/): o yapıya rastlanmamıştır.

Kullandığımız ürünlerin markaları:

1. Primer Ab: PmTOR (santa cruze lot: #D0617), mTOR(cell signal lot: Cat#2972S)
2. Sekonder Kit: Novex by life Technologies- Histostain Plus Broad Spectrum (lot:1909932A)
3. DAB kromojen kit: Abcam- DAB Plus Substrate Kit (lot: GR3191368-2).
4. Ethylene glycol: Merck (lot: K48337121643).
5. DPBS: Sigma (lot: RNBGO324).
6. Dimethyl sulfoxide: Merck (lot: K48856212719)

7. Sucrose: Duchefa biochemic (lot: 013027.09)
8. PBS: Sigma aldrich (lot:MKUC4362T)
9. Hematoksilen: Merck (HX71788774)
10. Eosin: Merck (HX41922544)

3.4. Folikül Sayımı Yöntemi

Dokular ışık mikroskopik olarak takip edildikten sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5µm seri kesitler alındı. Kesitlere Hematoksilen&Eosin boyama yapıldıktan sonra Caldwell ve arkadaşlarının (2014) "Characterization of Reproductive, Metabolic and Endocrine features of Polycystic Ovary Syndrome in Female Hyperandrogenic Mouse Model" makalesindeki kullandıkları yöntemle göre 1. 5. ve 10. Kesitlerde primordiyal, primer, gelişen, sekonder, tersiyer ve atretik foliküllerle korpus luteum'um sayımı yapıldı. (Folikül değerlendirme kriterleri bulgular kısmında açıklanmıştır.)

3.5. İstatistiksel Analizler

Folikül sayımı yapıldıktan sonra gruplar arasındaki farklılık independent Samples T testi ve Mann-Whitney U ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS 21 paket programı kullanılmıştır. P<0,05 kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

Kontrol grubundan alınan ovaryum dokusunda gelişimin değişik safhalarındaki foliküller izlendi (Şekil 7). Kesitlerde tek katlı yassı epitelle çevrili primordial foliküller, kübik epitelle çevrili primer foliküller, çok sıralı epitelle çevrili gelişen foliküller, antrumun oluşmaya başladığı sekonder foliküller ve kumulus ooforusun olduğu tersiyer folikül normal görünümündeydi.

Vitrifikasyon işleminin yapıldığı ovaryum dokusunda da gelişimin tüm safhalarındaki foliküller izlenmekteydi. Genel olarak foliküllerin çoğunluğu normal yapıdaydı (Şekil 8). Her iki grupta da atreziye giden foliküllere rastlandı. Primer ve primordial foliküllerin bir kısmında oosit sitoplazmasında vakuollerin olduğu bazı foliküllerde bu vakuollerin birleşerek boşluk oluşturduğu dikkati çekti. Ayrıca gelişen foliküllerde granuloza hücrelerin aralarında ayrılmalar olduğu izlendi. Sekonder foliküllerde granuloza katmanında incelmeler lümende hücre birikimlerine rastlandı. Foliküllerin stromadan yer yer ayrıldığı ve boşluklar oluşturduğu izlendi. Özellikle vitrifikasyon uygulanan grupta oval görünümlü oositler dikkati çekti (Şekil 9).

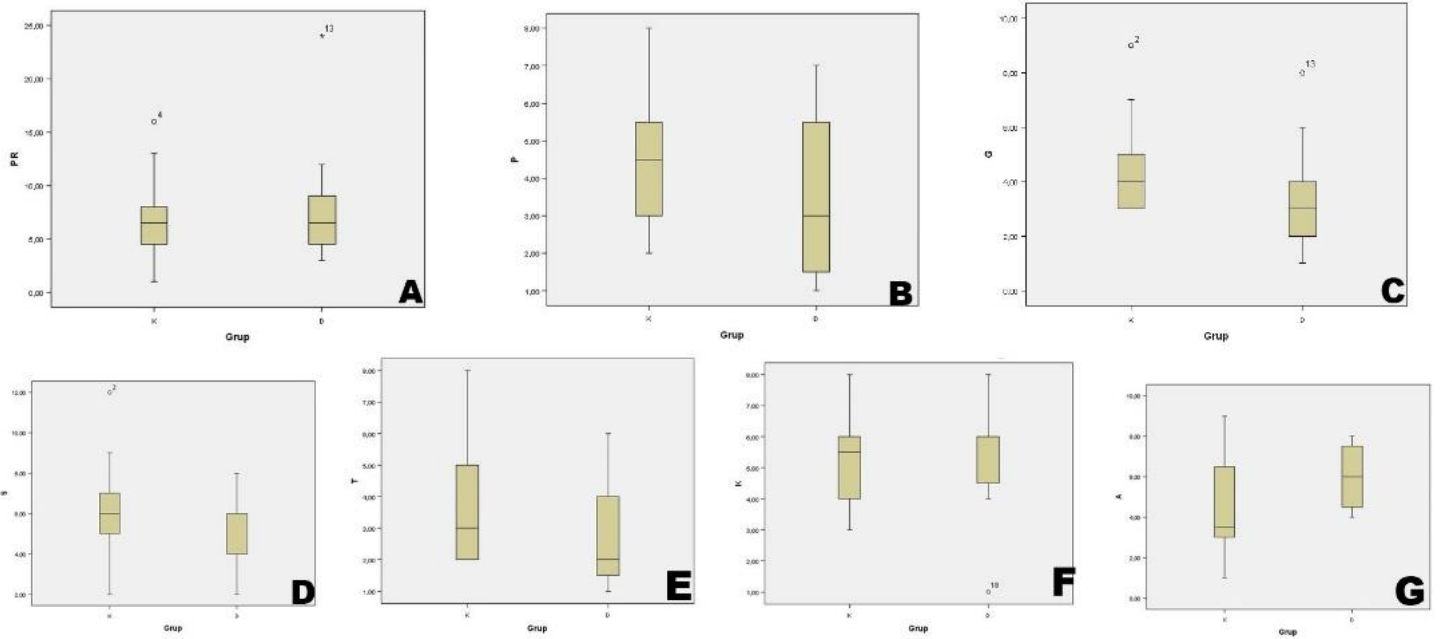
4.1.1. Folikül sayımı

Hemotoksilen-eozin histolojik boyaması uygulanan kesitlerde foliküller aşağıda belirtilen kriterlere göre sınıflandırılmış ve sayımları yapılmıştır. Mann Whitney U istatistiksel analiz testi ile sayılan foliküller karşılaştırılarak analiz edilmiştir (Tablo 1) Vitrifikasyon grubundaki primordial, primer, gelişen, sekonder, tersiyer, atretik foliküller ve korpus luteum sayıları toplam folikül sayılarına göre karşılaştırılarak box blot grafiği hazırlanmıştır. Şekil 6 da gösterilen grafiğe göre foliküllerin boyutlarında artma oldukça vitrifikasyon işlemi sonrası sayılarında azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

- Primordial folikül: Tek katlı yassı epitel ile çevrili foliküllerdir.
- Primer folikül: Tek katlı kübik ya da prizmatik hücre tarafından çevrilmiş, birden fazla granüloza hücre tabakası içeren foliküllerdir. Zona pellüsida gelişir
- Sekonder folikül: Granüloza hücre tabakasında boşluklar oluşan foliküller
- Tersiyer folikül: Geniş antrumu olan ve kumulus ooforusu oluşan foliküllerdir.

