



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DENEYSEL OLARAK SİKLOFOSFAMİD İLE OVERYAN  
YETMEZLİK OLUŞTURAN SIÇANLARDA OVER DOKUSU  
KAYNAKLI STROMAL KÖK HÜCRELERİN OVARYUM  
DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ**

**Mehpare AKGÜN**

**HAZİRAN 2022  
DENİZLİ**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OLARAK SİKLOFOSFAMİD İLE OVERYAN YETMEZLİK  
OLUŞTURAN SIÇANLARDA OVER DOKUSU KAYNAKLI STROMAL  
KÖK HÜCRELERİN OVARYUM DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİMDALİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mehpare AKGÜN**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL**

**Denizli, 2022**

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: Mehpere AKGÜN

İmza:

## ÖZET

# DENEYSEL OLARAK SİKLOFOSFAMİD İLE OVERYAN YETMEZLİK OLUŞTURAN SIÇANLARDA OVER DOKUSU KAYNAKLI STROMAL KÖK HÜCRELERİN OVARYUM DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ

Mehpare AKGÜN

Yüksek Lisans Tezi Histoloji ve Embriyoloji AD

Tez Yöneticisi: Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL

Haziran 2022, 62 Sayfa

Birçok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve bir alkilleyici ajan olan siklofosfamid, kemoterapotikler içinde over üzerinde en fazla toksisiteye sahip olanıdır. Kemoterapinin en sık görülen ovaryum komplikasyonları azalmış overyan rezerv ve prematür overyan yetmezliktir. Daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler overyan yetmezlik oluşturulan hayvanlara verilmiş ve overlerde folikülogenezin tekrar başladığı görülmüştür. Çalışmamızın amacı, siklofosfamidin ovaryum dokusundaki toksik etkilerinin overyan stromal kök hücre tedavisi ile en aza indirilmesini sağlamaktır.

Bu çalışmada, toplam 20 adet, 8 haftalık, 150±15 gram ağırlığında Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (n=6) Kemoterapi grubu (n=6), Kök Hücre Grubu (n=6) olarak 3 grup oluşturuldu. Kemoterapi grubu ve Kök hücre grubuna PBS ile çözülmüş 200mg/kg siklofosfamid 1. ve 8. günde intraperitoneal olarak uygulandı. Daha sonra sadece Kök hücre grubuna siklofosfamid enjeksiyonunun son gününden bir gün sonra yani 9. gün over dokusundan elde ettiğimiz stromal kök hücreleri (Her bir overe 500.000 stromal kök hücreyi 0.01ml PBS içerisinde) cerrahi yöntemle direkt sıçanların her iki ovaryumuna enjekte edildi. Kök hücre enjeksiyonundan 2 hafta sonra tüm sıçanların ovaryumları çıkarılarak rutin ışık mikroskop takibi yapıldı. Parafin bloklardan 5 µm luk kesitler alınarak hematoksilin&eozin ile boyandı. Kesitler ışık mikroskopunda histopatolojik olarak incelenmiştir. 1. 5. ve 10. kesitlerde primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin sayımı yapılmıştır. TUNEL analizi ve kaspas 3 aktivitesi immünohistokimika (IHK) yöntemi ile değerlendirildi.

In the chemotherapy group, there was a general decrease in the number of follicles and an increase in the number of atretic follicles. In the chemotherapy and stem cell group, it was observed that stem cells reduced the damage in the ovary and were effective in preserving the follicle reserve.

Siklofosfomid ovaryumda hasara neden olmaktadır. Kök hücre uygulaması ise bu hasarı azaltmaktadır. Kök hücre uygulaması primordial follikül havuzu negatif etkilemekle birlikte ovulasyona giden sağlıklı antral follikül sayısını arttırmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Ovaryum, Siklofosfamid, Prematür Overyan Yetmezlik, Overyan Stromal Kök Hücreler

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2020SABE034)**

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF STROMAL STEM CELLS FROM OVER TISSUE ON OVARIUM TISSUE IN RATS WITH EXPERIMENTALLY CICLOPHOSPHAMID AND OVARIAN FAILURE

AKGÜN, Mehpare

M.Sc Thesis in Histology and Embryology AD

Supervisor: Dr. Lecturer Murat Serkant ÜNAL

June 2022, 62 Pages

Cyclophosphamide, which is an alkylating agent and widely used in the treatment of many cancers, has the most toxicity on the ovary among the chemotherapeutics. The most common ovarian complications of chemotherapy are decreased ovarian reserve and premature ovarian failure. In previous studies, mesenchymal stem cells obtained from various sources were given to animals with ovarian failure and it was observed that folliculogenesis started again in the ovaries. The aim of our study is to minimize the toxic effects of cyclophosphamide on ovarian tissue with ovarian stromal stem cell therapy.

A total of 20 Wistar Albino female rats, 8 weeks old, weighing  $150 \pm 15$  grams, were used in this study. Rats were randomly selected and divided into 3 groups. Three groups were formed as control group (n=6) Chemotherapy group (n=6) and Stem Cell Group (n=6). 200mg/kg cyclophosphamide dissolved with PBS was administered intraperitoneally on the 1st and 8th days to the chemotherapy group and stem cell group. Then, one day after the last day of the cyclophosphamide injection only to the Stem cell group, i.e. on the 9th day, the stromal stem cells we obtained from the ovarian tissue (500,000 stromal stem cells for each ovary in 0.01ml PBS) were surgically injected directly into both ovaries of the rats. 2 weeks after the stem cell injection, the ovaries of all rats were removed and routine light microscope monitoring was performed. Sections of 5  $\mu$ m were taken from paraffin blocks and stained with hematoxylin & eosin. Sections were examined histopathologically under the light microscope. Primordial, primary, secondary and tertiary follicles were counted in the 1st, 5th and 10th sections. TUNEL analysis and caspase 3 activity were evaluated by immunohistochemistry (IHC).

The ovaries in the control group had normal histological appearance. In the chemotherapy group, there was a general decrease in the number of follicles and an increase in the number of atretic follicles. In the chemotherapy and stem cell group, it was thought that stem cells could reduce the damage in the ovary and be effective in preserving the follicle reserve.

Cyclophosphamide causes damage to the ovary. Stem cell application reduces this damage. Although stem cell application negatively affects the primordial follicle pool, it increases the number of healthy antral follicles leading to ovulation.

**Key Words:** Ovary, Cyclophosphamide, Premature Ovarian Insufficiency, Ovarian Stromal Stem Cells

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2020SABE034**

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım başta tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL'a

Bu tez çalışmamda tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan, deneylerin yürütülmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Gülçin METE ve Doç. Dr. Nazlı ÇİL'e

Tez çalışmam sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve kritik yorumlarını paylaşan hocalarım Uz. Dr. Elif Önder ve Araştırma Görevlisi Semih Tan'a, Yüksek Lisans Öğrencisi Dilek MEYDAN'a, tez çalışmalarım sırasında deneylerin yapılmasında laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hocalarıma,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....</b>	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ.....</b>	<b>viii</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1.Çalışmanın Amacı.....	2
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI .....</b>	<b>3</b>
2.1. Ovaryum.....	3
2.1.1. Ovaryumun Gelişimi ve Histolojisi .....	3
2.1.2. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi .....	4
2.1.2.1. Primordiyal Folikül .....	4
2.1.2.2. Büyümekte Olan Foliküller.....	5
2.1.2.2.1. Primer Foliküller.....	5
2.1.2.2.2.Sekonder Foliküller .....	6
2.1.2.3.Olgun (Graaf) Folikül .....	7
2.1.3. Ovulasyon.....	8
2.1.4. Korpus Luteum .....	9
2.1.5. Menstrual Döngü .....	9
2.1.6. Over Rezervi .....	9

2.2.	Kemoterapi ve Radyoterapinin Gonadal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi .....	10
2.3.	Premature Ovaryan Yetmezlik (POY) .....	10
2.4.	Fertilite Koruyucu Yöntemler .....	11
2.4.1.	Kök Hücre Tedavisi .....	11
2.4.2.	Kök Hücrelerin Genel Özellikleri .....	11
2.4.2.1.	Farklanma (Plastite): .....	12
2.4.2.3.	Kendini Yenileme (Self Renewal): .....	13
2.4.2.4.	Köklülük (Stemness) .....	14
2.4.3.	Kök Hücrelerin Karakterizasyonu: .....	14
2.4.4.	Kök Hücre Çeşitleri ve Kaynakları .....	14
2.4.4.1.	Mezenkimal Kök Hücreler .....	15
2.5.	Hipotez .....	15
<b>3.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>16</b>
3.1.	Overyan Stromal Kök Hücre Eldesi .....	16
3.2.	Sıçanlarda Siklofosfamidle Deneysel Prematür Overyan Yetmezlik Oluşturulması ve Stromal Kök Hücrelerin Sıçan Ovaryumlarına Enjeksiyonu .....	17
3.3.	Deneyin Sonlandırılması .....	18
3.4.	Doku Takip Yöntemi .....	18
3.5.	Hematoksiklen-Eozin Boyama Protokolü: .....	19
3.6.	TUNEL Yöntemi .....	20
3.7.	Kaspaz-3 İmmünohistokimya Protokolü .....	21
3.8.	Folikül Sayımı Yöntemi .....	22
3.7.	İstatistiksel Analiz .....	22
<b>4.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>23</b>
4.1.	Elde Edilen Overyan Stromal Kök Hücreler ve Flow Sitometri Sonuçları .....	23
4.2.	Vücut Ağırlığının Değerlendirilmesi .....	26
4.3.	Hematoksilen-Eosin Boyanma Sonuçları .....	26
4.4.	İmmünohistokimyasal Bulgular .....	31
4.4.1.	TUNEL Bulguları .....	32
4.4.2.	Caspaz-3 Bulguları .....	35
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ .....</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>42</b>
<b>8.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>46</b>



<b>9. EKLER .....</b>	<b>47</b>
Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu.....	<b>47</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Primordiyal folikül. ....	4
<b>Şekil 2.</b> Primer folikül.....	6
<b>Şekil 3.</b> Sekonder follikül. ....	7
<b>Şekil 4.</b> Graaf follikül.....	8
<b>Şekil 5.</b> Kontrol grubu, Kemoterapi grubu Kök hücre Grubu .....	16
<b>Şekil 6.</b> Stromal kök hücrelerin ovaryum içine enjeksiyonu. ....	18
<b>Şekil 7.</b> Overyan stromal kök hücrelerin (P2) morfolojik görünümü. ....	23
<b>Şekil 8.</b> Stromal kök hücrelerimizin 3. gündeki görüntüsü. ....	24
<b>Şekil 9.</b> Stromal kök hücrelerimizin 5. gündeki görüntüsü. ....	24
<b>Şekil 10.</b> Stromal kök hücrelerimizin 9. gündeki görüntüsü. ....	25
<b>Şekil 11.</b> Flow sitometri analizinde, hücrelerin stromal kök hücre belirteçleri olan CD54 ve CD90 nı eksprese ettiği, CD 29'u eksprese etmediği; hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45'i ise eksprese ettiği tespit edildi. ....	25
<b>Şekil 12.</b> Deneklerin deney öncesi ve sonrası ağırlıkları.....	26
<b>Şekil 13.</b> a.Kontrol grubu genel görüntüsü b.Kemoterapi grubu genel görüntüsü c. Kök hücre grubu genel görüntüsü. ....	28
<b>Şekil 14.</b> d.Kontrol grubu yüzey epiteli e.Kemoterapi grubu yüzey epiteli f.Kök hücre grubu yüzey epiteli. ....	28
<b>Şekil 15.</b> g.Kontrol grubu primordiyal follikül h.Kemoterapi grubu primordiyal follikül ı. Kök hücre grubu primordiyal follikül. ....	28
<b>Şekil 16.</b> i.Kontrol grubu primer follikül j.Kemoterapi grubu primer follikül k.Kök hücre grubu primer follikül. ....	29
<b>Şekil 17.</b> l.Kontrol grubu sekonder follikül m.Kemoterapi grubu sekonder follikül n.Kök hücre grubu sekonder follikül. ....	29
<b>Şekil 18.</b> o. Kontrol grubu graaf follikül p.Kemoterapi grubu graaf follikül r.Kök hücre grubu graaf follikül.....	29
<b>Şekil 19.</b> H&E ile boyanan ovaryum foliküllerinin sayıları. ....	30
<b>Şekil 20.</b> TUNEL sonucu ovaryum Aİ sayıları. ....	33
<b>Şekil 21.</b> a,b,c sırasıyla kontrol grubu sekonder follikül, kemoterapi grubu sekonder follikül, kök hücre grubu sekonder follikül. ....	34
<b>Şekil 22.</b> d,e,f, sırasıyla kontrol grubu graaf follikül, kemoterapi grubu graaf follikül, kök hücre grubu graaf follikül.....	34
<b>Şekil 23.</b> a,b,c sırasıyla kontrol grubu genel görüntü, kemoterapi grubu genel görüntü, kök hücre grubu genel görüntüsü. ....	35
<b>Şekil 24.</b> d,e,f,sırasıyla kontrol grubu yüzey epiteli görüntüsü, kemoterapi grubu yüzey epiteli görüntüsü, kök hücre grubu yüzey epiteli görüntüsü. ....	35

- Şekil 25.** g,h,ı sırasıyla kontrol grubu sekonder follikül görüntüsü, kemoterapi grubu sekonder follikül görüntüsü, kök hücre grubu sekonder follikül görüntüsü..... 35
- Şekil 26.** j,k,l, sırasıyla kontrol grubu graaf folikülü görüntüsü, kemoterapi grubu graaf folikülü görüntüsü, kök hücre grubu graaf folikülü görüntüsü..... 35

**TABLULAR DİZİNİ**

<b>Tablo 1.</b> Kökenlerine, farklanma etkinliklerine göre kök hücre türleri (Can A 2009). ....	12
<b>Tablo 2.</b> Kök hücrelerin farklanma yetkinliği (Can A 2009). .....	13

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

POY .....	Prematür Ovaryan Yetmezlik
IHK.....	İmmünohistokimyasal
Fsh .....	Folikül Uyarıcı Hormon
LH.....	Lüteinleştirici Hormon
GER.....	Granüler Endoplazmik Retikulumun
EGF.....	Epidermal Büyüme Faktörü
IGF-I .....	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I
OMI .....	Oosit Matürasyon İnhibitörü
GnRH .....	Gonadotropin Salıcı Hormonun
CTX .....	Siklofosamid
KH .....	Kök Hücre
K .....	Kontrol
PBS .....	Phosphate Buffered Saline
DMEM .....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS .....	Fetal Bovine Serum
Ort.....	Ortalama
SS .....	Standart Sapma
Aİ.....	Apoptotik İndeks
EKH .....	Embriyonik Kök Hücreler
YKH.....	Yetişkin Kök Hücreler

## 1. GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, adipoz doku, kıkırdak, amniyon sıvısı, plasenta, endometriyum gibi birçok dokudan izole edilmişlerdir. Mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif (yenileyici) ve reperatif (tamir edici) özellikleri vardır. Mezenkimal kök hücrelerin inflamasyonu ve fibrozisi azalttığı dokularda angiogeneze neden olduğu ve fokal doku hasarı tamir işleminde aktif role sahip olduğu gösterilmiştir. Bunu salgıladıkları çeşitli sitokin, kemokin, enzim, biyoaktif molekül ve ekstrasellülermatriks proteinleri ile başarırlar (Rastegar vd 2010).

Prematur overyan yetmezlik (POY) üreme çağındaki kadınlarda 40 yaşından önce amenore ve hipoöstrojenizm semptomları ile bulgu veren gonadotropin yüksekliği ( FSH, LH ) ve östrojen düşüklüğü ile karakterize bir tablodur. Kırk yaşın altında, dört aydan uzun süre amenoresi olan kadınlarda, en az bir ay ara ile bakılan iki FSH değerinin >40 IU/Le saptanması, prematür overyan yetmezliği düşündürür (Liu vd 2019).