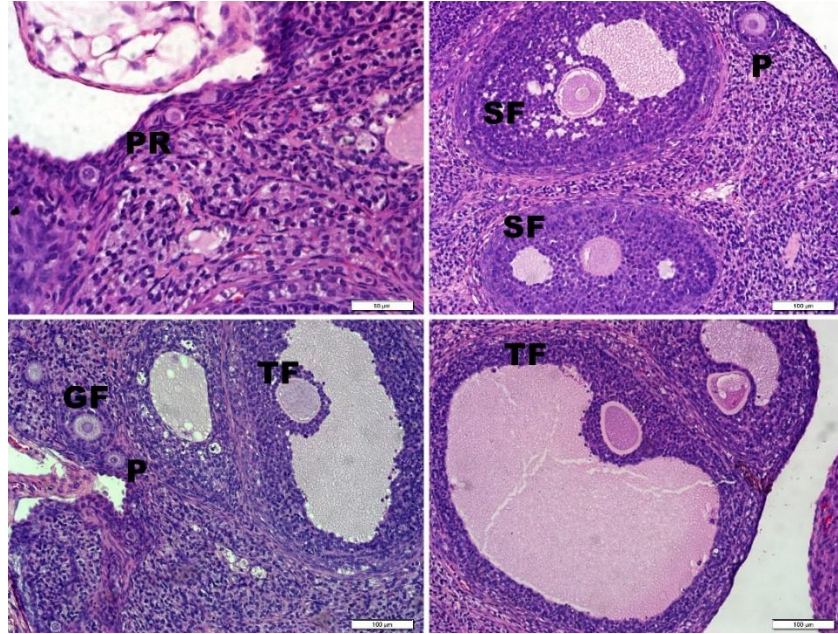
Tablo 1: Kontrol ve Vitrifikasyon grupları arasındaki folikül sayılarının istatistiksel sonuçları. Mean±SD

	<u>Primordial Folikül (Mean±SD)</u>	<u>Primer Folikül (Mean±SD)</u>	<u>Gelişen Folikül (Mean±SD)</u>	<u>Sekonder Folikül (Mean±SD)</u>	<u>Tersiyer Folikül (Mean±SD)</u>	<u>Korpus Luteum (Mean±SD)</u>	<u>Atretik Folikül (Mean±SD)</u>
	7500±4,88	4.000±2,04	3,19±1,92	5.333±2,31	3.2917±1,92	5.333±1,62	5.200±2,23
P değerleri	P=0,576	P=0,178	P=0,198	P=0,067	P=0,282	P=0,720	P=0,085

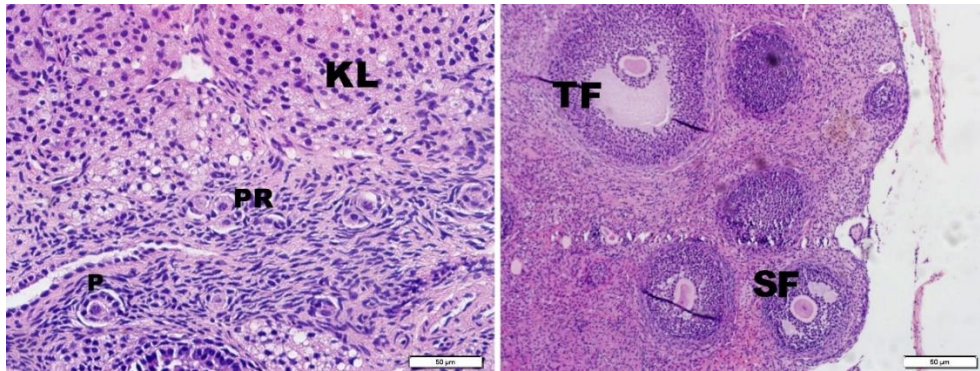


Şekil 6: İstatistiksel verilerin grafikleri. A; Primordial folikül, B; Primer folikül, C; Gelişen folikül, D; sekonder folikül, E; Tersiyer folikül, F; Korpus luteum, G; Atretik folikül

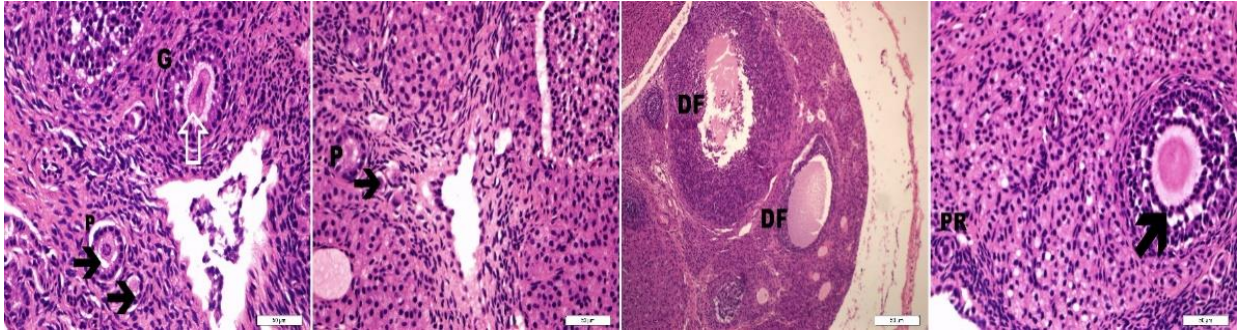
4.1.2.Hematoksilen&Eosin boyama



Şekil 7:Kontrol grubu ovaryum dokusunda oositlerin çeşitli aşamalıdaki foliküller izlenmekte. P; Primer folikül, PR; Primordial folikül, SF; Sekonder folikül, GF; Gelişen folikül, TF; Tersiyer folikül. Hematoksilen&Eozin Boyama. Bar=500μm



Şekil 8: Vitrifikasyon işlemi uygulanmış ve çözünmüş ovaryum dokusu. P; Primer folikül, PR; Primordial folikül TF; Tersiyer folikül, SF; Sekonder Folikül, KL; Korpus Luteum. Hematoksilen-Eozin, Bar=500μm



Şekil 9: Vitrifikasyon işlemi uygulanmış ve çözünmüş ovaryum dokusu. P; Primer folikül, PR; Primordial folikül, DF; Dejenere folikül, Ok; Oosit sitoplazmasındaki boşluk. Hematoksilen-Eozin. Bar=50µm

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Yapılan immunohistokimyasal boyamalarda kontrol ve dondurulmuş ovaryum dokularında pimordial, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerde granulosa hücrelerinde aynı zamanda oositlerde mTOR'un kuvvetli eksprese olduğu izlendi. Oositteki ekspresyon granulosa hücrelerinden daha kuvvetliydi ve gelişim aşamasındaki tüm foliküllerdeki tüm oositlerde ekspresyon izlendi. Granulosa hücrelerinde ekspresyon yaygın ve sitoplazmik iken oositlerde ise kuvvetli sitoplazmik ve orta derecede nükleer ekspresyon görüldü. Reaksiyonun derecesi ve yerleşimi kontrol ve dondurma işlemin uygulanan ovaryum dokularında aynı idi. Aynı zamanda da korpus luteumda da sitoplazmik ve yaygın mTOR aktivitesi görüldü (Şekil 10, 11). MTOR ekspresyonu tablo 2 de özetlenmiştir.

Tablo 2: Kontrol grubu ve vitrifikasyon işlemi uygulanmış ovaryum dokusunda mTOR ekspresyonu ve yerleşimi

	Oosit				Granuloza hücreleri			
	Çekirdek		Sitoplazma		Çekirdek		Sitoplazma	
	K	V	K	V	K	V	K	V
Primordial Folikül	++	++	+++	+++	-	-	+	+
Primer Folikül	++	++	+++	+++	-	-	+	+
Gelişen Folikül	++	++	+++	+++	-	-	+	+
Sekonder	++	++	+++	+++	-	-	+	+
Tersiyer	++	++	+++	+++	-	-	+	+

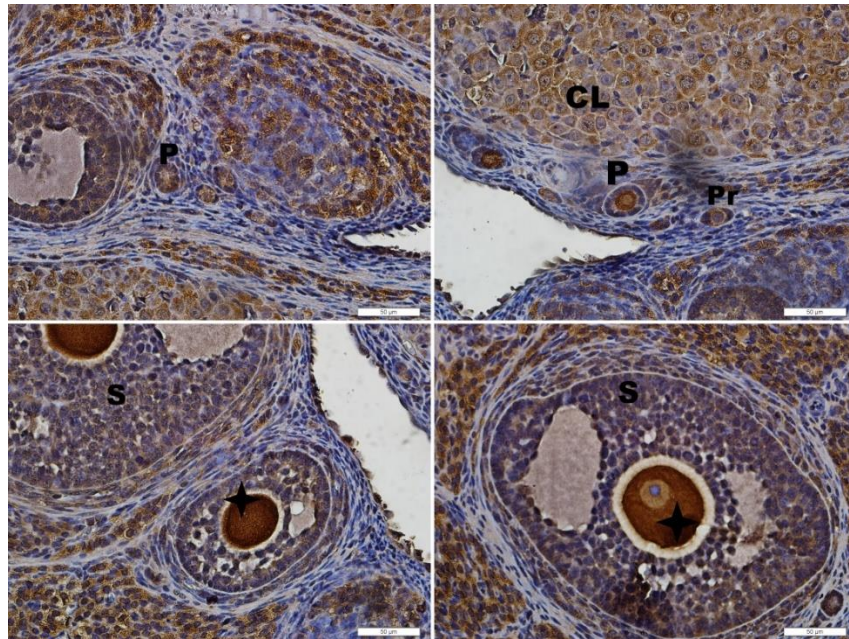
PmTOR ekspresyonu ise her iki grupta farklılık gösteriyordu. Kontrol grubundaki oositler ve granulosa hücrelerinde pozitif ekspresyon izlenirken dondurma işleminin uygulandığı gruptaki oositlerde ve granulosa hücrelerindeki ekspresyon negatifti.

Kontrol grubunda pmTOR ekspresyonu oositlerde orta derecede granuloza hücrelerinde ise zayıf olarak reaksiyon göstermiştir (Şekil 12, 13). PmTOR ekspresyonu tablo 3 de özetlenmiştir.

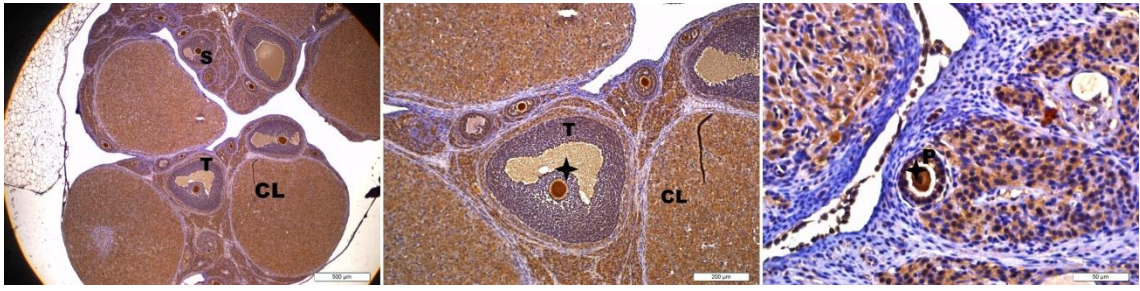
Tablo 3: Kontrol grubu ve vitrifikasyon işlemi uygulanmış ovaryum dokusunda PmTOR ekspresyonu ve yerleşimi

	Oosit				Granuloza hücreleri			
	Çekirdek		Sitoplazma		Çekirdek		Sitoplazma	
	K	V	K	V	K	V	K	V
Primordial Folikül	-	-	++	-	-	-	+	-
Primer Folikül	-	-	++	-	-	-	+	-
Gelişen Folikül	-	-	++	-	-	-	+	-
Sekonder	-	-	++	-	-	-	+	-
Tersiyer	-	-	++	-	-	-	+	-

a) mTor ekspresyonu

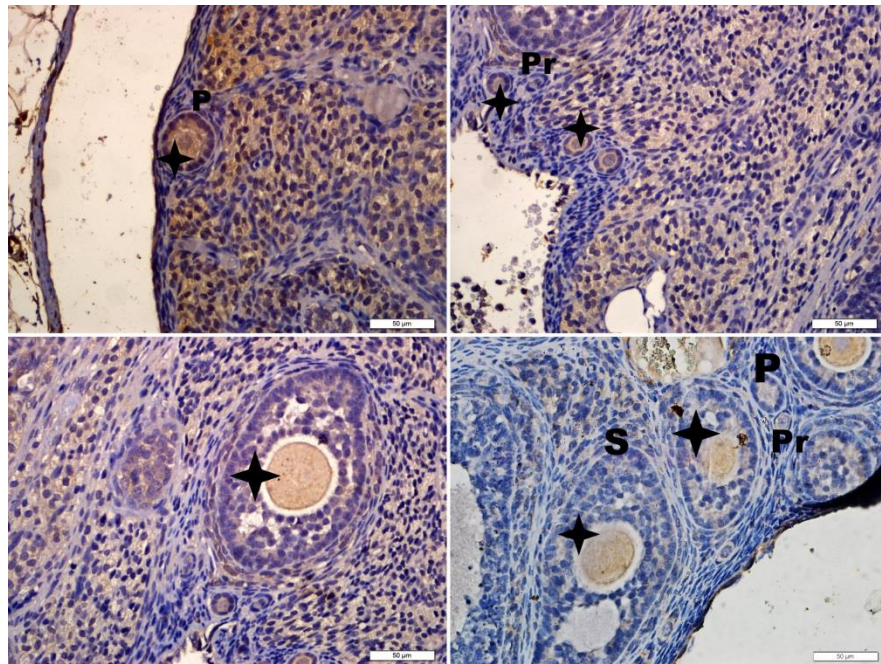


Şekil 10: Kontrol grubu ovaryum dokusunda mTOR ekspresyonu. P; Primer folikül. Pr; Primordial folikül, S; Sekonder Folikül. CL; Corpus Luteum. Artı; Oositlerdeki kuvvetli ekspresyon. İmmunoperoksidaz-hematoksilen. Bar=50μm,