Kemoterapinin over dokusu üzerindeki etkisi, azalmış overyan rezerv ve prematür overyan yetmezliktir. Overyan rezervin göstergesi primordiyal follikül sayısıdır. Primordiyal foliküller normalde dormant (inaktif,uykuda) haldedirler. Ergenlik dönemiyle birlikte her menstruel siklusta az sayıda primoriyal folikül aktiflenerek sırayla primer, sekonder ve son olarak tersiyer foliküle dönüşür. Siklofosfomid hem oositte hem de granüloza hücrelerinde hasara neden olarak folikül kaybına ve buna bağlı erken over yetmezliğine neden olmaktadır. Çalışmalarda alkilleyici kategorideki (örneğin siklofosfamid) kemoterapi ajanlarının over üzerinde en fazla toksisiteye sahip olduğunu gösterilmektedir (Mohamed SA vd 2018).

Siklofosfamid tedavisi, aktif olarak büyüyen folliküllerin apoptozunu indükler ve primordiyal folliküllerden primer foliküllere geçişi tetikler, bu da primordiyal follikül havuzunun yok olmasına neden olur (Kalich-Philosoph L vd 2013).

POY etyolojisinde genetik, otoimmün, metabolik, enfeksiyon ve iatrojenik (antikanser tedavileri) gibi birçok faktör rol oynamaktadır. Primordiyal folikülden primer foliküle geçişte, kontrollü aktive edici ve baskılayıcı rol oynayarak folikül havuzunun korunmasında rol alan sinyal yolları birbirinden bağımsız ancak dengeli bir şekilde çalışmalıdır.

Baskılayıcı ve aktivatör genlerin dengeli çalışmadığı durumlarda, klinikte prematür overyan yetmezlik olarak bilinen, foliküllerin kitlesel aktivasyonu ile folikül havuzunun yarısından fazlasının hatta daha büyük kısmının erkenden tükenmesine sebep olan senaryo ortaya çıkmaktadır.

Daha önceki çalışmalarda çeşitli kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler overyan yetmezlik oluşturulan hayvanlara verilmiş ve overlerde folikülogenezin tekrar başladığı görülmüştür. Yaptığımız çalışmada ise kemoterapik bir ajan olan siklofosfamidle oluşturulan ovaryum hasarınının onarılmasında, sıçanların ovaryum dokusundan elde ettiğimiz stromal kök hücreleri ovaryumdaki etkileri araştırıldı.

### **1.1.Çalışmanın Amacı**

Bizim bu çalışmadaki amacımız kemoterapik bir ajan olan siklofosfamidle ovaryumda oluşturulan doku hasarınının onarılmasında overyan stromal kök hücre tedavisinin etkinliğinin gösterilmesidir.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Ovaryum

Kadın üreme sistemi ovaryumları dışı iç üreme organları (ovaryumları, tuba uterina, uterus, vajina) ve dış genital yapıları (mons pubis, labiyum, mauslar, ve minuslar, klitoris, vestibül, vajina açıklığı, himen ve dış üretra) kapsar. Gelişmekte olan gametlere oosit, olgunlara ise ovum denmektedir. Oogenez (ovaryumlarda yumurta oluşması) ile oosit (yumurta) üretimi ve fertilizasyon (döllenme) sonucu implantasyon (yerleşme) ile doğuma kadar destek sağlayan bu sistemi hormonlar ve sinirler kontrol eder. Gametlerin ve steroid hormonların üretimini ovaryumlar sağlamaktadır. Ovaryumlar tarafından steroidlerin iki ana grubu olan progesteronlar ve östrojenler salgılanmaktadır. İç ve dış genital organların büyümesi ve olgunlaşmasından, puberte de dışı cinsiyet karakteristiklerinin gelişiminden, duktal ve stromal büyümeden ve meme gelişiminden östrojenler sorumludur. Meme bezlerinin laktasyon için hazırlanmasından ve iç genital organların özellikle de uterusun endometriyumda salgılama değişiklikleriyle gebelik için hazırlanmasından progesteron sorumludur. Aslında her iki hormonda menstrual siklusa önemli rol oynamaktadır.

Ovaryumlar, boyu yaklaşık 3 cm, eni 1,5 cm ve kalınlığı 1 cm olan yapılardır. Ovaryumu mezotelyum yerine germinal epitel kaplar. Germinal epitelin altında, ovaryumun beyazımsı rengini veren, sıkı bir bağ dokusu katmanı olan tunika albuginea vardır. Tunika albugineanın hemen altında oositleri içeren kortikal bölge (dış kısım) yer alır. Foliküller, stroma (kortikal bölgenin bağ dokusu) içinde gömülüdür. Bu stroma fibroblastlar içerir. Ovaryumun merkezi bölgesinde medullar bölge yer almaktadır. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır ile ayrılmamıştır (Mescher AL, 2015).

#### 2.1.1. Ovaryumun Gelişimi ve Histolojisi

Dışilerde üreme organları gelişirken üreme için gerekli yapı ve fonksiyonları oluşturan hücreler oluşmaktadır. Embriyonun birinci ayında primordiyal germ hücrelerinden oluşan hücre topluluğu vitellus kesesinden gonad taslağına göç eder. Gonadlara ulaşan bu hücreler bölünerek oogonyumlara dönüşür. Uterus içi yaşamın beşinci ayında 7 milyonun üzerinde oogonyum vardır. Üçüncü aydan itibaren oogonyumlar birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girmeye başlar. Diploten evresinde bölünme durarak mayoz bölünmenin diğer evrelerine ilerlemez. Primer (birinci) oositler olarak bilinen bu hücreler folikül hücreleri olarak adlandırılan yassı hücrelerle çevrilidir. Yedinci ay da ise oogonyumların birçoğu primer oositlere



dönüşmüştür. Primer oositlerin çoğu ise atrezi ile yok olur. Kadının 40-45 yaşlarında yaklaşık 8 bin oositi kalır. Ortalama 28 günde bir genellikle tek bir oosit serbest bırakılır ve bir kadın reproduktif yaşam boyunca yaklaşık 400 kadar sekonder oosit üretmiş olur. Geriye kalan oositler ise birkaç yıl içinde menopozla birlikte dejenere olur (Ross, 2011).

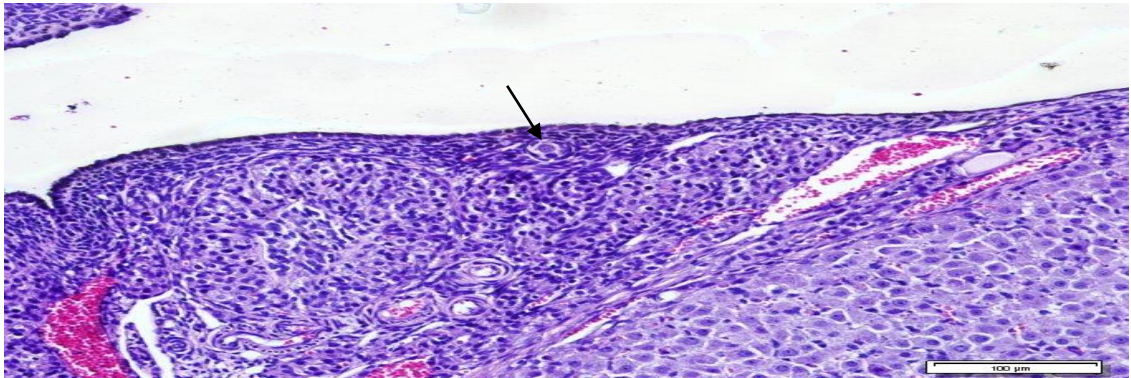
Oositler iri bir nükleolusa, veziküler bir nükleusa, opak ve granüler bir stoplazmaya, gri golgi kompleksine, çok sayıda mitokondri ve küçük veziküllere sahip hücrelerdir. (Song D vd 2016)

### 2.1.2. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi

Menstrualsiklus; folliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre olmak üzere 3 evreden oluşur. Ovaryum folikülleri gelişim aşamalarına göre primordiyal follikül, büyümekte olan follikül ve olgun ya da Graaf folliküldür (Kierszenbaum AL 2006)

#### 2.1.2.1. Primordiyal Folikül

Folikül gelişiminin ilk aşamasıdır. Fötal gelişimin 3. ayında ortaya çıkarlar. Primordiyal folliküller olgun bir ovaryumda korteks stromasında tunika albugineanın altında yer alırlar. Yassı folikül hücreleri (tek tabaka halinde) primer oositi çevrelerken, folikül hücrelerinin dış yüzü bazal lamina ile sınırlandırılmıştır. Primordiyal foliküller iyi dağılmış kromatin ve bir ya da daha fazla nükleolus içeren nükleusa sahiptir. Oosit sitoplazmasında ise Balbian cisimciği bulunmaktadır (Kierszenbaum, 2006, Ross 2011).



**Şekil 1.** Primordiyal folikül.

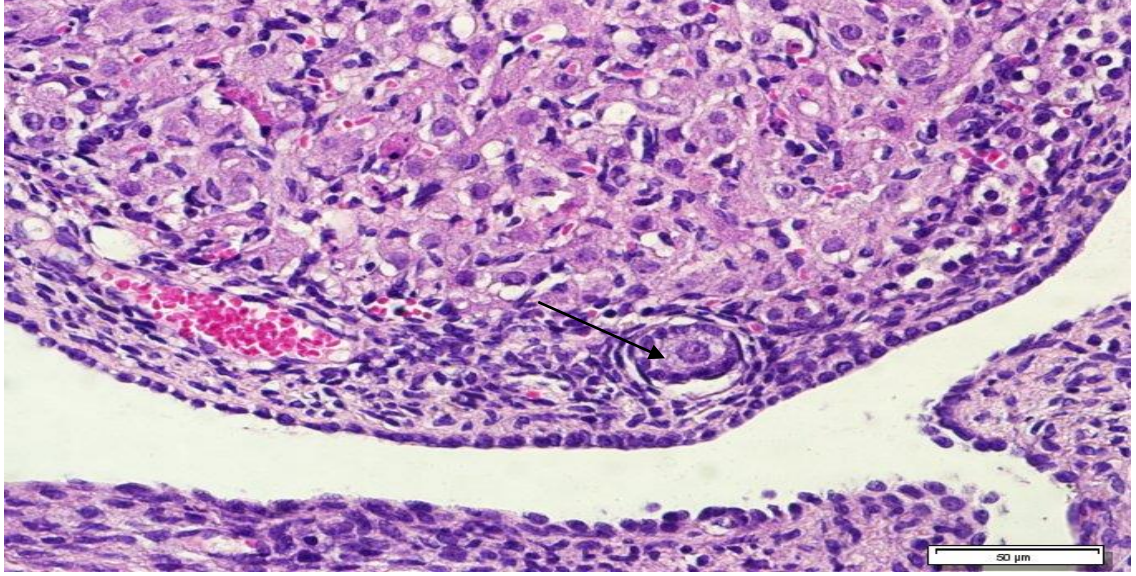
### **2.1.2.2. Büyümekte Olan Foliküller**

Primer ve sekonder (antral) foliküller olarak ikiye ayrılırlar (Kierszenbaum 2006, Ross 2011)

#### **2.1.2.2.1. Primer Foliküller**

Primordiyal follikül büyümekte olan folliküle dönüşürken oositte, follikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler meydana gelir. Follikül hücreleri FSH reseptörlerine puberteyle birlikte ön hipofizden salınan FSH'ın etkisiyle sahiptir. İlk olarak oosit büyür, çevresindeki yassı follikül hücreleri kübik hale gelirler. Bu follikül ise primer follikül olarak adlandırılır. Oositin büyümesiyle birlikte proteinler salgılanır, bu proteinlerin bir araya gelerek oosit ile follikül hücreleri arasında zona pellusida (ZP) oluşur. ZP oositi tek katlı kübik veya prizmatik follikül hücreleri çevrelediğinde görülebilir. Follikül hücrelerinin ZP'yi delerek oositin mikrovillusları ile temas halinde bulunan ince sitoplazmik uzantıları vardır (Kierszenbaum, 2006).

Tek tabakalı (unilaminar) primer folliküller ve çok tabakalı (multilaminar) primer folliküller olmak üzere iki tip primer follikül bulunmaktadır. Primer oosit tek sıralı kübik follikül hücreleri ile çevrili ise tek tabakalı, Primer oosit proliferasyon alan çok katlı kübik hücrelerle çevrili ise çok tabakalı primer folliküldür (Kierszenbaum, 2006).



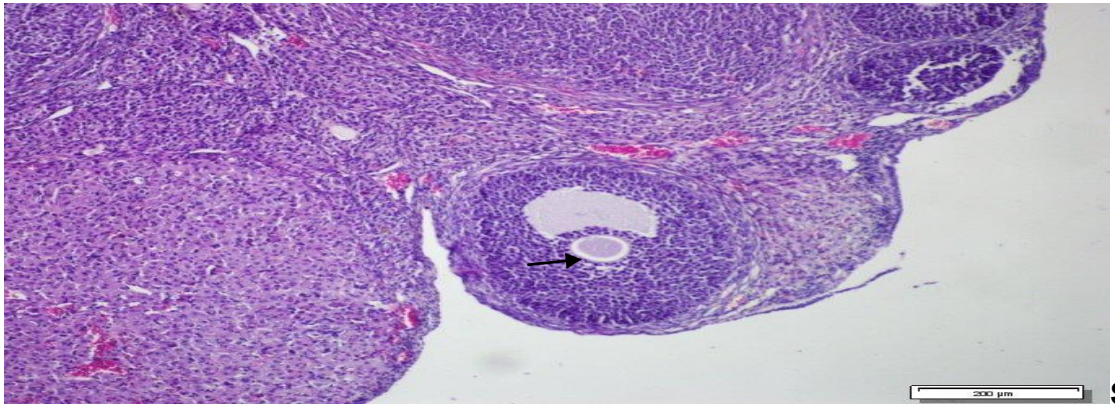
**Şekil 2.**Primer follikül.

Tek tabakalı follikül hücrelerinin mitoz geçirip çoğalmasıyla membrana granüloza oluşur. Follikül hücreleri ise artık granüloza hücreleri olarak tanımlanır. Follikülün etrafındaki stromal hücreler granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile oluşur ve bu stromal hücreler teka follikülü oluştururlar. Teka follikül ise farklılaşarak teka interna ve teka eksterna tabakalarına ayrılır. Teka interna hücreleri luteinizan hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. LH uyarılmasıyla birlikte androjenlerin sentez ve salınımı sağlanır. Teka interna fibroblastlar, kollajen fibrilleri ve bir damar ağına sahiptir. Teka eksterna ise damardan zengin bir tabakadır ve düz kas hücreleri ve kollajen lifler içerir. Teka tabakaları arasındaki sınır tam olarak belirgin değildir. Ama granüloza tabakası ile teka interna arasında bulunan bazal lamina iki tabaka arasında sınırı belirler. Oositin olgunlaşmasıyla beraber Balbian cisimciğinden köken alan Golgi'nin sitoplazmaya dağılımı gerçekleşir. Küçük veziküllerin, granüler endoplazmik retikulumun (GER), mitokondriyonların, serbest ribozomların ve multiveziküler cisimciklerin miktarı artar. Granüllerin içerdiği proteaz larekzozitlerle oositin sperm tarafından aktive edilmesiyle birlikte serbestleştirilir (Ross, 2011).