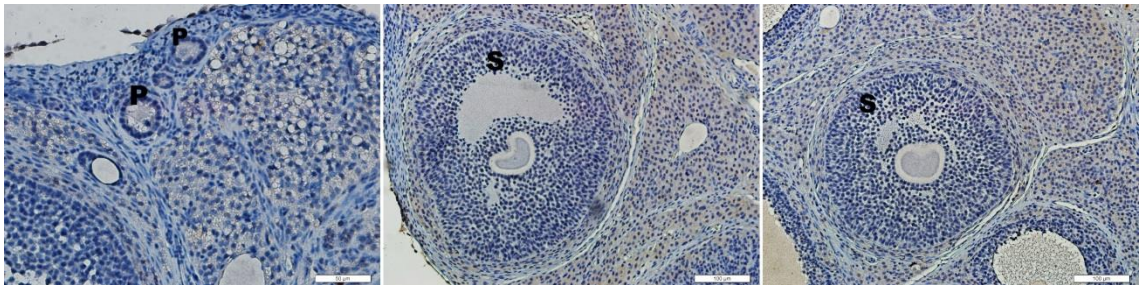


Şekil 11: Vitrifikasyon işlemi uygulanmış ve çözünmüş ovaryum dokusunda mTOR ekspresyonu. P; Primer folikül, CL; Korpus Luteum, Yıldız; oositlerdeki kuvvetli ekspresyon. İmmunoperoksidaz-hematoksilen. Bar=500,200, 50µm

b) PmTOR ekspresyonu



Şekil 12: Kontrol grubu ovaryum dokusunda PmTOR (PSer2481mTOR) ekspresyonu. P; Primer folikül, Pr; Primordial folikül, S; Sekonder Folikül. Yıldız; Oositlerdeki kuvvetli ekspresyon. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar: 50µm



Şekil 13: Vitrifikasyon işlemi uygulanmış ve çözünmüş ovaryum dokusunda PmTOR (PSer2481mTOR) ekspresyonu. P; primer folikül, S; Sekonder folikül. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µm, 100µm

5. TARTIŞMA

Canlı türler arasında üreme önemli bir biyolojik süreçtir. İnsan ovaryumu doğumda olgunlaşmamış yaklaşık 400.000 oosit içerirken zaman içinde oositler dereceli olarak azalır Primordial folikül rezervinin azalması; kemoterapi, yaş ya da diğer faktörlere bağlı olarak oosit kalitesindeki bozulmadan meydana gelebilir. Kanseri tedavileri, çeşitli nedenlere bağlı over operasyonları, premature over yetmezliği gibi durumlarda foliküler atrezi artmakta ve erken infertilite meydana gelmektedir. Ovaryumda folikülükulogenezis primordal folikülle başlar. Primordial folikül aktive olduktan sonra primer, sekonder ve tersiyer folikül oluşur. Oositlerin çekirdek materyali birinci mayozun profaz safhasında germinal vezikül içindedir ve bu safhadaki oositler immatur (olgunlaşmamış) oosit olarak adlandırılır. Puberteden sonra mayoz bölünme tekrar başlar ve oositler ikinci mayozun metafaz safhasında ovulasyonla birlikte ovaryumdan atılırlar.

İnfertilite sorunuyla karşılaşan hastalarda doğurganlığın korunması için tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Gelişen teknoloji ile birlikte erken infertiliteyi önlemek için koruma teknikleri araştırılmıştır (Gosden ve Nanago 2002).

Polge ve arkadaşları tarafından 1949 yılında gliserol kullanılarak sperma hücreleri üzerinde başarılı şekilde dondurma yönteminin geliştirilmesi, kriyobiyoloji alanındaki ilerlemelerin temelini oluşturmuştur. Kriyoprezervasyon çalışmaları daha sonra oosit ve dokularda uygulanmıştır.

Yardımcı üreme tekniklerinde oosit, embriyo ve ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonu infertiliteyi önlemek için kullanılan yöntemlerdendir. Bu yöntem ile toplanan oositlerde çeşitli yöntemlerle fertilizasyon sağlanabilir ve oluşan embriyo saklanabilir. Kanseri tedavisinden sonra hastaların gebe kalması da sağlanmış olur. Ancak oosit ve embriyo kriyoprezervasyon işlemlerinin birbirlerine göre dezavantajlarının olmasından dolayı kullanımı sınırlı kalmıştır. Embriyo dondurma işlemi, bekar bayan hastalarda ve hastalığın tanısı koyulduktan sonra hemen tedaviye başlanması gerektiği durumlarda yeterli zaman ayarlanamazsa

uygulanamaz (Lee 2008). Embriyo dondurma işlemine göre oosit dondurma işlemi daha avantajlıdır. Ovaryumda küçük, inaktif, farklanmasını tamamlamamış, zonası oluşmamış, immatür oositler içeren yüzlerce primordiyal folikül vardır. Bu olgunlaşmamış oositler, zona pellusidanın ve kortikal granüllerin yokluğu nedeniyle kriyoprezervasyon sırasında soğuk hasara karşı daha dayanıklıdır ve tolere edebilirler. Toplanan immatür oositler kriyoprezervasyondan sonra in vitro olarak olgunlaştırılabilir (Choi vd 2007).

Wallace vd (2005) ise yaptıkları araştırmada oosit kriyoprezervasyonunda oositler toplanmadan önce oositlerin uyarılması gerektiğinden dolayı tedaviye hemen başlanması gerektiği durumlarda yeterli zaman ayarlanamayacağı için ve meme kanseri tanısı almış hastalarda ovaryum uyarımı için kullanılan gonodotropinlerin östrojen içerdiğinden dolayı kanser dokusunu tetikleyeceğinden uygun olmadığını bildirmişlerdir.

Erken dönemde tanı koyulması ile birlikte tedavi sürecinin planlanmasına çocuk sahibi olmada diğer üreme ile ilgili seçeneklere olanak sağlayarak erken infertilite önenebilir (Küçük 2015). Günümüzde kanser tedavisine başlanmadan önce kanserle veya kanser tedavisinden sonra ortaya çıkan infertilitenin üstesinden gelmek önemlidir (Çelik 2016).

Küçük'e (2015) göre ovaryum dokusu, kanser tedavisinde herhangi bir işleme gerek kalmadan zaman sınırlaması olmadan, evlilik ve bayanın yaşı hesaba katılmadan bağımsız olarak herhangi bir zaman diliminde alınabilir. Ovaryum folikülleri ovaryum dokusu içinde bulunan stroma hücreleri ve kan damarları arasında gömülü halde bulduklarından ovaryum içinde bulunan primordiyal foliküller kültüre edilenlerden daha iyi gelişir. Ovaryum endokrin fonksiyonu oosit ve embriyo dondurulması ile sağlanamazken ovaryum dokusunun dondurulması ile korunabilir. Yapılan çalışmalarda hormonal ve doku korunumun iyi olduğu gösterilmiş, kadın fertilitésinin korunmasında diğer yöntemlere göre daha avantajlı olduğu görülmüştür.

Gook vd (2004) çalışmasında over dokusunun kriyoprezervasyon işlemi farklı hücre tipleri, içerdiğinden dolayı ve bu hücrelerin geçirgenlikleri de farklı olduğundan dolayı diğer oosit ve embriyo dondurma işlemlerine göre daha kompleks ve zor olduğunu bildirmiştir.

Suzuki vd (2015) güncel inaktif foliküllerin in vitro aktivasyonunu (IVA) tedavisinin ağırlıklı olarak folikül büyümesini desteklediği ve yumurta kalitesinde yaşa bağlı olan azalmaya yönelik bir düzeltme yapmasının mümkün olmadığını vurgulamışlardır. IVA tedavisine aday olan POY hastalarında oositlerde genetik

hataların yaşa bağlı artışının minimize edilmesi için over dokularının genç yaşta dondurulup saklanmasını önermişlerdir.

Donnez ve Dolmans (2015) yaptıkları araştırmada over dokusu kriyoprezervasyonu ile yaklaşık 60 sağlıklı doğum rapor edildiğini ve kriyoprezervasyon uygulanan over dokusunun 11 yıla kadar saklanabileceğini bildirmişlerdir

Kriyoprezervasyon çalışmalarında ilk geleneksel yöntem, yavaş dondurma yöntemi kullanılmış fakat bilgisayar destekli bir program yardımıyla, sıcaklığın kademeli olarak düşürülmesi prensibine dayalı bir sistem olmasından dolayı pahalı ve komplike cihazlara ihtiyaç duyulduğundan kullanımı sınırlı kalmıştır. Aynı zamanda yüksek donma hızları ve en az iki kriyopektan gerekli olduğundan toksisitesi yüksek bir yöntem olmuştur. Diğer yöntemlere göre daha az beceri gerektirir fakat daha çok maliyetlidir. Çözme esnasında kristal formasyonunu önlemek için hızlı çözmek gerekir. Avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Ancak yavaş dondurma yöntemi kullanılarak dondurulmuş ve çözdürülmüş taze over dokusunun transplantasyonu sonucu yaklaşık 26 sağlıklı bebek dünyaya gelmesine rağmen ovaryum dokusunda hücre çeşitliliği fazla olduğu için hücreleri soğuk hasardan korumada yetersiz bir yöntemdir (Lobo 2005, Wallace vd 2005)

Ovaryum dokusunun dondurulmasında kullanılan diğer bir yöntem vitrifikasyondur. Özel ve pahalı ekipman gerektirmeyen ve hızlı dondurmaya göre doku korunumu daha fazla olan vitrifikasyon yöntemi kolay ve tercih edilen bir yöntem olmuştur. Vitrifikasyon buz çekirdeklenmesi olmadan uygun kriyopektan kullanımı ve hızlı soğutma ile dokunun kristalsiz cam fazda dondurulması durumudur. Uygun solüsyonların uygun derişimlerde kullanılmasıyla moleküller kimyasal reaksiyona girmeyecek şekilde hareketsiz kalırlar.

Nasrabadi vd (2015) vitrifikasyon işlemi sırasında soğuk hasara karşı folikül kayıplarını en aza indirebilmek farklı kriyopektan derişimleri kullanarak uyguladığı protokoller sonucunda tek kriyopektan kullanımına göre çift kriyopektan kullanımın oosit dokusundaki zararı en aza indirdiğini göstermiştir.

Erdemli vd (2011) yaptığı çalışmada yavaş dondurmanın dokuyu daha iyi koruduğu ancak vitrifikasyon işleminin daha kolay ve ucuz olmasıyla folikül grubunun korunmasında avantaj sağlayabileceğini göstermişlerdir.

Tsai vd (2014) çalışmalarında SIP (Sphingosine-1-phosphate) koruyucu ajan kullanmışlardır. Vitrifikasyon işlemi sonrasında transplante edilen ovaryum dokusunda doku korunumunun daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir.

Suzuki vd (2015) e göre Primer over yetmezliği olan hastaların infertilite tedavisi için inaktif foliküllerin in vitro aktivasyonu sonrasında vitrifikasyon kullanılarak over dokusunun dondurularak saklanması potansiyel bir infertilite çalışmasıdır.

Ovaryum doku kriyoprezervasyonu, fertilitenin korunması için umut vaat eden bir yöntemdir. Vitrifikasyon işleminin uygulanmış ve transplante edilmiş ovaryum dokusundan spontan gebelik bildirilmesine rağmen, tekniğin hala deneysel olduğu düşünölmektedir. Kanıtlar transplantasyon lehinde olmasına rağmen, gebeliğin kaynağının transplante edilen ovaryum dokusu mu yoksa düzelen menapozal ovaryum mu henüz açıklığa kavuşmuş değildir (Prasath ve Çelik 2016).

Bütün bu çalışmalara rağmen ovaryumda folikül kaybı vitrifikasyon sırasında da görölebilmektedir. Aslında tüm laboratuvar prosedürleri insan gamet ve embriyoların hasar görebileceği in vitro ortamlardır. Ancak ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonu iki cerrahi işlem gerektirir. Güvenirlik, etkinlik ve sonuçlar ile ilgili veriler yetersizdir Folikülogenez ve primordiyal folikül aktivasyonunda rol alan aktivatör ve baskılayıcı faktörlerin dengeli bir şekilde çalıştıkları bilinmektedir. Bu baskılayıcı ve aktivatörlerin dengesinin bozulması durumunda, foliküllerin kitlesel aktivasyonu nedeniyle dondurulan dokuların tekrar çözdürölmesinden vücuda nakledilmesine kadar geçen süreçte ortaya çıkan hasar mekanizmaları olduğu düşünölmektedir (Rodriguez vd 2012).

Çalışmaların çoğunda ovaryan foliküllerinin kayıp sebepleri arasında apoptoz olduğu gösterilmiş ve bunu önlemeye yönelik işlem sırasında antiapoptotik ajanlar kullanılmıştır. Bütün bu önlemlere rağmen folikül kayıplarının sadece bir kısmı azaltılabilmektedir. Foliküler atrezi ilk olarak granüloza hücrelerinde başlar sonra teka hücrelerine geçer. Granüloza tabakasındaki hücre kayıplarının yaygınlaşması folikül ölümünü tetikler. Yapılan çalışmalar oosit kaybının yalnızca primordiyal ve primer foliküllerdeki dejenerasyon nedeniyle olduğunu göstermektedir. Apoptozis granüloza hücre kaybından başlıca sorumlu hücre ölüm yolağıdır (Hulas vd 2011). Kaspaz ailesi, BCL ailesi ve gonadotropinler apoptozis ile ilişkili faktörlerdir (Lin vd 2012, Abdi vd 2014, Zang vd 2015). Ovaryumdaki diğer hücre ölüm yolağı otofajidir. Otofajide sitoplazmik organeller otofagozom denilen membranla çevrelenerek otofagozomları oluştururlar. Otofagozom lizozomla birleşerek otofagolizozomların oluşumuna neden olur. Son çalışmalar otofajinin foliküllerde atreziye ve lutealizise neden olduğu gösterilmiştir (Lin vd 2012, Choi vd 2014, Lim vd 2015).