#### **2.1.2.2. Sekonder Foliküller**

Granüloza hücreleri çoğalmasıyla follikülün çapı büyür. Follikül kortikal stromanın derinlerine doğru ilerlerken oosit ve follikül gelişimi için follikül stimüle edici

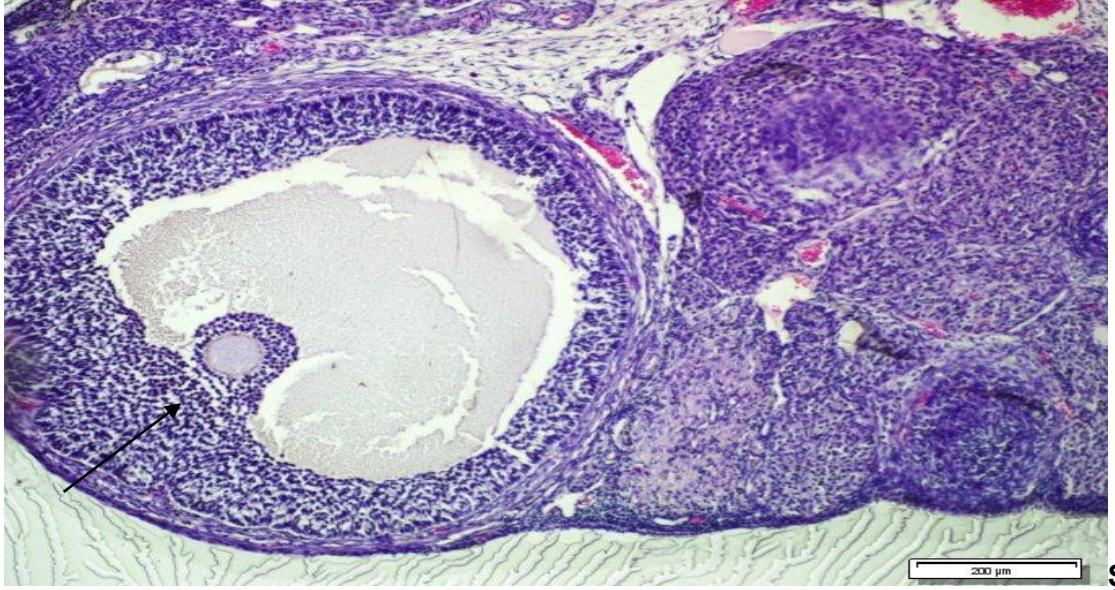
hormon (FSH), büyüme faktörleri; epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) ve kalsiyum iyonları ( $Ca^{2+}$ ) gerekir. Stratum granulozum 6-12 sıralı hücre katmanına ulaşır ve granuloza hücreleri arasında sıvı dolu bir kavite oluşmaya başlar (Şekil 4). Granuloza hücrelerinden kaynaklanan sıvı birikmeye devam eder. Sonrasında ise kaviteler birleşerek tek, yarım ay şeklinde antruma dönüşür. Bu yapı sekonder follikül olarak adlandırılır. Sekonder sıvıya granuloza hücrelerinden oosit matürasyon inhibitörü (OMI) salgılanır ve oositin büyümesi inhibe edilir. OMI konsantrasyonu küçük folliküllerde en yüksek, olgun folliküllerde ise en düşüktür (Ross, 2011).



**ekil 3.** Sekonder follikül.

### 2.1.2.3. Olgun (Graaf) Folikül

Sekonder follikülün genişlemesiyle antrumda giderek genişler (Şekil 5). Granuloza hücrelerinin oositle temasta olduğu alanda antruma doğru kumulus ooforus tepeciğini oluştururlar. Zona pellusidayı çevreleyen kumulus ooforus hücreleri korona radyata olarak adlandırılır ve ovulasyonda ovaryumu terk eden oosit ile birlikte atılırlar. Korona radiata hücrelerinin mikrovillusları oositle gapjunctionlar aracılığıyla bağlantı kurarlar. Follikülün maturasyonu sırasında granuloza hücrelerinin mikrovillus sayısı artar ve antral yüzeydeki LH reseptör sayılarının artışı ile ilişkilidir. Her menstrüel dönemde genellikle bir folikül diğerlerinden fazla büyür. Baskın olan folikül 7 ovulasyonu gerçekleştirerek foliküler büyümenin en son aşamasına ulaşabilir. Bu ovulasyon olgun folikül ya da graaf folikül olarak adlandırılır (Ross MH ve Pawlina W 2014).



ekil 4.Graaf follikül

### 2.1.3. Ovulasyon

Olgunlaşmamış olan sekonder oosit olgunlaşırken değişiklikler geçirir. Diploid (2n) sayıda kromozom içeren oogonia mitotik bölünmeler geçirerek primer oositleri oluşturur. Primer oositler foliküler gelişim sırasında büyür ve iki maturasyon bölünmesi geçirerek matür oluşur. İlk olgunlaşma bölünmesi ovulasyondan hemen önce gerçekleşir. Kardeş hücreler arasında kromozomlar paylaşılır. Kardeş hücrelerden birisi olan sekonder oosit ana hücrenin sitoplazmasının tamamını alır. Diğer hücre ise dejenere (bozulma) olur. Hücrelerin ikisi de 23 kromozama sahiptir. Bu sırada ovulasyon gerçekleşir ve sekonder oosit folikülden serbestleşir ve sekonder oositin nükleusu sekonder maturatik bölünmeye başlar. Metafazda duran bölünme fertilizasyona (döllenme) kadar böyle kalır. İkinci mayoz bölünmenin gerçekleşmesiyle eşit olmayan sitoplazmik bir bölünme meydana gelir. Büyük sitoplazmaya sahip olan hücre matür oosit, diğeri ise 2. polar cisimdir. Böylece bir primer oositin yalnızca bir hücresi fonksiyonel hale gelir. Maturasyonu tamamlanan folikülde sıvı artar, şişme oluşur. Folikül rüptür oluşmasıyla sıvı periton (karın zarı) boşluğuna sızar. Zona pellusida ve korona radiata ile çevrili oosit sıvı içerisinde dağılarak ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyon hormon aracılığıyla gerçekleşir ve oositin serbestleşmesiyle son bulur. Oositin atılmasında enzimatik ve hormonal değişiklikler etkilidir. Bu faktörler ise; foliküler sıvının hacminin ve basıncının artması, folikül duvarının aktive plazminojen tarafından enzimatik proteolizisi, oosit-kumulus kompleksi ile stratum granulosum arasında hormonal yönlendirmeye glikozaminoglikanların biriktirilmesi, teka eksterna

tabakasındaki düz kas liflerinin prostaglandinler tarafından tetiklenerek kasılmasıdır (Ross MH ve Pawlina W 2014)

#### **2.1.4. Korpus Luteum**

Korpus Luteum, sarı cisim geçici bir endokrinal yapıdır. Her menstrüel siklusta yeni bir corpus luteum oluşur. Yüksek düzeylerde progesteron ile orta düzeylerde estradiol ile inhibin A üretimi ile ilgilidir. Hamileliğin ilk 8 haftasında progesteronun en çok corpus luteum da üretilir. Hamileliğin 8. haftasından sonra ise plasentada daha fazla corpus luteum'da üretilmeye başlar. Daha fazla Gonadotropin salıcı hormonun (GnRH) salgılanmasından dolayı Lüteinleştirici hormon (LH) ve Folikül uyarıcı hormon (FSH) salgılanmaması için östrojen de salgılar (Mescher AL 2016)

#### **2.1.5. Menstrual Döngü**

Hipofiz gonadotropinleri FSH ve LH tarafından ovaryum folikülleri ve korpus luteumun döngüsel gelişimi kontrol edilir ve aynı zaman da östrojen ve progesteronun seviyelerinde değişikliğe neden olur (Ünal F 2009).

#### **2.1.6. Over Rezervi**

Matür (olgun) oosit overlerin primer fonksiyonu tarafından üretilmektedir. Doğumda overlerde, primordiyal foliküllerin içerisinde folikülogenezi gerçekleştirmeye dönük sınırlı sayıda oosit mevcuttur. Over rezervini temsil eden primordiyal foliküller normalde dormant (inaktif,uykuda) haldedirler. Ergenlik dönemiyle birlikte her menstruel siklusta az sayıda primoriyal folikül aktiflenerek primer, sekonder ve tersiyer foliküle dönüşür ve her menstruel siklusta bir tane olgun oosit etrafındaki granüloza hücreleriyle tersiyer (olgun) folikülden dışarı atılır. Over rezervi yaşla birlikte, bazı çevresel faktörlerle ve hastalıklar ile azalmaktadır (Ross MH 2011).

## 2.2. Kemoterapi ve Radyoterapinin Gonadal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Kanser tedavilerindeki cerrahi, tıbbi ve teknolojik tedaviler ile birlikte A.B.D.'de her yıl 4000 kız çocuğu potansiyel olarak infertiliteye neden olabilen kemoterapi ve radyoterapiye maruz kalmaktadır. Kemoterapi ve radyasyon tedavileri sonrası amenore (adetten kesilme) ve infertilite problemleri ile karşılaşılması olasıdır. Alkilleyici ajanlar (Siklofosamid vb.) ve iyonizan radyasyon kullanımı prematür over yetmezliğine neden olmaktadır (Nelson LM 1994).

## 2.3. Premature Ovaryan Yetmezlik (POY)

Prematür over yetmezliği (POY), oligomenore, hipoöstrojenizm, subfertilite, amenore ve infertilite ile ilişkili olarak gonadlarda rezidüel folikül kaybına yol açan over disfonksiyonu ile karakterize bir hastalıktır. Primer amenore olan kadınlar arasında POF sıklığı sekonder amenore olanlardan daha yüksektir. Bu hastalık primer over yetmezliği olarak bilinir ve çok karmaşıktır. Prevalansı 35 yaş altı 250 kadından birinde ve 40 yaş altı 100 kadından birinde şeklindedir. POF için uygun tanı kriterleri henüz mevcut olmasa da; en az 4 ay boyunca amenore veya oligomenore ve 40 yaşın altındaki kadınlarda 4 haftalık aralıklarla iki defada 25-40 IU/L'yi aşan kalıcı olarak artmış folikül uyarıcı hormon (FSH) düzeyleri ile klinik olarak tanımlanmaktadır.

POY'un kökenindeki olası mekanizmalar: başlangıçta yetersiz primordiyal folikül havuzu olması; hızlandırılmış bir foliküler atrezi süreci; veya primordiyal foliküllerin anormal matürasyonu olarak sınıflandırılabilir. Kemoterapi ve otoimmün poliglandüler sendrom gibi otoimmün bozukluklar, radyasyon tedavisi ve over cerrahisi gibi iyatrojenik faktörler bilinen nedenler arasındadır. Şu anda, tüm POY formlarının yaklaşık % 25'i kanser tedavisi ile ilişkilidir. Kemoterapi sonrası oluşan POY, antikanser tedavisinin, dejeneratif sağlık problemleri ve infertilite riskini arttıran majör ve uzun

vadeli olumsuz etkisi olarak ortaya çıkmaktadır. Kemoterapiye bu tür yanıtlar, over rezervinin kaybı infertilite riski ile yakından ilişkili olması sebebiyle özellikle genç kadınlarda önemli bir sorundur. Antikanser ilaçların over toksisitesine yol açmada uyguladığı mekanizma ilacın tipine ve test edilen hücre tipine bağlı olduğu bilinmektedir. Antikanser ilaçların çoğunun stroma ve granuloza hücrelerini, apoptoz yoluyla etkilediği, oositlerin ise bu toksisiteden dolayı bir şekilde etkilendiği düşünülmektedir (Jankowska K 2017).

## **2.4. Fertilite Koruyucu Yöntemler**

Kanser saptanan kadınlarda fertilitiyi korumada uygulanan ve uygulanabilecek birçok yöntem vardır. Bunlardan bazıları şu şekilde sıralanabilir; Ovaryan transpozisyon operasyonları, GnRH analogları kullanımı, embriyonun ve yumurtalık dokusunun veya tüm yumurtalığın dondurulması ve gelecekte transplantasyon veya in vitro büyüme (Vücut dışında olgunlaştırma) için saklanması, antiapoptotik sfingozin-1-fosfat gibi ajanlarla farmakolojik korunma, rahim transplantasyonu ve kök hücre tedavisi (Fortuno C ve Labarta E 2014).

### **2.4.1. Kök Hücre Tedavisi**

Üreme alanında kök hücre tedavileri fertilitenin korunması, kök hücrelerden fonksiyonel gamet hücresi üretimi ve fertilitenin korunması amacıyla doku ve organ üretimi gibi alanlarda ilgilenmektedir (Tuch BE 2006).

### **2.4.2. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri**

Kök hücre, mitoz bölünmeyle özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen ve daha fazla kök hücre üretmek için kendini yenileme yeteneğine sahip olan, bütün çok hücreli canlıların doku ve organlarını oluşturan hücrelerdir. Kök hücreler uzun süre boyunca bölünme ve kendilerini yenileyebilme özelliğine (self-renewal), özelleşmiş hücrelere dönüşebilme özelliğine (farklılaşma) ve klon oluşturabilme (cloning) özelliğine sahiptirler (Tuch BE 2006).



### 2.4.2.1. Farklanma (Plastite):

Farklılaşma işlevsel olarak olgun bir hücre olma yolunda geçirilen, sitokinlerin, büyüme ve farklanma faktörlerinin, hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücreler arası iletişimin etkisiyle oluşan olaylar dizisidir. Hücre farklılaşmasını tetikleyen hücre içi sinyaller hücredeki genler aracılığıyla kontrol edilir ve hücre dışı sinyaller ise diğer hücrelerden salınan kimyasal maddeler, komşu hücrelerle fiziksel temas ve mikro çevredeki bazı moleküllerdir. Farklanma aşamasındaki hücre hem bölünmeyi durdurur hem de çevresinden gelen sinyallere yanıt vermeye hazırlanır. Bir hücre için ileri farklanma süreci çoğunlukla o hücrenin çoğalma sürecinin bittiği noktadan başlar. Söz konusu hücre önce yeterli sayıya ulaşır ve G0 fazına girer yani hücre bölünme döngüsünden kalıcı veya geçici olarak çıkar. Farklanmayı uyaran ve sürdüren etkenler ortadan kalkarsa G1 fazına geçilir yani birçok hücre bölünme döngüsüne tekrar girer (Can A 2009, Karaöz E 2004)

**Tablo 1.** Kökenlerine, farklanma etkinliklerine göre kök hücre türleri (Can A 2009).

İsim	Hücre Tipi (yerleşim)	Farklanma Etkinliği	Farklanma Yönü
EKH*	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve embriyon dışı tabakalar
EKH	Blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyon gövdesi (tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Ektoderm, endoderm, mezoderm hücreleri
EKH	Ektoderm, endoderm, mezoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler <sup>a</sup>
YKH*	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Hücrenin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	(Kas dokusundaki hücreler)

### 2.4.2.3. Kendini Yenileme (Self Renewal):

Kendini yenileyebilme özelliği sayesinde kök hücre havuzu sürekliliğini koruyarak bu havuzu tükenmekten korur. Kök hücreler organizmanın yaşamı boyunca kendi kopyasını alacak şekilde çoğalırlar ve gerektiğinde organ ve dokuya özgü öncü hücrelere dönüşebilirler. Embriyonik gelişim sürecinde, kök hücreler ile farklılanmakta olan hücreler arasındaki denge yetişkin insan hücrelerinin ve dokularının uzun süreli korunması ve onarımında çok önemlidir. Bölünmeler sırasında kök hücreler bir yandan öncü hücreye dönüşecek hücreyi üretirken diğer bir yandan da kendini yedeklemektedir ve bu kök hücreler ile öncü hücreleri ayıran özelliklerden biridir. Bu olay kök hücre havuzunun yaşam boyu sabit kalmasını sağlar ve asimetrik hücre bölünmesi sonucu oluşur. Hücre içi ve hücre dışı etkenlerin asimetrik hücre bölünmesinde çok sıkı kontrol edilmesi gerekir. Bazı organellerin, protein gruplarının ve RNA'nın yavru hücrelerden sadece birine aktarılmasıyla hücre içindeki asimetri sağlanır. Bölünme sonunda orjinal DNA, yavru hücrelerden birine giderken kararlanma geçirir ve öncü hücreye dönüşecek olan diğer hücrede yeni DNA sentezi meydana gelir. Böylece kök hücreler mutasyonlardan korunmakta ve hep aynı genoma sahip hücreler bozunmadan kalabilmektedir. Hücrenin dışındaki mikro çevre (niş) tarafından kök hücrelerin hücre dışı asimetrisi oluşturulur. Hücre içi ve hücre dışı sinyaller hücrenin kendini yenilemesinde önemli etkenlerdendir (Can A 2009).