Karadağ (2016) yaptığı araştırmada hücre içi yıkım ve geri dönüşüm mekanizması olan otofajinin bazı koşullarda hücre ölümüne neden olduğu ancak

otofajinin ilaçlarla genetik olarak bloke edildiğinde hücrenin yaşama şansının artacağına dikkat çekmiştir. Otofajik hücre ölüm mekanizmasının hücre ölüm yollarının aydınlatılması ile insan sağlığını tehdit eden durumlarda yeni tedavi yöntemleri geliştirilebileceğini savunmuştur.

Oositlerin gelişip olgunlaşması için gerekli olan birçok sayıda intrasellüler ve endokrin sinyal moleküllerinden biri Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) proteindir. mTOR, P13K/Akt/mTOR üyesi olup yaşamın sürmesinde, büyümede, büyük makro moleküllerin sentezi gibi hücresel olaylarda ve otofajide rol oynar. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda mTOR inhibitörleri kullanılarak mTOR'un ovaryumdaki işlevleri açığa çıkarılmıştır. Sentetik mTOR inhibitörleri kullanıldığında sağlıklı farelerin granüloza hücrelerinde çoğalmanın baskılandığı görülmüştür. Aynı zamanda FSH aktivitesinin de etkilendiği görülmüştür (Yaba 2008, Sirotkin 2016). mTOR aktivitesi otofajiyi baskılamakta inhibe edilmesi otofajinin aktive olmasına neden olur. Besin yetersizliği hormonal uyarımlar mTOR aktivitesinde rol oynarlar (Lee 2017).

Çelik (2016) yaptıkları çalışmada 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 araştırdılar. Sonuç olarak bu baskılayıcı moleküllerin kriyoprezervasyondan bağımsız olarak transplantasyondan sonra ekspresyon olmadıklarını gösterdi. TSC1, mTOR aktivitesinin en önemli düzenleyicilerinden biridir. PTEN, PI3K/AKT/mTOR yoluyla ters yönde çalışır. Ekspresyon olmaması veya azalması sonucu primordiyal folikül havuzunu koruyan mekanizma veya mekanizmaların dengesini bozuluyor olabileceğini belirtmişlerdir.

Choi vd. 2010 ve 2011 yıllarında yaptıkları çalışmalarda otofajinin granüloza hücrelerinde olduğunu ve apoptozisi ilettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlardan otofajinin folikülogenezis sırasında granüloza hücre ölümüyle direkt ilgili olduğunu iddia etmişlerdir. Bununla birlikte foliküler atrezi tam olarak anlaşılmalıdır.

Yang vd (2016) ovaryum dokusuna uygulanan vitrifikasyon ve ootransplantasyon işlemi sırasında otofajinin önemine dikkat çekmiştir. Vitrifikasyon işlemi sırasında oluşan soğuk hasar sonrasında ovaryum dokusunda homeostazinin sağlanmasında, folikül atrezisi sonucunda oluşan folikül kayıplarında, ovarian greftleme sırasında iskemi sonucunda oluşan folikül rezervinin azalmasında ve anjiyogenesiste otofajinin aktif olabileceğini öne sürmüştür.

Yaba vd (2016) yaptıkları bir çalışmada mTOR ve PmTOR ekspresyonunu araştırmışlar ve mTOR ekspresyonunu nükleustan daha çok sitoplazmada daha fazla olduğunu ve sitoplazmik mTOR ekspresyonunun gelişimin bütün aşamalarındaki foliküllerde granüloza hücrelerinde, teka hücrelerinde, over yüzey epiteli ve stromasında olduğunu göstermişlerdir. PmTor ekspresyonu ise uygun beslenme koşulları altında aynı dağılımı olduğunu ancak kütlece daha az bulunduğunu göstermişlerdir. Mitotik granüloza hücrelerinde daha çok görmüşlerdir. Çalışmamızın verileri de bu durumu destekler.

Genellikle PmTOR ekspresyonu kanserli dokularda incelenmiştir. Normal dokulardaki ekspresyonu ve dağılımını ilk olarak 2013 yılında Kogasaka vd (2013) incelemişlerdir. Kogasaka ve arkadaşları in vitro olarak ve in vivo olarak oosit gelişiminde ve folikül gelişiminde PmTOR (pSer2448) ve p2481mTOR ekspresyonunu araştırmışlardır. Bu çalışmada oositlerde ve kumulus hücrelerinde pSer2448mTOR veya pSer2481mTOR ekspresyonu interfaz safhasında sitoplazmada yaygın, profazda kromozomların etrafında, metafazda ve telofazda iğ iplikçiklerin etrafında eksprese olduğu bulunmuştur. Mayoz esnasındaki kumulus hücrelerin proliferatif etkisinin oositlerin daha ileri aşamalara gidebilen kaliteli oosit oluşumunda esas olarak bildirilmektedir (Byskov vd 1995, Brunet vd 1999).

Ovaryum dokusunun dondurulması son dönemlerde önem kazanmıştır. Özellikle genç kanser hastalarında bu teknik fertilitenin korunmasında umut ışığıdır. Dondurulan ovaryumlarda folikül kaybının en aza indirilmesi tekniğin klinikte kullanım alanlarını artıracaktır. (Solemani vd 2001, Carvolha vd 2014, Lee vd. 2014, Lee vd, 2015).

Bu çalışmada hücre çoğalmasında ve farklanmasında ve aynı zamanda otofajinin tetiklenmesinde etkili olan mTOR ve fosforlanmış hali PmTOR proteinleri kontrol ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş ovaryum dokusunda incelenmiştir. Hem kontrol hem de vitrifiye ovaryumda pimordial, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerde hem granüloza hücre sitoplazmasında hem de oositlerde aynı zamanda korpus luteumda mTOR'un kuvvetli eksprese olduğunu gördük. Oositteki ekspresyon granüloza hücrelerinden daha kuvvetliydi. Reaksiyonun derecesi ve yerleşimi kontrol ve vitrifikasyon işleminin uygulandığı ovaryum dokularında aynı idi. Vitrifikasyon yapılmış ovaryum dokusunda mTOR aktivitesinin kontrolle benzer olması vitrifikasyon yönteminin otofajiyi indüklediğini düşündürmektedir.

PmTOR ekspresyonu ise her iki grupta farklılık gösteriyordu. Kontrol grubunda oositlerde ve granüloza hücrelerinde pozitif ekspresyon izlenirken vitrifikasyon

işleminin uygulandığı grupta hem oositler hem de granüloza hücreleri negatifti. Kontrol grubunda ise PmTOR ekspresyonu oositlerde orta derecede granüloza hücrelerinde ise zayıf olarak reaksiyon gösterdi. Bölünen hücrelerde pSer2448(PmTOR) veya pSer2481(PmTOR) intrinsik mTOR katalitik aktivite belirteçidir. Biz çalışmamızda mTOR için pser2481 belirtecini kullandık. Araştırmacılar mTOR'un sitokinezisde işlevi olabileceğini ve özellikle kumulus hücrelerindeki PmTOR aktivitesinin mayozu indükleyen ürünlerin üretilmesinde ve salgılanmasında rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (Kogasaka vd 2013). Yani PmTOR yüksek kalitede oosit oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Bizim çalışmamızda PmTOR sadece kontrol grubunda pozitif eksprese olmuştu. Vitrifikasyon işleminin uygulandığı oositlerde negatif olması oositlerin kalitesinin düştüğünün bir göstergesi olabilir.

6. SONUÇ

Özellikle primer foliküllerden itibaren sekonder, tersiyer folikül sayıları vitrifikasyon grubunda biraz daha düşük, atretik folikül ise daha yüksek olmasına rağmen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hematoksilen ve eozinle boyalı kesitlerde vitrifikasyon işleminin uygulandığı ovaryum dokusunda dejeneratif foliküller daha fazla görünmesine karşın kesitlerin çoğunda ovaryum dokusunun her iki grupta normal görünümde olduğu izlendi.

Kontrol ve vitrifikasyon işleminin uygulandığı ovaryum dokusunda mTOR proteinin ekspresyon derecesi ve yerleşimi her iki grupta da benzerdi. MTOR'un pozitif eksprese olması otofajinin inhibe olmasına negatif ekspresyonu ise otofajinin aktiflenmesine neden olmaktadır. MTOR'un her iki grupta da pozitif olmasının vitrifikasyon işleminin ovaryumda otofajiyi indüklediğini göstermektedir. Bununla birlikte PmTOR pozitif ekspresyonunun vitrifikasyon ovaryumlarında olmaması PmTOR'un literatür bilgisine göre oosit kalitesiyle ilgili olduğu düşünülürse vitrifikasyonun oosit kalitesini bozduğunu ve fertilizasyon kapasitesini azaltabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

Abdi S, Salehnia M, Hosseinkhani S. Evaluation of apoptosis in long term culture of vitrified mouse whole ovaries. **Res Vet Sci** 2014; 96:1–4.

Abdi S, Salehnia M, Hosseinkhani S. Kit ligand decreases the incidence of apoptosis in cultured vitrified whole mouse ovaries. **Reprod Biomed Online** 2015; 30: 493–503.

Anding AI, Baehrecke, EH. Autophagy in cell life and cell death. Apoptosis and development. **Dev Biol** 2015;114: 67–91.

Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning house: Selective autophagy of organelles. **Dev Cell.** 2017;41(1): 10-22.

Akıncı A, Vardı N. Genital sistemin gelişiminde genler ve cinsiyet bozukluk durumları. 2005; 316:1-16.

Arslan D, Korkmaz G, Gözüaçık D. Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. **Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.** 2011; 2(4): 184-194.

Brunet S, Maria AS, Guillaud P, Dujardin D, Kubiak JZ, Maro B.. Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic M phase. **J Cell Biol.** 1999;146:1–12.

Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thogersen H, Xia G, Wassmann O, Andersen JV, Guddal E, Roed T. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. **Nature** 1995;374: 559–562

Caldwell A:S:L, Middleton L.J, Jimenez M, Desai R, McMahon A:C, Allon C:M, Handelsman D:J, Walters K:A. Characterization of reproductive, metabolic and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. **Endocrinology** 2014;155:3146-3159

Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, Castro SV, Lobo CH, Santos FW, Santos RR, Campello CC, Bordignon V, Figueiredo JR, Rodrigues AP. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Res Vet Sci** 2014; 97: 140–147

Cıncık M. Sperm kriyoprezervasyonu. **Gülhane Tıp Dergisi.** 2003; 45(1): 100-106.

Choi J, Lee JY, Lee E, Yoon BK, Bae D, Choi D. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. **Cryobiology.** 2007;54(1):55–62.

Choi J, Jo M, Lee E, Choi D. AKT is involved in granulosa cell autophagy regulation via mTOR signaling during rat follicular development and atresia. **Reproduction.** 2013; 147(1): 73-80.

Choi KM, Nam HY, Na JH, Kim SW, Kim SY, Kim K, Kwon IC, Ahn HJ. A. Monitoring method for Atg4 activation in living cells using peptide-conjugated polymeric nanoparticles. **Autophagy**. 2011; 7(9): 1052-62.

Choi CH, Jung YK, Oh SH. Selective induction of catalase-mediated autophagy by dihydrocapsaicin in lung cell lines. **Free Radic Biol Med**. 2010; 49(2): 245-57.

Çelik S. Ovaryum kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında folikül kaybı mekanizmalarında rol alan baskılayıcı moleküllerin araştırılması. Yüksek lisans tezi, **Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Antalya, 2016 (s.68)

Delilbası L. İn Vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri, Birinci Basım, **Günes Tıp Kitabevleri**, 2008, s.229-255.

Durmaz A. Laboratuvar başarısında kriyoprezervasyonun rolü. **Ege üniversitesi Aile Planlaması İnfertilite Araştırma ve Uygulama Merkezi**. 2013.

Erdemli AE, Topal F, Özkavukçu S, Kılıçoğlu S, Balcı D. Ovaryum dokusunun, vitrifikasyon ve yavaş soğutma teknikleriyle korunurluğunun histopatolojik yönden karşılaştırılması. **Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri**. 2011.

Gosden RG, and Nagano M. Preservation of fertility in nature and ART. **Reproduction**. 2002;123:3-11.

Gözüacık, D. Kimchi, Autophagy and cell death. **Curr Top Dev Biol**. 2007; 78: 217-45.

Hemadi M, Abolhassani F, Akbari M, Sobhani A, Pasbakhsh P, Ahrlund-Richter L, Modaresi MH, Salehnia M. Melatonin promotes the cumulus oocyte complexes quality of vitrified-thawed murine ovaries; with increased mean number of follicles survival and ovary size follicle owing heterotopic transplantation. **Eur J Pharmacol**. 2009; 618: 84-90.

Hułas-S M, Gawron A. Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (Acomys cahirinus) ovary. **Apoptosis** 2011;16: 967–975.

In vivo research center. İnternet adresi: <https://www.invivogen.com/autophagy-inducers>. (Güncellenme tarihi: Erişim tarihi:28.09.2018)

Jee BC, Lee JR, Youm H, Suh CS, Kim SH, Moon SY. Effect of sphingosine-1-phosphate supplementation on follicular integrity of vitrified-warmed mouse ovarian grafts. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. 2010; 152:176–180.

Juhasz G, Neufeld TP. Experimental control and characterization of autophagy in Drosophila. **Methods Mol Biol**. 2008; 445: 125-33

Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. **J Cell Biol**. 2000; 150: 1507-13.

Karadağ A. Otofaji: programlı hücre ölümü. **Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi**. 2016;2(15):19-26.