**Tablo 2.**Kök hücrelerin farklılanma yetkinliği (Can A 2009).

<b>Kısaltılmış biçimi</b>	<b>Anlamı</b>	<b>Örnek</b>
<b>Toti</b>	<b>Bütün</b>	<b>Embriyon</b>
<b>Multi</b>	<b>Birçok</b>	<b>Hematopoetik</b>
<b>Pluri</b>	<b>Çok</b>	<b>Hematopoetik</b>
<b>Oligo</b>	<b>Az</b>	<b>GİS kök hücreleri</b>
<b>Quadri</b>	<b>Dört</b>	<b>GİS kök hücreleri</b>
<b>Tri</b>	<b>Üç</b>	<b>Bronş epiteli</b>
<b>Bi</b>	<b>İki</b>	<b>Safra kanalı</b>
<b>Uni</b>	<b>Bir/tek</b>	<b>Prostat</b>

#### **2.4.2.4. Köklülük (Stemness)**

Köklülük diğer hücrelerden kök hücreleri ayıran hücresel ve moleküler özelliklerdir. Kök hücreler farklılaşmaksızın özgün yapılarını ve işlevlerini korurlar. Kök hücre tipini belirlemek için kök hücre belirteçlerini kullanmak en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. SSA1, SSA4, TRA-1-60, Sox2, Oct4 embriyonik kök hücreler için yaygın kullanılan belirteçlerdir. CD33, CD34, CD45 hematopoetik kök hücreler için en yaygın kabul edilen belirteçlerdir. Stromal kök hücreleri ayırt etmek için ise CD29, CD54, CD90, CD106 kullanılır (McGee EA ve Hsubeh AJ 2000).

#### **2.4.3. Kök Hücrelerin Karakterizasyonu:**

Çok yönlü birçok analizin bir araya getirilmesi ile kök hücre karakterizasyon çalışmaları tamamlanmaktadır. Hücre özelliklerini belirleyebilmek için belli belirteçleri taşıyan hücrelerin akım sitometre ile sayılması, gen ekspresyon analizleri hücrede ifade edilen proteinlerin immün boyama ile belirlenmesi ve farklılaşma deneyleri sıklıkla kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücreler birçok dokudan izole edilerek, izole edildikleri doku içerisinde kazandıkları özellikleri izolasyon sonrasında taşıyabilmektedirler. Birçok yüzey belirteçini ifade eden, hematopoetik kök hücrelerden farklı belirteçleri taşıyan hücreler ve osteosit, adiposit ve kondrosit hücre hatlarına farklılaşabilen hücreler mezenkimal kök hücreler olarak tanımlanabilir. Kök hücrelerin içinde bulunduğu mikro-çevrenin özelliklerinin değişmesi ile kök hücrelerde farklılaşma süreci uyarılabilir ve bu uyarı in vitro hücre kültürü ortamına kimyasal karışımların eklenmesi ile olabileceği gibi biyoreaktördeki sürtünme kuvveti ya da basınç da uyarı için yeterli olabilir (Can A 2009).

#### **2.4.4. Kök Hücre Çeşitleri ve Kaynakları**

Kök hücreler embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere iki kaynaktan elde edilirler. Embriyonik kök hücreler embriyonik gelişim sürecinin erken döneminde blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilirler ve embriyonik olmayan kök hücreler ise dokuya özgü kök hücreler: doğum sonrası dönemdeki kök hücrelerdir (Karaöz E 2010).

Erişkin kök hücreler mezenkimal kök hücreler, hematopoetik kök hücreler ve organlardaki kök hücreler olmak üzere üç gruba ayrılır.

#### **2.4.4.1.Mezenkimal Kök Hücreler**

Organların bağ dokularında bulunan stromal hücrelerdir. Göç edebilme kapasiteleri sayesinde hasarlı bölgeye giderek hasarlı dokunun tamirini yaparlar. Plastik flasklara yapışma özelliğinde ve yüksek çoğalma kapasitesine sahip hücrelerdir. Yüzeylerinde bulunan bazı proteinler CD29(+), CD90(+), CD54(+), CD106(+) ve bulunmayan bir takım proteinler CD34(-), CD45(-), CD11b(-), CD14(-), CD19(-) veya CD79(-), HLA-DR1(-) sayesinde ayırt edilebilirler. Kolay elde edilebilmekle birlikte birçok dokuya da dönüşebilirler (Can A 2009).

### **2.5. Hipotez**

Önceki çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin prematür overyan yetmezlik oluşturulan deney hayvanlarında ovaryumların üzerindeki iyileştirici etkileri gösterilmiştir. Çalışmamızda prematür overyan yetmezlik oluşturduğumuz sıçanlarda, overyan stromal kök hücrelerin ovaryum üzerindeki etkinliği analiz edilmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulundan 05.06.2020 tarihinde PAUHADYEK-2020/10 numarasıyla onay alındı. Çalışmamız için gerekli hayvanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama Merkezinden temin edildi. Çalışmamızda, toplam 20 adet, 8 haftalık, 150±15 gram ağırlığında Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Deney protokolü boyunca, sıçanlar sıcaklığı ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ) ve rutubeti (65-70%) kontrol edilen 12 saat ışık-karanlık çevrimi olan sessiz bir oda içinde ayrı kafeslerde tutuldu. Hayvanlara standart sıçan yemi ve çeşme suyu ad libitum olarak verildi. Sıçanlar rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (Kontrol grubu; n=6), Kemoterapi grubu (Kemoterapi grubu; n=6), Kök Hücre Grubu (Kök hücre grubu; n=6) olarak 3 grup oluşturuldu.

- 1) Sıçanlara intraperitoneal olarak siklofosamid verilir ve overyan yetmezlik oluşumu sağlandı.
- 2) Daha sonra over dokusundan elde edilen stromal kök hücreler overlere enjekte edildi.



**Şekil 5.** Kontrol grubu,



Kemoterapi grubu



Kök hücre Grubu

#### 3.1. Overyan Stromal Kök Hücre Eldesi

2 adet 4 haftalık dişi Wistar Albino tipi sıçan Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi ve ovaryum dokularından eksplant kültür yöntemi ile stromal kök hücre eldesi sağlandı. Dişi sıçanların ovaryumları anestezi altında steril koşullarda eksize edildi. Alınan dokular, steril bir

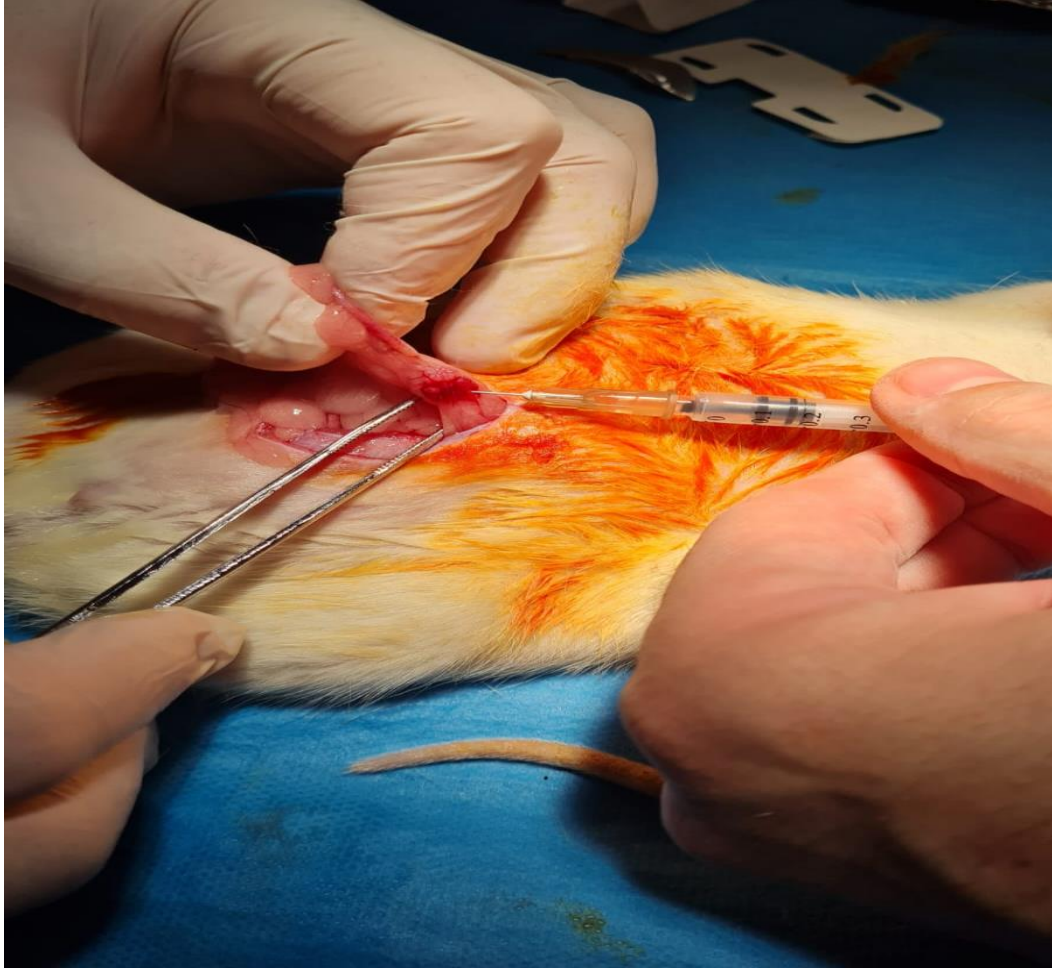
kabın içerisinde fosfat buffer saline (PBS) ile birlikte yıkanarak üzerlerindeki pıhtı kalıntılarında tamamen temizlendi. Steril solüsyon (penisilin/streptomisinli DMEM) içinde hücre kültürü laboratuvarına transfer edilen dokular, laminar flow kabinde PBS ile birkaç kez daha yıkanarak etrafındaki kandan arındırıldı. Daha sonra ovaryum dokusunun çevresindeki adipoz doku uzaklaştırıldı ve doku küçük parçalara ayrılarak 100 mm'lik petri kaplarına yerleştirildi. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı. 24. saatte kontaminasyon ve hücre kontrolleri yapıldı.

Komplet besiyeri 450ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (Capricorn Scientific, Germany), 50ml Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn Scientific, Germany) ve 5 ml Penisilin-Streptomisin (Pan Biotech, Germany) karıştırılarak hazırlandı. Kültür kaplarına yapışan hücreler tripsin enzimi %0.25 (Hyclone, USA) ile kaldırıldı ve içinde komplet besiyeri olan yeni kültür kaplarına ekimleri yapıldı. Kültür kaplarının iki günde bir medyumları değiştirildi ve optimal kültür şartları oluşturuldu. Çoğalan hücreler canlılıklarının değerlendirilmesi için tripan blue ile boyandı ve hücre sayıları Neubauer Improved sayım kamarasıyla ışık mikroskobu altında tespit edildi. Tüm bu aşamalar invert mikroskop (CKX41 Olympus, Japan) kullanılarak gözlemlendi. Devam eden pasajlarda çoğalan hücreler araştırmalarda kullanılmak üzere kriyoprezervasyon işlemi yapılarak kriotüpler içinde -80°C'de derin dondurucuya kaldırıldı. Dondurma vasatı olarak Dimetilsülfoksit (DMSO) ve DMEM karışımı kullanıldı.

### **3.2. Sıçanlarda Siklofosfamidle Deneysel Prematür Ovaryan Yetmezlik Oluşturulması ve Stromal Kök Hücrelerin Sıçan Ovaryumlarına Enjeksiyonu**

Siklofosfamid kullanılarak sıçanlarda deneysel ovaryan toksisite oluşturuldu. Kemoterapi grubu; (n=6) ve Kök hücre grubu; (n=6) 1. Ve 8. gün 200 mg/kg siklofosfamid intraperitoneal olarak verildi.

Tekrarlayan pasajlar yapılarak elde edilen stromal kök hücrelerin çoğalması sağlandı. Daha sonra sadece Kök hücre grubuna (n=6) siklofosfamid enjeksiyonunun son gününden bir gün sonra yani 9. gün over dokusundan elde ettiğimiz stromal kök hücreler (Her bir overe 500.000 stromal kök hücreyi 0.01ml PBS içerisinde) cerrahi yöntemle direkt sıçanların her iki ovaryumuna enjekte edildi. Bu işlem anestezi altında yapıldı.



**Şekil 6.** Stromal kök hücrelerin ovaryum içine enjeksiyonu.

### 3.3. Deneyin Sonlandırılması

Kök hücre enjeksiyonundan 2 hafta sonra tüm sıçanların ovaryumları çıkarılarak rutin ışık mikroskobu doku takibi yapıldı. Parafin bloklardan 5 µm luk kesitler alınarak hematoksilin eozin ile boyandı. Kesitler ışık mikroskobunda histopatolojik olarak incelendi. 1. 5.ve 10. kesitlerde primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin sayımı yapıldı. TUNEL yöntemi ve kaspas 3 aktivitesi IHK boyama yöntemi ile boyama yapılarak değerlendirildi. Kesitler Olympus BX-51 ışık mikroskobu ile incelenip ve Olympus PP72 Digital Kamera ataçmanı ile resimlendirildi.

### 3.4. Doku Takip Yöntemi

1) Alınan dokular 10 gün formaldehitte bekletildi.

- 2) Akarsuda 30 dakika yıkandı.
  - 3) %50 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
  - 4) %70 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
  - 5) %80 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
  - 6) %90 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
  - 7) %100 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
  - 8) Ksilen I de 1 saat bekletildi.
  - 9) Ksilen II de 1 saat bekletildi.
  - 10) Parafin I de 1 saat bekletildi.
  - 11) Parafin II de 1 saat bekletildi.
  - 12) Dokulara parafine gömme ve etiketleme işlemi yapıldı.
- Overlerdeki apoptozis tunnel tekniğiyle ve kaspaz 3 ile araştırıldı. Mikroskopta her kesitte 10 Rastgele alan, 200X büyütmede sayılarak görüntülendi.

### 3.5. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü:

Dokular etüvde 60 dakika boyunca bekletilerek fazla parafinin uzaklaştırılması sağlanır.

Etüvden alınan dokular sırasıyla şu aşamalardan geçirilir:

- 1) Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) 30 dakika
- 2) Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) 30 dakika
- 3) %100 Etil alkol 10 dakika
- 4) %96 Etil alkol 10 dakika
- 5) %80 Etil alkol 10 dakika
- 6) %70 Etil alkol 10 dakika
- 7) Distile su Batırıp çıkarma
- 8) Hematoksilen 3 dakika
- 9) Akarsu Yıkanma
- 10) Asit -Alkol Batırıp çıkarma
- 11) Amonyak 1-2 saniye
- 12) Akarsu Yıkanma
- 13) Eozin 10 saniye
- 14) %70 Etil alkol 10 dakika
- 15) %80 Etil alkol 10 dakika
- 16) %96 Etil alkol 10 dakika
- 17) %100 Etil alkol 10 dakika
- 18) Xylen 10 dakika



**19)** Kapatma; Xylen den alınan lamlar üzerine entellan damlatılır. Hava kabarcığı bırakılmayacak şekilde lamellerle kapatılır ve ışık mikroskopunda incelenmeye hazır hale getirilir.

### **3.6. TUNEL Yöntemi**

Apoptotik hücreleri belirlemek için DNA kırık uç işaretleme yöntemi ile in situ apoptozis belirleme kiti kullanıldı (TUNEL Andy Fluor™ 488 Apoptosis Detection Kit Catalog Number: A050 Lot No: AB2150A2 kullanılmıştır). Kit verilerinde ifade edildiği şekilde tüm TUNEL aşamaları yapılmıştır.

**1)Deparafinizasyon:**

a) Xylen 2x5 dakika

b) %100 alkol 2x5 dakika

c) %95 alkol 5 dakika

d) %85 alkol 3 dakika

e) %75 alkol 3 dakika

f) PBS 2x5 dakika

**2)Proteinaz K 30 dakika**

**3)PBS 2x5 dakika**

**4) TdT reaksiyon tamponu 10 dakika**

**5) TdT enzimi; Hücre boyama için, ışıktan koruyarak 37°C'de 60 dakika**

Doku boyaması 37°C'de 2 saat

**6) PBS 3x5 dakika**

**7)Andy Fluor™ 488-Streptavidin boyama solüsyonu 30 dakika**

**8) PBS 3x5 dakika**

**9) Hoechst 33342 solüsyonu 10 dakika**

Negatif kontrol olarak kullanılan kesitin üzerine Tdt enzimi yerine distile su damlatıldı.