Küçük H. Prematür over yetmezliği olgularında genomik kopya sayısı değişikliklerinin array CGH yöntemi ile değerlendirilmesi. Doktora tezi. **Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Eskişehir. 2015, (s.111)

- Küçüköner M, Işıkdöğün A. Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolağı mTOR inhibitörleri. **Dicle tıp dergisi**. 2013;40 (1):156-160
- Klinger FG, Rossi V, De Felici M. Multifaceted programmed cell death in the mammalian fetal ovary. **Int J Dev Biol** 2015; 59: 51–54.
- Kogasaka Y, Hoshino Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sato E. Distribution and association of mTOR with its cofactors, raptor and rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice. **Mol Reprod Dev**. 2013; 80(4): 334-48
- Lee H. Phosphorylated mTOR expression profiles in human normal and carcinoma tissues. **Dis Markers**. 2017.
- Lee H.S. Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. **Anim Reprod Sci**, 2008. 103(3-4)
- Lee J, Lee JR, Youm HW, Suh CS, Kim SH. Effect of preoperative simvastatin treatment on transplantation of cryopreserved-warmed mouse ovarian tissue quality. **Theriogenology** 2015;83: 285–293.
- Lee JR, Youm HW, Kim SK, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Effect of necrostatin on mouse ovarian cryopreservation and transplantation. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2014; 178: 16–20
- Levine, B. Yuan, J. Autophagy in cell death: a innocent convict? **The Journal Of Clinical Investigation**. 2005; 115: 2679- 2688.
- Lin P, Yang Y, Li X, Chen F, Cui C, Hu L, Li Q, Liu W, Jin Y. Endoplasmic reticulum stress is involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in goat ovaries. **Mol Reprod Dev** 2012; 79: 423–432.
- Lim HJ, Song H. Evolving tales of autophagy in early reproductive events. **Int J Dev Biol** 2014; 58: 183–187.
- Luster SM. Cryopreservation of bovine and caprine oocytes by vitrification. BS University of Illinois, Urbana- Champaign, Yüksek Lisans Tezi, 2004.
- Lobo RA. Potential options for presentatin of fertility in women. **N Engl J Med**. 2005; 353(1): 64-73
- Mahmoodi M, Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh SM, Eimani H, Shahverdi A. N-acetylcysteine improves function and follicular survival in mice ovarian grafts through inhibition of oxidative stress. **Reprod Biomed Online** 2015; 30: 101–110.
- Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophys**. 1990; 14: 53-92.
- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. **Cell Res** 2010;20: 748-762.
- Meléndez, A. Levine, B. Autophagy in C. Elegans. **Wormbook** 2009.
- Nasrabadi HT, Gavami M, Akbarzadeh A, Beheshti R, Mohammadnejad D, Abedelahi A. Preservation of mouse ovarian tissue follicle morphology and ultra- structure after vitrifying in biotechnological protocols. **J ovarian res**. 2015; 8: 7

Netter FH. İnsan anatomi atlası. Altıncı baskı. **Nobel Tıp Kitapevi**. 1989;340-350

Orisaka M, Tajima K, Mizutani T, Miyamoto K, Tsang BK, Fukuda S, Yoshida Y, Kodsuji F. Granuloza cell promote differantiation of cortical stromal cell into theca cells in the bovine ovary. **Biology reproduction**. 2006; 75: 734-740

Papinski D, Schuschnig M, Reiter W, Wilhelm L, Barnes CA, Maiolica A, Hansmannl, Pfaffenwimmer T, Kijanska M, Stoffel I, Lee SS, Brezovich A, Lou JH, Turk BE, Aebersold R, Ammerer G, Peter M, Kraft C. Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. **Mol Cell**. 2014;53(3): 471-83

Peterson JS, Timmons AK, Mondragon AA, McCall K. The end of the beginning: cell death in the germline. **Curr Top Dev Biol** 2015; 114: 93–119

Prasath EB. Ovarian tissue cryopreservation; *An update*. **J Hum Reprod Sci** 2008. 1(2)

Pryse DJ, Dewhurst CJ. The development of the ovary and uterus in the fetus, newborn and infant: a morphological and enzyme histochemical study. **J pathol**. 1971; 103: 5-25

Rodriguez-Wallberg, K.A. and K. Oktay, Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. **Best Pract Res Clin Obstet** 2012. 26(3): 391-405.

Sadler W D, Langman's medical embryology. **Palme yayıncılık**. 11th edition. 2011; 68-72.

Sağırkaya H, Bağış H. Memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu. **Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med**. 2003; 22: 127-135

Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the drosophila fat body. **Dev Cell**. 2004;7: 167-8

Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: adouble-edged sword. **Science** 2004; 306: 990-5.

Sirotkin A V, The role and ablication of sirtuins and mTOR signaling in the control of ovarian functions. **Cell** 2016; 5-42

Soleimani R, Heytens E, Oktay K. Enhancement of neoangiogenesis and foliküllicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissu xenotransplants. **PLoS One** 2011; 6

Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y, and Kawamura K. Successful fertility preservation foliküllowing ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Hum Reprod**. 2015; 30(3): 608–615

Şaylan A. Kadın gamet hücrelerinde vitrifikasyon araştırması. Yüksek Lisans Tezi **Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi**.2011. s.130

Tsai YC, Tzeng CR, Wang CW, Hsu MI, Tan SJ, Chen CH. Antiapoptotic agent sphingosine-1-phosphate protects vitrified murine ovarian grafts. **Reprod Sci**. 2014; 21: 236–243

Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patient with cancer: who at risk and what can be offered **Lancet Oncol.**2005;353(1):63-75

Wear HM, Matthew JM, Watanabe KH. From primordial germ cell to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. **J Ovarian Res.** 2016; 9: 36

Xiao G. Autophagy and NF-kappaB: fight for fate. Cytokine growth factor **Rev.**2007;18(3-4):233-43.

Xie Z, Klionsky, DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptation. **Nat Cell Biol.** 2007;9; 1102-9.

Yaba A, Bianchi V, Borini A, Johnson J. Aputati and mitoti check point dependent on mTOR function controls cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells. **Reprod Sci** 2008; 15(2): 128-138

Yang Y, Cheung HH, Law WN, Zhang C, Chan WY, Pei X, Wang Y. New insight into the role of autophagy in ovarian cryopreservation by vitrification. **Biol reprod.** 2016; 94(6): 137 1-6

Yang Y, Lin P, Chen F, Wang A, Lan X, Song Y, Jin Y. Luman recruiting factor regulates endoplasmic reticulum stress in mouse ovarian granulosa cell apoptosis. **Theriogenology** 2013; 79: 633–639.

Zhang X, Zhang H, Gao Q, Ji S, Bing L, Hao J. Sohlh2 inhibits the apoptosis of mouse primordial follicle oocytes via C-kit/PI3K/Akt/Foxo3a signalling pathway. **Reprod Biomed Online** 2015;30: 514–521.

8. ÖZGEÇMİŞ

Ümray Toprak 9 Ekim 1981'de Denizli'de doğmuştur. İlköğretimini Manisa Sarıgöl ilçesinde 4 Eylül İlköğretim Okulunda tamamlayıp Sarıgöl Sağlık Meslek Lisesi'nde öğrenimine devam etmiştir. 2002 yılında devlet memurluğuna hemşire olarak ataması yapılmıştır. 2011 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Bölümünü tamamladıktan sonra 2015 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji (ing) bölümünden mezun olmuştur. 14 yıl hemşire kadrosunda çalıştıktan sonra 2016 yılında yapılan ünvan değişikliği sınavı ile Laboratuvar teknikeri olarak Denizli Devlet Hastanesine ataması yapılmıştır. 2016 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Bölümünde yüksek lisansa başlamıştır.