Pozitif Kontrol için ; DNase I, pozitif bir TUNEL reaksiyonu sağlamak için DNA'da iplik kopmaları oluşturur. Örnekleri 50 µL DNase bleşeni ile 10 dakika inkübe edildi. Pozitif kontrol numunesine 50 µL DNase I solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Numuneyi deiyonize su ile bir kez yıkandı.

### **3.7. Kaspaz-3 İmmünohistokimya Protokolü**

TUNEL boyama yapılan kesit seviyesinde seri kesitlere kaspaz-3 immünohistokimyasalı gerçekleştirildi. Negatif kontrol için primer antikor yerine normal bloklayıcı serum kullanıldı. TUNEL boyama sonrası saptanan pozitif nükleer boyanma kaspaz-3 sitoplazmik boyanma ile doğrulandı (Caspase 3 Rabbit pAb Catalog numarası: FNab01289 Lot Numarası: 20211215 kullanılmıştır).

- 1) Deparafinizasyon**
- 2) %96 alkol 3 dk**
- 3) %90 alkol 3 dk**
- 4) %70 alkol 3 dk**
- 5) Distile su 5 dk**
- 6) TRİS tamponu (pH: 7.4) 2×5 dk**
- 7) Antijen retrieval (sodyum-sitrat tamponu) 20 dk 100°C'de**
- 8) TRİS tamponu 2×5 dk**
- 9) 1:9 oranında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: metanol (%50'lik) karışımı 20 dk**
- 10) TRİS tamponu 2×5 dk**
- 11) Bloklayıcı serum (%10 normal at serumu) 2 saat**
- 12) Primer antikor (Kaspaz-3 Ab, 1/200 dilüsyon) 2 gece**
- 13) TRİS tamponu 2×5 dk**
- 14) Sekonder antikor (Donkey anti-rabbit, 1/100 dilüsyon) 2 saat**
- 15) TRİS tamponu 2×5 dk**

- 16) ABC kromojen 30 dk
- 17) TRİS tamponu 2×5 dk
- 18) DAB (diaminobenzidine) substrat solüsyonu 45 dk
- 19) TRİS tamponu 2×5 dk
- 20) Çeşme suyu 1 dk
- 21) %70'lik alkol 7 dips
- 22) %90'lık alkol 7 dips
- 23) %96'lık alkol 7 dips
- 24) Ksilen 2×20 dk
- 25) Kapatma

### 3.8. Folikül Sayımı Yöntemi

Doku takibi yapıp ovaryum dokuları parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotom cihazıyla 5 mikronluk kesitler alındı. Bütün sıçanların ovaryumlarından 1., 5. ve 10. kesitler lamlara alınıp taşıma sepetine yerleştirildi. Hematoksilen-Eosin boyama yapıldıktan sonra primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin sayımı yapıldı. Her bir sıçan ovaryumundan alınan 1., 5. ve 10. kesitlerde bulunan sonuçlar toplandı. (Folikül değerlendirme kriterleri bulgular kısmında açıklanmıştır.)

### 3.7. İstatistiksel Analiz

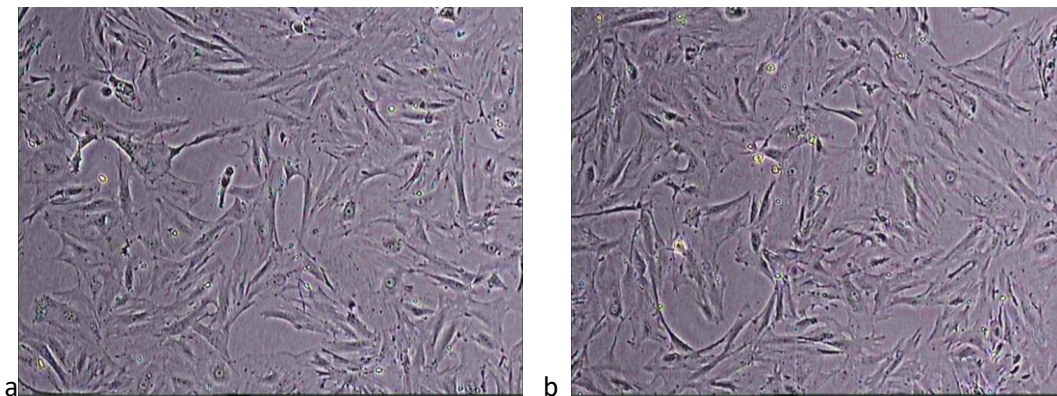
Tüm deneklerin ovaryum kesitlerinde primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer follikül sayımı yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Kruskal Wallis, iki grup arasındaki farklılık Mann-Whitney U ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS 26 paket programı kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Elde Edilen Overyan Stromal Kök Hücreler ve Flow Sitometri Sonuçları

Overyan stromal hücreler ve ovaryum yüzey epiteli sıçan ovaryum dokusundan herhangi bir enzimatik yöntem kullanılmadan explant kültür tekniğiyle izole edildi. Stromal hücreler 2. günde dokulardan göç ederek kültür kaplarına yapıştılar ve çoğalıp 7. günde konflue (%70-80) oldular. Kültür ortamındaki stromal hücrelerin morfolojileri, faz kontrast mikroskopu ile incelendiğinde fuziform şekilli, iğ seklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olarak görüldü. Hücreler, konfluent hale geldikten sonra pasajlanarak çoğaltıldı. Eş zamanlı olarak bazı plate'lerde sadece overyan stromal kök hücreler çoğalırken, bazı plate'lerde ise bu hücrelerle birlikte ovaryum yüzey epitelinin de çoğaldığı görüldü. Stromal hücre çoğalan kültür kaplarında mikroskop altında yapılan sayımda sırasıyla  $2 \times 10^6$  ve  $1.5 \times 10^6$  hücrenin ürediği gözlemlendi. Overyan stromal hücre çoğalan kaplarda besiyerleri iki günde değiştirilirken ovaryum yüzey epiteli çoğalan plate'lerde çok hızlı proliferasyon olduğu gözlemlendiğinden dolayı besiyerleri her gün değiştirildi.

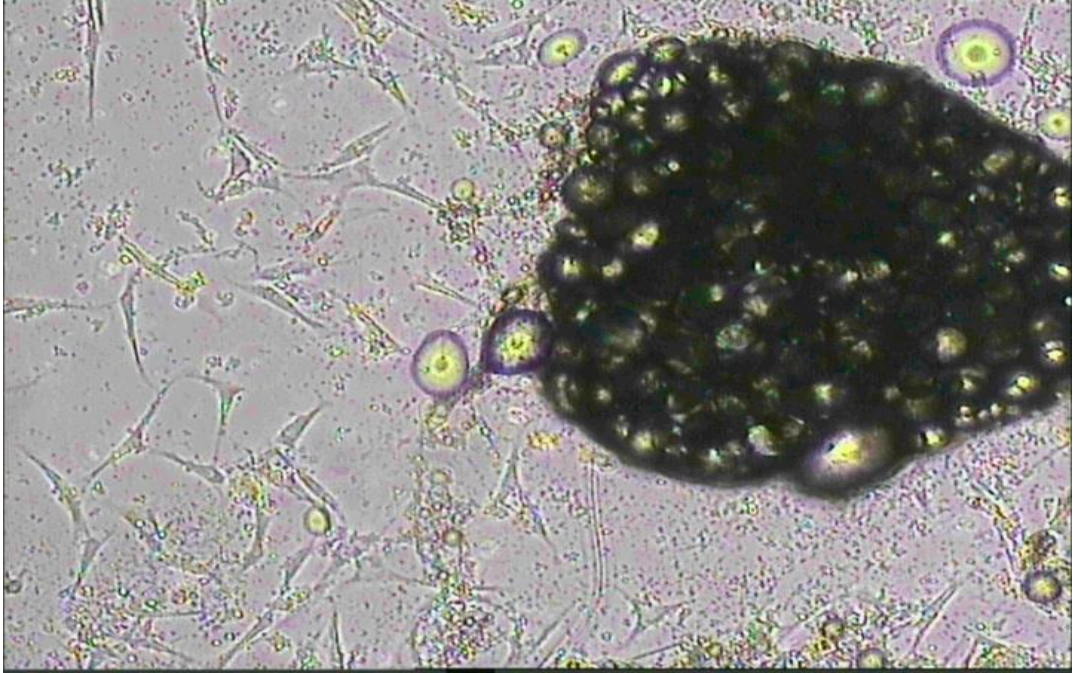
Yapılan flow sitometri analizinde CD54, CD90, CD45 yüzey antijenlerinin eksprese olduğu fakat CD29 antijeninin ise eksprese olmadığı görülmüştür.



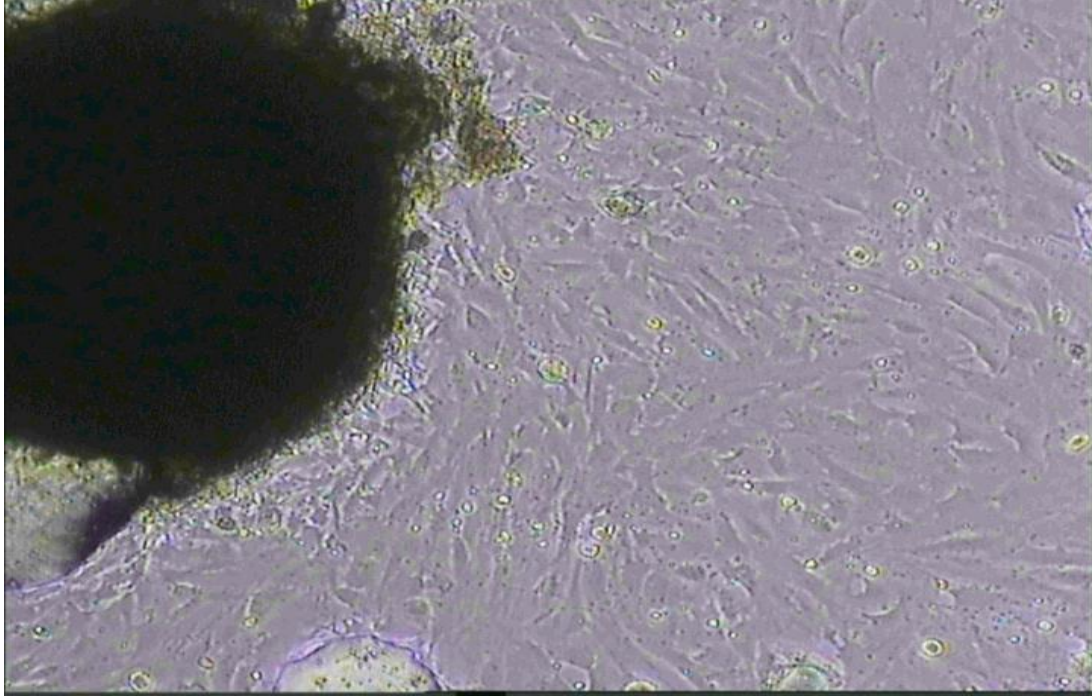
**Şekil 7.** Overyan stromal kök hücrelerin (P2) morfolojik görünümü.



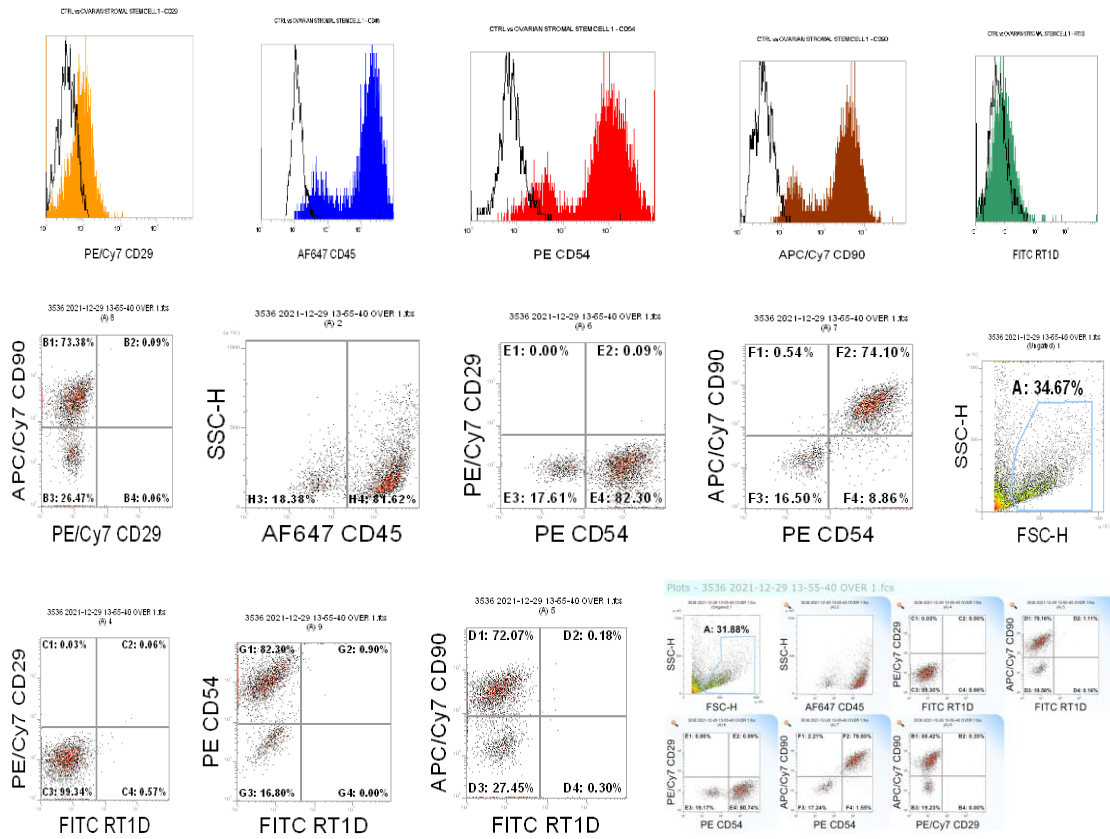
**Şekil 8.**Stromal kök hücrelerimizin 3. gündeki görüntüsü.



**Şekil 9.**Stromal kök hücrelerimizin 5. gündeki görüntüsü.



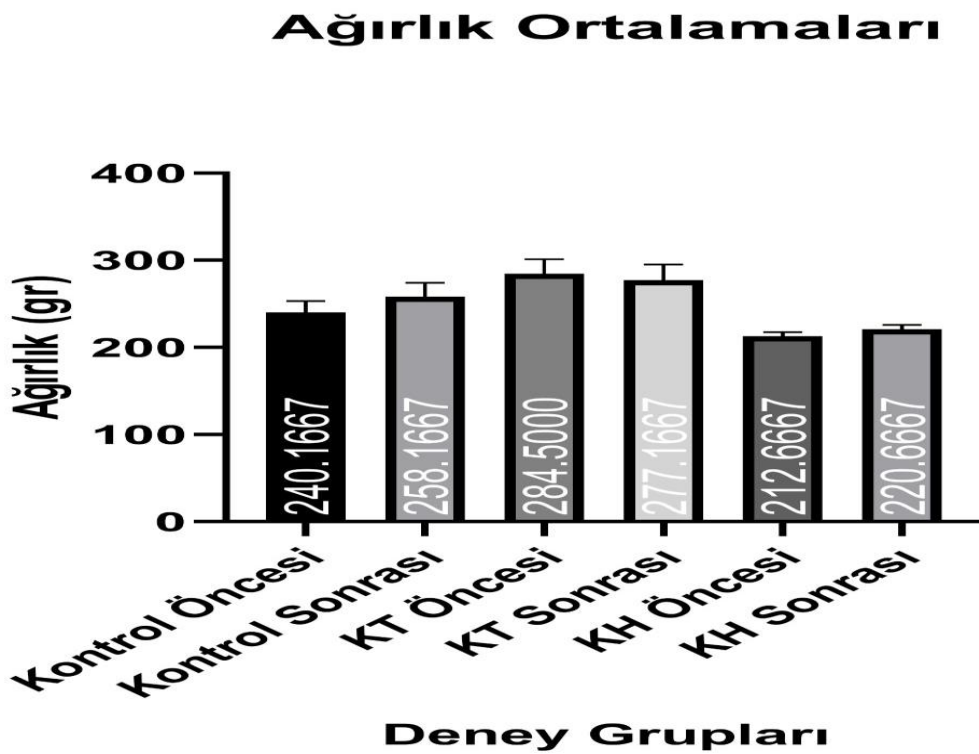
**Şekil 10.** Stromal kök hücrelerimizin 9. gündeki görüntüsü.



**Şekil 11.** Flow sitometri analizinde, hücrelerin stromal kök hücre belirteçleri olan CD54 ve CD90 nı exprese ettiği, CD 29'u eksprese etmediği; hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45'i ise eksprese ettiği tespit edildi.

#### 4.2. Vücut Ağırlığının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcında ve deney sonunda yapılan ağırlık ölçümleri tüm gruplara ait denekler için istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasında deney öncesi ve deney sonrası ağırlık farkları istatistiksel olarak Mann Whitney U Testi ile Bonferroni düzeltmesi şeklinde karşılaştırıldı.



**Şekil 12.** Deneklerin deney öncesi ve sonrası ağırlıkları.

Kontrol grubu ve kök hücre grubunun deney sonrası ağırlıklarının arttığı, Kemoterapi grubunun ise ağırlığının azaldığı belirlendi.

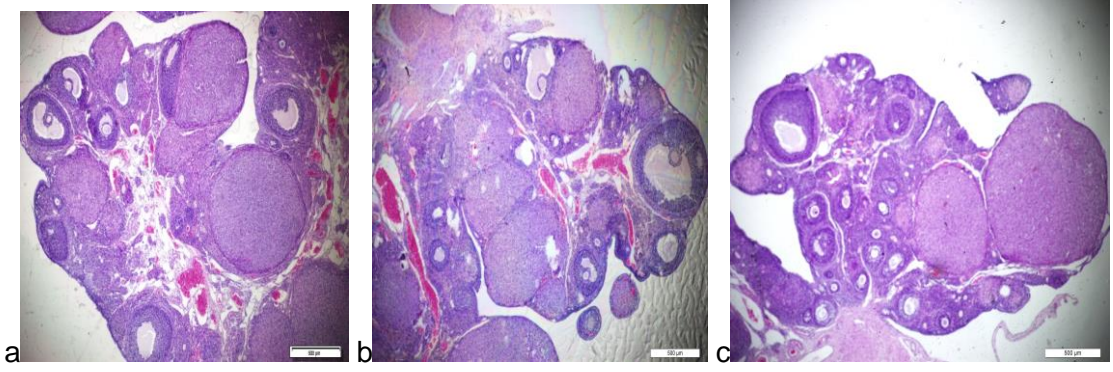
#### 4.3. Hematoksilen-Eosin Boyanma Sonuçları

Kontrol grubunda ovaryumun yüzey epitelinin bazı yerlerde tek katlı kübik, bazı bölgelerde ise tek katlı yassı epitel ile örtülü olduğu görüldü. Germinal epitelin altında tunika albuginea yer almaktadır. Tunika albugenia altında ise gelişimin farklı aşamalarındaki foliküller görüldü. Korteks stromasında primordial foliküller ayırt edildi. Çok katlı granüloza hücreleri arasında antrum boşluğunun oluşması ile karakterize olan sekonder foliküller izlendi. Ayrıca geniş tek bir antruma sahip tersiyer foliküller izlendi. Foliküller dışında ovaryumun farklı bölgelerinde korpus luteum ve atretik foliküller görüldü. Medulla ise kan damarlarından, bağ doku hücre ve liflerinden zengin olarak izlendi.

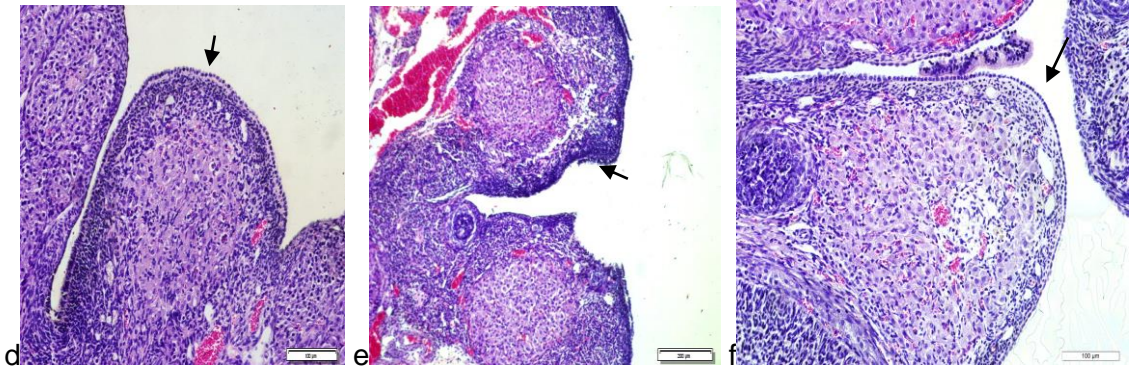
Kemoterapi grubunda germinal epitelin yer yer bütünlüğünün bozulduğunu ve tunika albugineanın ise normal yapıda olduğu izlendi. Foliküllerin bazılarının normal yapısını kaybettiği granulosa hücrelerinin sitoplazmalarında kayıpların olduğu ve bazı granulosa hücrelerinin çekirdeklerin piknotik görüldüğü izlendi. Özellikle sekonder ve graaf foliküllerde atrezi gözlemlendi. Apoptotik granüloza hücreleri sekonder ve tersiyer foliküllerin antruma yakın bölgesinde yoğunlaşmıştı. Bazı foliküllerin antrumunda apoptotik granüloza hücrelerinden oluşan debris materyali izlendi. Stromal dokuda da yer yer ayrılmaların olduğu izlendi. Atretik foliküllerde dejenere oosit, zona pelusida ve vakuolizasyon olduğu görüldü. Medullada ise kan damarlarının belirgin şekilde genişlemiş olduğu dikkat çekti.

Kök hücre grubunda ise ovaryumun genel morfolojisinin kontrol grubuna daha benzer olduğu gözlemlendi. Ovaryum dokusunda bazı yerlerde tek katlı yassı ve bazı yerlerde kübik epitelden oluşan germinal epitelin bütünlüğünün korunduğu izlendi. Epitelin hemen altında tunika albugenia bulunmaktaydı. Korteks tabakasındaki sağlıklı folikül sayısı kemoterapi grubuna oranla daha fazlaydı. Foliküllerde granulosa hücrelerinin normale yakın görünümde olduğu ve hücrelerin doğal yapılarının korunduğu görüldü. Stromal dokudaki ayrılmaların az da olsa devam ettiği izlendi. Sekonder ve graaf foliküllerde de zona pelusida ve granüloza hücrelerinin etrafında belirginleşmiş teka tabakası olduğu görüldü.

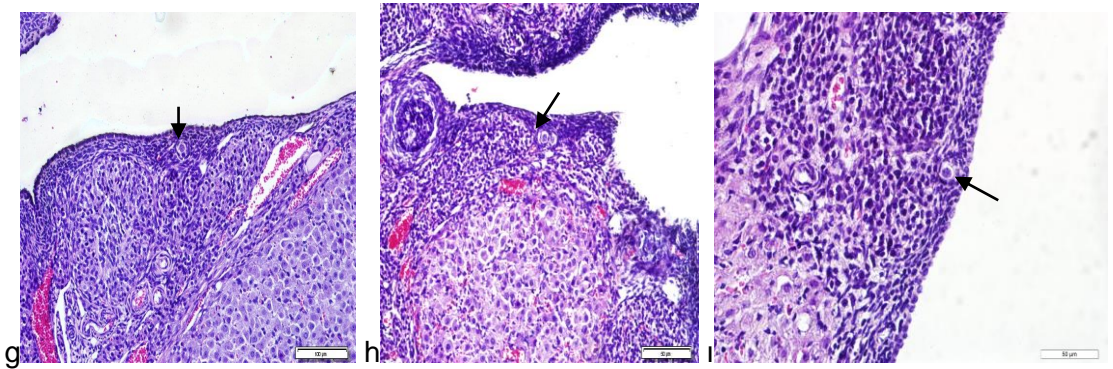




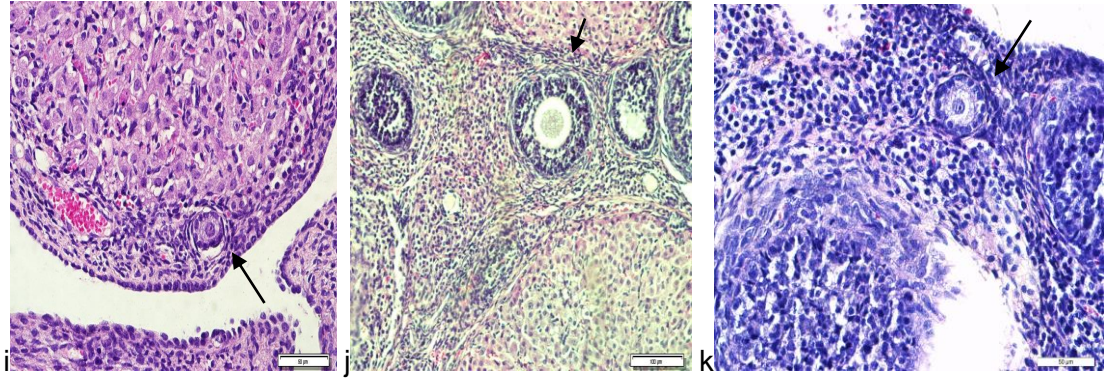
**Şekil 13.** a.Kontrol grubu genel görüntüsü b.Kemoterapi grubu genel görüntüsü c. Kök hücre grubu genel görüntüsü.



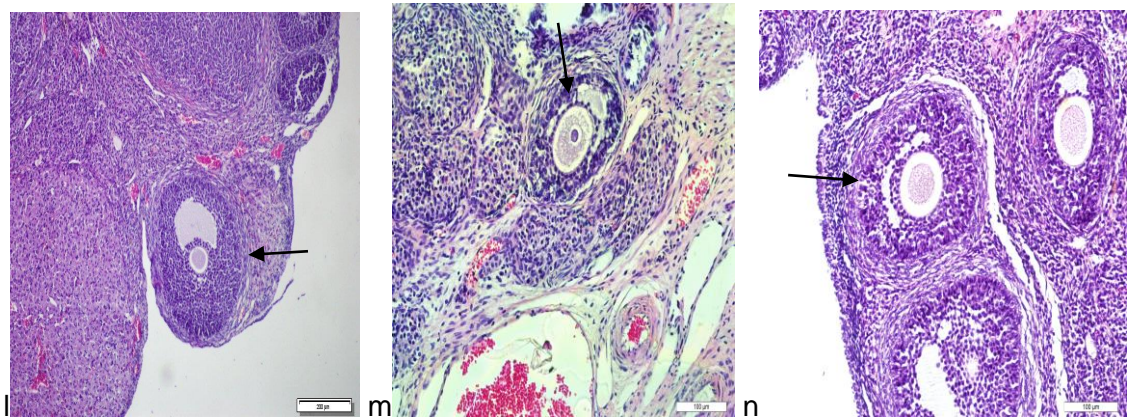
**Şekil 14.** d.Kontrol grubu yüzey epiteli e.Kemoterapi grubu yüzey epiteli f.Kök hücre grubu yüzey epiteli.



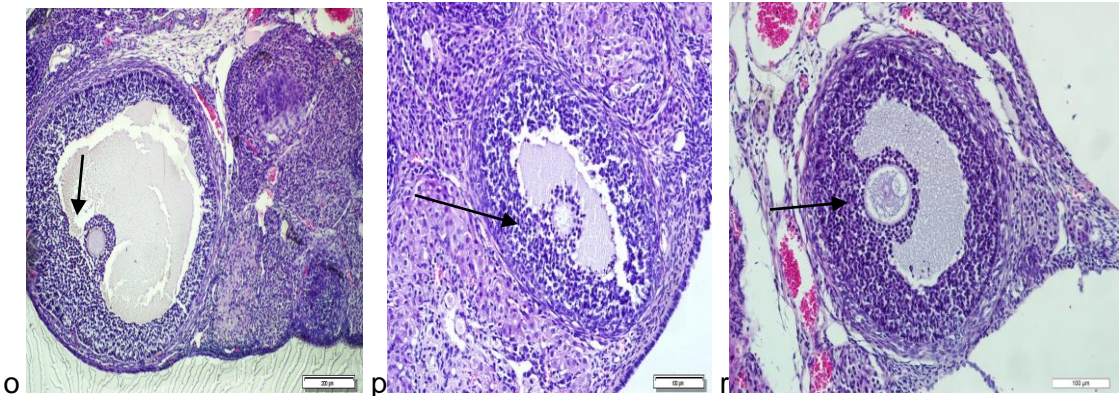
**Şekil 15.** g.Kontrol grubu primordiyal follikül h.Kemoterapi grubu primordiyal follikül i. Kök hücre grubu primordiyal follikül.



**Şekil 16.** i.Kontrol grubu primer follükül j.Kemoterapi grubu primer follükül k.Kök hücre grubu primer follükül.



**Şekil 17.** l.Kontrol grubu sekonder follükül m.Kemoterapi grubu sekonder follükül n.Kök hücre grubu sekonder follükül.



**Şekil 18.** o. Kontrol grubu graaf follükül p.Kemoterapi grubu graaf follükül r.Kök hücre grubu graaf follükül.

Follüküller aşağıdaki verilen kriterlere uygun olarak Hematoksilen-eosinle boyanan kesitlerde belirlenmiştir. Sayılan follüküller Kruskal Wallis ve Mann Whitney Utesti ile analiz edilmiştir.

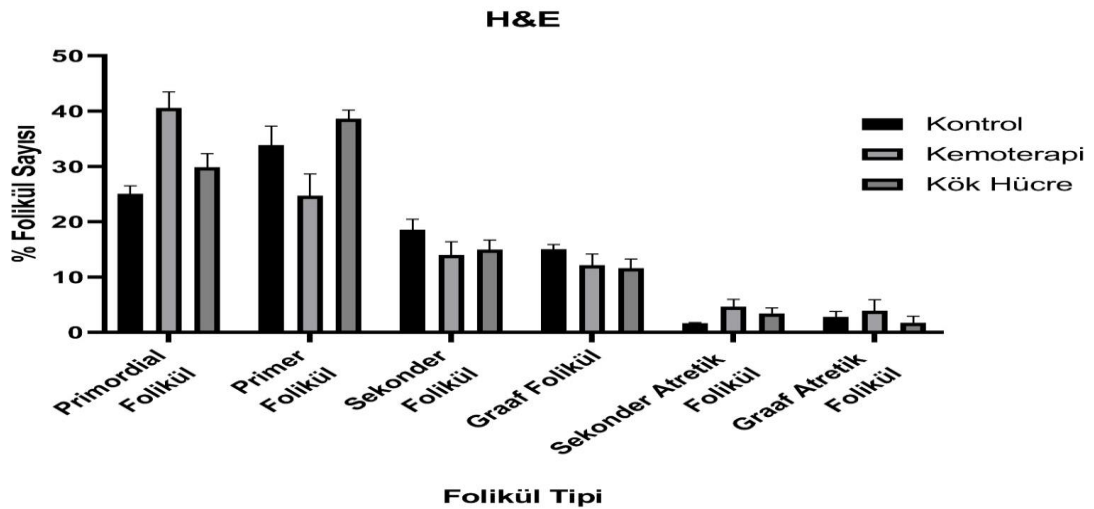
- Primordiyal follükül; oositi çevreleyen yassı tek sıralı granüloza hücreleri ile çevrili,

- Primer follikül; tek sıralı kübik granüloza hücreleri içeren,
- Sekonder follikül; 5 ya da daha fazla sıralı kübik granüloza hücreleri içeren ve bu hücreler arasında antral boşluklar bulunan, teka interna ve eksterna tabakaları daha belirgin olan,
- Graaf follikül; çap olarak en geniş olan ve antral boşluğun daha da iyi geliştiği, primer oositi çevreleyen kumulus ooforusun belirginleştiği folliküller olarak tanımlanır.

Tablo: Folliküllerin adlandırılması.

ADLANDIRMA	TANIM
Primordiyal Follikül	Tek katlı yassı granüloza hücre (GH) katmanı
Primer Follikül	tek sıralı kübik granüloza hücre katmanı
Sekonder Follikül	5≤ sıralı GH'li antral boşluklu, belirgin teka tabakalı
Graaf Follikül	Kumulus-oosit kompleksi, antral boşluk ve belirgin teka tabakalı

Gruplar arasında follikül sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda; primordiyal follikül, sekonder follikül, graaf follikül, sekonder atretik follikül ve graaf atretik follikül sayıları arasında farklılıklar saptandı.



Şekil 19. H&amp;E ile boyanan ovaryum foliküllerinin sayıları.

Primordiyal Foliküllerin Kontrol Grubu ile Kemoterapi Grubu, Kontrol grubu ile Kök hücre grubu ve Kemoterapi grubu ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Primer Foliküllerin Kontrol grubu ile Kemoterapi ve Kemoterapi grubu ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu, Kontrol grubu ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Sekonder Foliküllerin Kontrol grubu ile Kemoterapi grubu ve Kontrol grubu ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, Kemoterapi grubu ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Graaf Foliküllerin Kontrol grubu ile Kemoterapi grubu ve Kontrol grubu ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, Kemoterapi ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sekonder Atretik Foliküllerin Kontrol grubu ile Kemoterapi ve Kontrol grubu ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, Kemoterapi grubu ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Graaf Atretik Foliküllerin Kontrol grubu ile Kemoterapi grubu, Kontrol grubu ile Kök hücre grubu ve Kemoterapi ile Kök hücre grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

#### **4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular**

Her üç grupta da apoptotik hücreleri belirlemek için TUNEL boyaması yapıldı. Sitoplazmik kaspaz aktivasyonuna sahip hücreler, TUNEL boyaması ile işaretlenen DNA fragmentasyonuna sahip hücrelerde, nükleus boyanmalarını destekleyen kaspaz-3 immünohistokimyası yapılarak, görülmüştür.

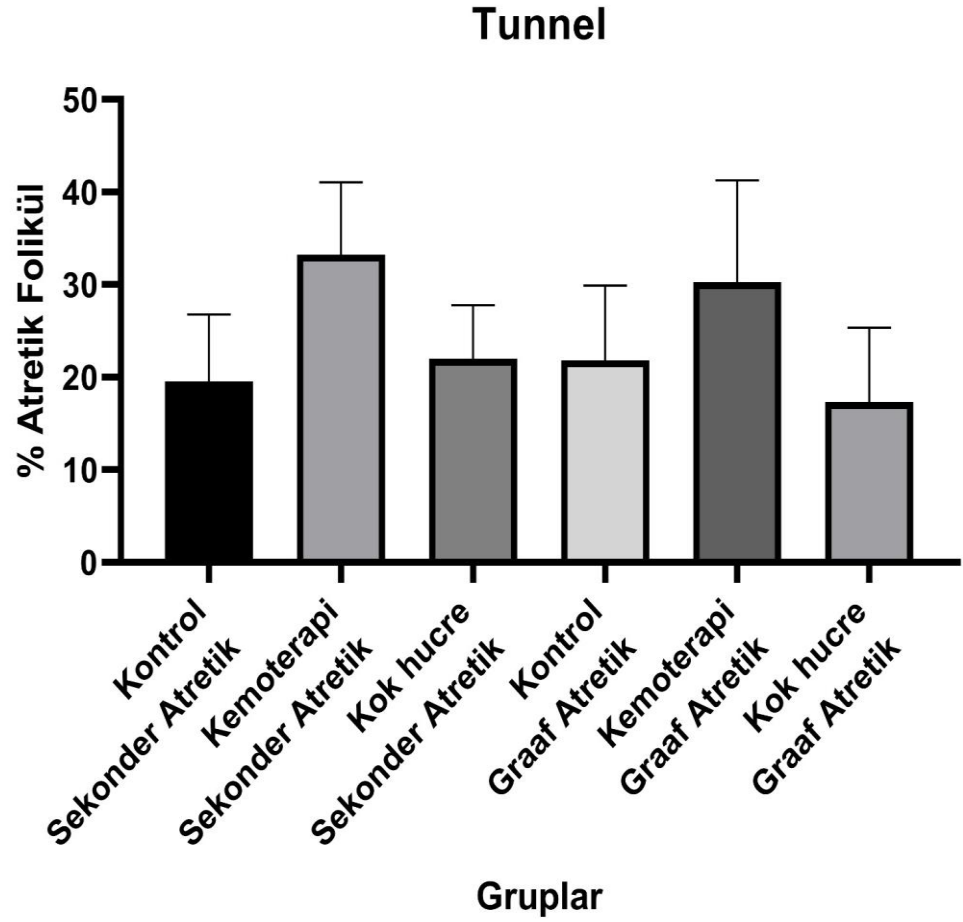
#### 4.4.1. TUNEL Bulguları

Tüm gruplara ait ovaryumda TUNEL yöntemi ile değerlendirilen atretik indeks (AI)'e ait Kruskal Wallis testi ile yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda gruplar arasında farklılıklar olduğu belirlendi.

Ovaryumdan alınan doku kesitlerinde sekonder folliküllerde Kontrol grubu ve Kemoterapi grubu birbiriyle karşılaştırıldığında Kemoterapi grubunda AI'in istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlendi. Kontrol grubu ve Kök hücre grubu ikili karşılaştırılmasında istatistiksel olarak AI'de anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kemoterapi grubunun Kök hücre grubu ile ikili karşılaştırılmasında istatistiksel olarak Kemoterapi grubunda AI'in anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi.

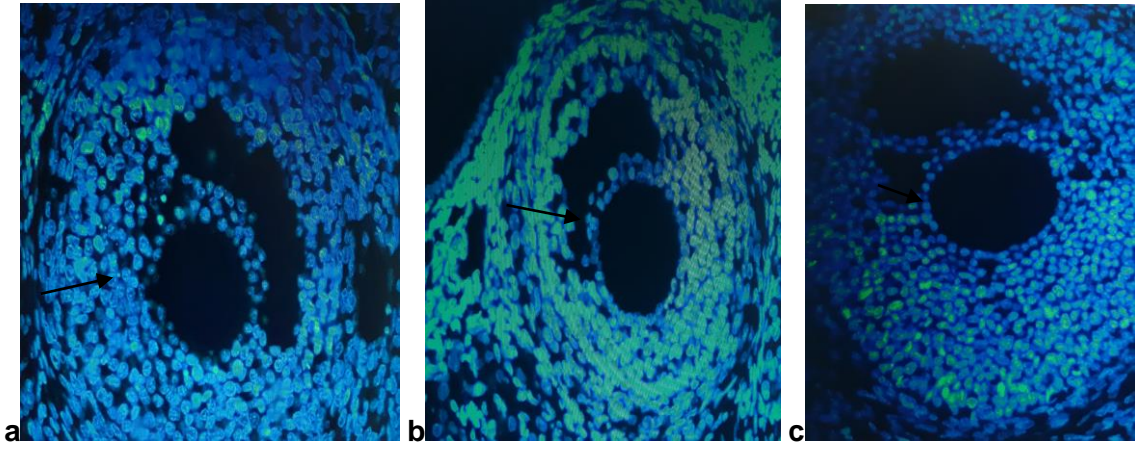
Ovaryumdan alınan doku kesitlerinde graaf folliküllerde Kontrol grubu ve Kemoterapi grubu birbiriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak Kemoterapi grubunda AI'in anlamlı şekilde arttığı belirlendi. Kontrol grubunun Kök hücre grubu ile ikili karşılaştırılmasında istatistiksel olarak AI'de anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kök hücre grubunun Kemoterapi grubu ile ikili karşılaştırılmasında Kemoterapi grubunun AI'in anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, Kemoterapi grubunda ovaryum korteks ve medulla stromasında ve gelişmekte olan folliküllerin granüloza hücrelerinde apoptotik aktivasyonun ve atretik follikül sayılarının diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak arttığı görüldü. Siklofosamid uygulaması sonrasında over dokusu kaynaklı stromal kök hücre verilen sıçanların ovaryum dokularında korteks ve medullada apoptotik aktivasyonun azaldığı, follikül sayılarında artış ile birlikte atretik follikül sayılarında azalma olduğu görüldü.

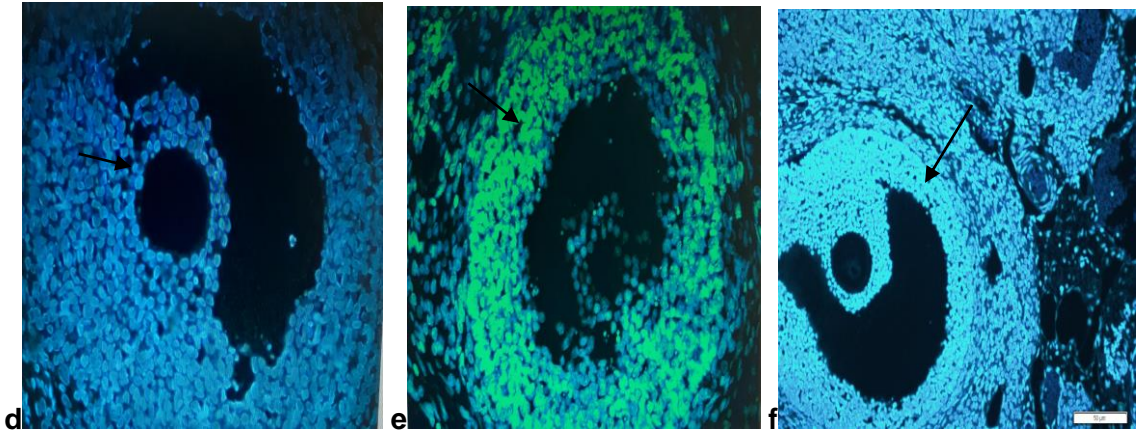


**Şekil 20.** TUNEL sonucu ovaryum Aİ sayıları.

Ovaryum kesitlerine uygulanan TUNEL boyama 2 bağımsız gözlemci tarafından değerlendirildi. Ovaryan folliküllerde TUNEL pozitif boyanma 0-2 arasında skorlandı ve bu skorlamaya göre; pozitif işaretlenen granüloza hücrelerinin oranı folliküldeki tüm granüloza hücrelerinin %5'inden az olanlar skor 0, %5-10 arasında olanlar skor 1, %10'undan fazla olanlar skor 2 olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve elde edilen TUNEL skor değerleri ile gruplar arasında folliküllerin apoptotik indeksi (Aİ) belirlendi. 13 TUNEL 2 skor değerine sahip folliküller atretik follikül olarak kabul edilip, her bir dokunun atretik follikül yüzdesi hesaplandı.

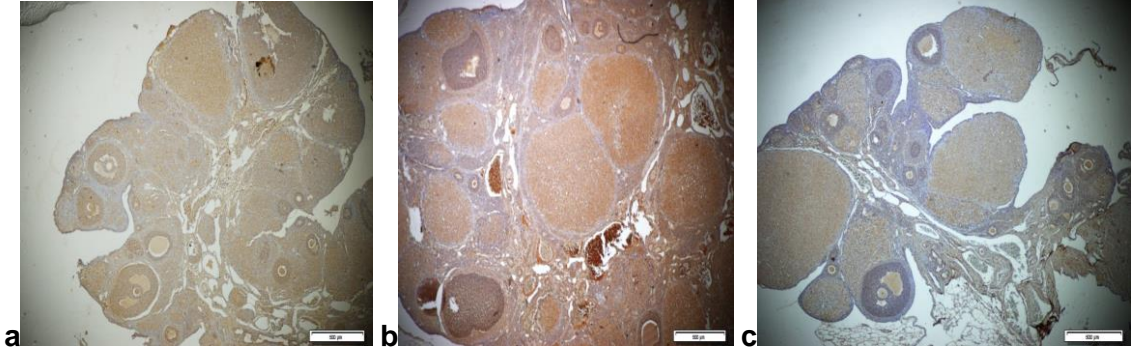


**Şekil 21.**a,b,c sırasıyla kontrol grubu sekonder follikül, kemoterapi grubu sekonder follikül, kök hücre grubu sekonder follikül.

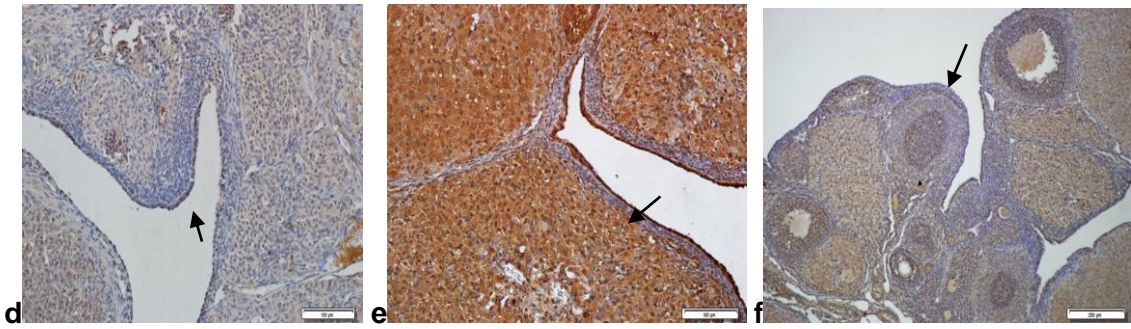


**Şekil 22.** d,e,f, sırasıyla kontrol grubu graaf follikül, kemoterapi grubu graaf follikül, kök hücre grubu graaf follikül.

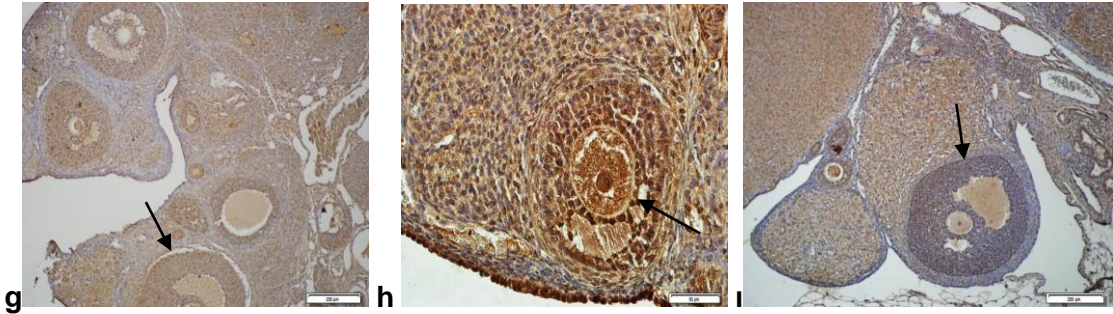
#### 4.4.2. Caspaz-3 Bulguları



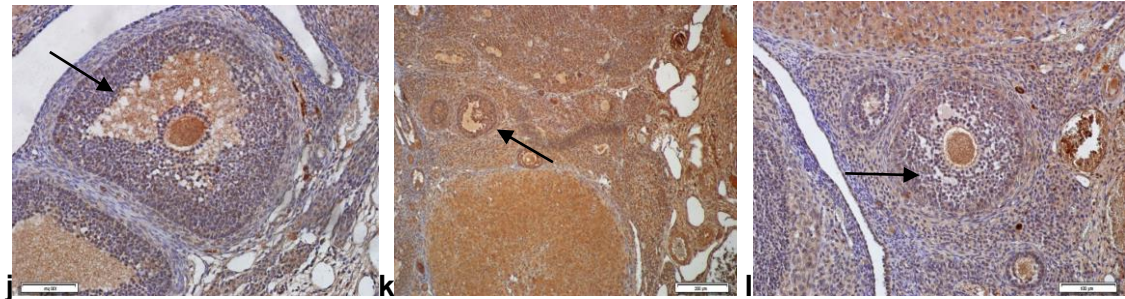
**Şekil 23.** a,b,c sırasıyla kontrol grubu genel görüntü, kemoterapi grubu genel görüntü, kök hücre grubu genel görüntüsü.



**Şekil 24.** d,e,f,sırasıyla kontrol grubu yüzey epiteli görüntüsü, kemoterapi grubu yüzey epiteli görüntüsü, kök hücre grubu yüzey epiteli görüntüsü.



**Şekil 25.** g,h,i sırasıyla kontrol grubu sekonder follikül görüntüsü, kemoterapi grubu sekonder follikül görüntüsü, kök hücre grubu sekonder follikül görüntüsü.



**Şekil 26.** j,k,l, sırasıyla kontrol grubu graaf folikülü görüntüsü, kemoterapi grubu graaf folikülü görüntüsü, kök hücre grubu graaf folikülü görüntüsü.



Tüm deney gruplarında kaspaz-3 ekspresyonlarına bakıldığında, kontrol grubunda kaspaz-3 pozitif apoptotik hücre sayısının en az olduğu, kemoterapi grubunda ise en fazla sayıda olduğu gözlemlendi. Sklofosfamidin ovaryumun hem folikül hücrelerinde hem de stromal hücrelerinde apoptozu artırdığı izlenmiştir. Kök hücre grubunda ise apoptotik hücre sayısının azaldığı görülmüştür.

## 5. TARTIŞMA

Kemoterapinin en önemli ve yaygın yan etkilerinden birisi infertilite ve prematür over yetmezliği (POY) dir. Kemoterapi alan kanser hastası kadınların yaşam kalitesini iyileştirmek için POY'un önlenmesi ve over follikül havuzunun korunması çok önemlidir. Yumurtalık dokusunun veya immatür (erken) oositin kriyoprezervasyonu doğurganlığın korunması için stratejiler arasında yaygın olarak düşünülse de bu yöntemler çeşitli faktörlerden dolayı sınırlıdır. Kök hücrelerin folikül havuzunu koruyabilme, kemoterapi sırasında follikül kaybını önleyebilen koruyucu ajanlara sahip olma veya restoratif (yenileyici) ve reperatif (onarıcı) etkilerinden dolayı mevcut (fertilite) doğurganlık koruma stratejilerine göre hastalar için daha uygun ve önemli avantajlar sağlabilecekleri düşünülmektedir. Kanser tedavisi sırasında kullanılan kemoterapi ovaryumda (yumurtalıkta) durgun folliküllerin anormal aktivasyonuna neden olur. Genç kadınlarda siklofosamid ile tedavi sonrasında hastaların %50'sinde POY gelişmektedir (Xiao GY vd 2016).

Kemoterapi ve radyoterapi alacak olan kanser hastalarında fertilitiyi koruma amacıyla uygulanmakta olan çeşitli yöntemler bulunmakla birlikte bu yöntemler tartışılmaktadır. Kanser hastalarında kemoterapi tedavisi sırasında GnRH agonistleri ile gonadları korumak test edilen yöntemlerden birisidir. Ancak yapılan çalışmalar GnRH agonistlerinin koruyucu olup olmadığına dair moleküler bir veri olmadığı için bu konuda araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bir başka yöntem olan ovaryan transpozisyonu pelvik bölgeye yapılacak olan radyoterapiden önce ovaryumların etkilenmesini engellemek için overlerin laparoskopi yöntemi ile ışınlama alanının dışına taşınmasıdır. Fakat kemoterapotikler sistemik etkili olduğundan bu yöntem ile overler yalnızca radyoterapinin zararlı etkisinden korunabilir. Yumurtaların dondurularak saklanması diğer bir yöntemdir ve bu yöntem oldukça başarılıdır. Bir başka yöntem olan antiapoptotik (Hücre ölümünü engelleyen) sfingozin-1-fosfat (S1P) gibi ajanlarla farmakolojik koruma ise henüz deneysel aşamdadır (Can a 2009).

Çok sayıda, karmaşık aşamalardan oluşan follikül gelişiminin aşamalarının herhangi birindeki bozulma üreme bozukluklarına ve infertiliteye yol açabilir. Siklofosamid tedavisi, aktif olarak büyüyen foliküllerin apoptozunu indükler ve

primordiyal follikülleri primer foliküllere aktive eder ve primordiyal follikül havuzunun "yok olmasına (burn-out)" neden olur. Deney hayvanlarında POY modeli oluşturmak için Siklofosfamid sıklıkla kullanılmaktadır (Takehara Y 2013).

Bu çalışmamızda sıçanlarda kemoterapi ajanı olarak Siklofosfamid kullandık. Siklofosfamid ile oluşturduğumuz ovaryum hasarında sıçan ovaryum dokusundan elde ettiğimiz stromal kök hücreleri ovaryumuna verip etkilerini araştırdık.

Kök hücreler tahrip olan ovaryum dokusu ve folikül onarımı ve sitokinlerle mikroçevre oluşturarak parakrin etki ile doku onarımını sağlarlar. Dokudaki diğer hücelere dönüşebilmektedirler ve bu sayede dokunun yenilenmesine de yardımcı olmaktadır. Farklı tekniklerle işaretlenen mezenikmal kök hücrelerin ovaryumlardaki foliküllerin teka tabakalarına kadar ulaştığı deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Takehara Y 2013). Artık kök hücreler pek çok hastalık için umut kaynağı haline gelmiş bulunmaktadır.

Birçok çalışmada deneysel olarak hayvanlarda overyan yetmezlik oluşturulup çeşitli kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler verilmiştir. Zheng ve ark. insan umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücreleri siklofosfamid ile overyan yetmezlik oluşturulan sıçanlara vermişlerdir ve NGF/TrkA sinyal yolunu (büyüme sinir faktörü-büyüme sinir faktörü reseptörü) incelemişlerdir. Verdikleri mezenkimal kök hücrelerin NGF/TrkA sinyal yolu üzerinden overyan mikroçevreyi ve folikülogenezi tamir ettiğini göstermişler; primordiyal foliküllerin büyümesi ve gelişmesinin oosit ve granüloza hücreleri ile birlikte koordineli bir şekilde olduğunu bildirmişlerdir (Zheng vd 2019). Afifi ve ark. siklofosfamid ile overyan yetmezlik oluşturdukları sıçanlara uyguladıkları mezenkimal kök hücrelerin overyan fonksiyonları düzelttiğini göstermişlerdir (Afifi vd 2013). Beşikçioğlu ve ark. siklofosfamid ile overyan yetmezlik oluşturdukları sıçanlarda overyan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücelere göre overyan hasarı daha iyi restore ettiğini yaptıkları çalışmada ifade etmişlerdir (Beşikçioğlu HE vd 2019). Peng ve ark. kemik iliğinden elde ettikleri mezenkimal kök hücrelerin siklofosfamid ile overyan yetmezlik oluşturdukları farelerde overyan yapıyı tamir ettiğini ve foliküler gelişimi sağladığını göstermişlerdir (Peng J vd 2018). Ding ve ark. insan amniyotik mezenkimal kök hücrelerin farelerde oluşan overyan doğal yaşlılığın etkilerini kök hücrelerin salgıladığı hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve epidermal büyüme faktörü aracılığıyla fonksiyonları düzelttiğini bulmuşlardır (Ding C vd 2018). Takehara ve ark. insan adipoz dokusundan elde ettikleri mezenkimal kök hücrelerin siklofosfamidle overyan yetmezlik oluşturdukları sıçanların overlerini restore ettiklerini ve rejeneratif tıpta faydalı

olabileceğini ifade etmişlerdir (Takeara Y vd 2013). Liu ve ark. overyan yetmezlik oluşturdukları farelere insan amniyotik sıvısından elde ettikleri mezenkimal kök hücreleri vermişlerdir. Çalışmanın sonunda foliküler gelişmenin sağlandığını; granüloza hücrelerinin proliferere olduğunu ve sekresyonların başladığını göstermişlerdir (Liu R vd 2019). Yang ve ark. insan göbek kordonundan elde ettikleri mezenkimal kök hücrelerin salgıladığı mikroveziküllerin farelerin ovaryumunda resterasyonunu ve angiogenezisi sağladığını bulmuşlardır (Yang Z vd 2019). Mohamed ve ark. insan kemik iliğinden elde ettikleri mezenkimal kök hücrelerin siklofosfamid ve busulfon ile overyan yetmezlik oluşturdukları farelere transplante etmişler folikülogenezin oluşturduğunu ve overyan hormon üretimi sağlandığını tespit etmişlerdir (Mohamed SA vd 2018). Mohamed ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada ise siklofosfamid ile ovaryen yetmezlik oluşturdukları farelere göbek kordonundan elde ettikleri mezenkimal kök hücreleri vermişler ve kemoterapiye bağlı hasarın fonksiyonel olarak düzeldiğini göstermişlerdir (Mohamed SA vd 2019). Lai ve ark. insan endometriyumdan elde ettikleri mezenkimal kök hücreleri busulfon ve siklofosfamid ile overyan yetmezlik oluşturdukları farelere vermişler overyan bozulmanın düzeldiğini ve mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif tıpta tedaviler için uygun bir strateji oluşturduğunu ifade etmişlerdir (Lai D vd 2015). Yin ve ark. insan plasentasından elde ettikleri mezenkimal kök hücreleri siklofosfamid ile overyan yetmezlik oluşturdukları farelere vermişler ve overyan fonksiyonların düzeldiğini görmüşlerdir (Yin N vd 2018). Li ve ark. perimenepozal sıçanlarda insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sıçanlarda parakrin mekanizmayla overyan fonksiyonları düzelttiğini ortaya koymuşlardır. Yapılan PCR ve western blot analizlerinde hepatosit büyüme faktörü (HGF), vasküler endotelial hücre büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1)'nin ekspresyonları ortaya konmuştur (Li J vd 2017). Zhu ve ark. Song ve ark. insan göbek insan göbek kordonundan izole ettikleri mezenkimal kök hücrelerin siklofosfamidle overyan yetmezlik oluşturdukları sıçanlara vermişler ve ovaryumların restore olduğunu göstermişlerdir (Zhu SF vd 2015). Song ve ark. insan göbek kordonundan elde ettikleri mezenkimal kök hücrelerin siklofosfamid ile overyan yetmezlik oluşturdukları sıçanlara vermişler; hormon sekresyonunun ve folikülogenezisin düzeldiğini hücrelerde apoptozisin azaldığını bildirmişlerdir (Song D vd 2016). Huang ve ark. siklofosfamid ile overyan yetmezlik oluşturdukları farelere adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde ettikleri eksozomları vermişler ve SMAD sinyal yolu aracılığıyla ile overyan fonksiyonlarda düzelme olduğunu görmüşlerdir (Huang B vd 2018). Huang B ve ark. fetal karaciğer kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin prematür overyan yetmezlik oluşturdukları bir modelde overyan fonksiyonları düzelttiğini göstermişlerdir (Huang B vd 2019). Liu T ve ark. insan amniyotik sıvısından elde ettikleri mezenkimal kök

hücrelerin prematür overyan yetmezlik oluşturdukları farelere transplante ettiklerinde hücrelerin canlılığını sürdürdüğünü ve proliferere olduğunu göstermişlerdir (Liu T vd 2012). Kemoterapik ajanların kullanılması overlerde mTOR sinyal yolunu aktive ederek foliküllerde azalmaya neden olur. mTOR (mammalian target of rapamycin) sinyal yolunun hücre büyümesi, çoğalması, metabolizması ve angiogeneziste önemli rolleri vardır. mTOR hücre içi bir serin/treonin protein kinazdır ve iki farklı kompleksten oluşur (mTORCH1 ve mTORCH2). Çalışmalarda mTOR sinyal yolunun ovaryum foliküllerinde granüloza hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir. mTOR sinyal yolunun aşırı aktivasyonunun polikistik over sendromuna ve ovaryum kanserine yol açtığı düşünülmektedir (Gorre N vd 2014, Liu AL vd 2016, Yaba A vd 2012). Rapamisin siklofosfamidle aktive olan PI3K/Akt/ mTOR sinyal yolunu inhibe ederek primordiyal follikül aktivasyonunu önler ve böylece folikül havuzu korunur (Zhou L vd 2017, Tong Y vd 2013, Sun X vd 2015, Cheng Y vd 2015).

Bütün bu çalışmalarda görüldüğü gibi çeşitli kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin overyan yetmezlik oluşturulan hayvanlara verilmiş ve overlerde folikülogenezin tekrar başladığı görülmüştür. Bizim bu çalışmadaki amacımız ise sıçanların ovaryum dokusundan elde ettiğimiz stromal kök hücreleri ovaryumuna verip etkilerini araştırmaktır.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada siklofosfamid sonrası over dokusu kaynaklı stromal kök hücre tedavisinin gonadotoksisiteye bağlı anormal morfolojili, atretik follikül sayısını azalttığı, normal follikül sayısının arttığı ve bu artışın kontrol grubu ve sadece over dokusu kaynaklı stromal kök hücre verilen sıçanların sonuçları ile korele olduğu görüldü. Over dokusu kaynaklı stromal kök hücre tedavisinin siklofosfamidin ovaryumda oluşturduğu doku hasarını ve foliküler kaybı düzelttiği görülmüştür. Kemoterapi sonrası uygulanacak over dokusu kaynaklı stromal kök hücre tedavisinin hem gelişmekte olan follikülleri hemde primordiyal follikül havuzunu korumada etkili olduğu görülmüştür.

Stromal kök hücreler siklofosfamidin neden olduğu hasarları parakrin etkisi ile tedavi etmektedir. Stromal kök hücre uygulaması hem primordial folikülleri hem de gelişen foliküllerin normal yapısını koruyarak ovulasyona ulaşmasını da sağlamaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma siklofosfamid sonrasında oluşan ovaryan toksisitede over dokusu kaynaklı stromal kök hücrenin koruyucu etkisinin olduğunu gösteren bir çalışma olup, fertilitiyi korumaya yönelik yaklaşımlara alternatif bir tedavi seçeneği olarak yönlendirici olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

Afifi Noha M, Reyad Olfat N. Role of mesenchymal stem cell therapy in restoring ovarian function in a rat model of chemotherapy-induced ovarian failure: a histological and immunohistochemical study *The Egyptian Journal of Histology* 2013 36(1):114–126 doi: 10.1097/01.EHX.0000423979.18253.10

Besikcioglu HE, Sarıbas GS, Ozogul C, Tiryaki M, Kilic S, Pınarlı FA et al. Determination of the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and ovarian stromal stem cells on follicular maturation in cyclophosphamide induced ovarian failure in rats. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2019 58(1):53-59 doi: 10.1016/j.tjog.2018.11.010.

Can A. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. TÜBA: Ankara, 2009: 15- 22

Carlson BM, Human Embryology and Developmental Biology. 5th Edition ed. 2014: Saunders.

Cheng Y, Kim J, Li XX, Hsueh AJ..Promotion of Ovarian Follicle Growth following mTOR Activation: Synergistic Effects of AKT Stimulators *PLoS One.* 2015 24;10(2):e0117769. doi: 10.1371/journal.pone.0117766

Ding C, Zou Q, Wang F, Wu H, Chen R, Lv J et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve ovarian function in natural aging through secreting hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Stem Cell Res Ther.* 2018 9(1):55 doi: 10.1186/s13287-018-0781-9.

Eroschenko VP, diFiore's Atlas of histology with functional correlations. 12th Edition 2013: Wolters Kluwer

Fortuno, C.; Labarta, E., Genetics of primary ovarian insufficiency: a review. *J Assist Reprod Genet* 2014, 31, (12), 1573-1585.

Gorre N, Adhikari D, Lindkvist R, Brannström M, Liu K ,Yan Shen Y. mTORC1 Signaling in Oocytes Is Dispensable for the Survival of Primordial Follicles and for Female Fertility. *PLOS One* 2014; 9(10) doi: 10.1371/journal.pone.0110491

Gülen H. Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. *Sağlıkta Birikim Dergisi* 2009;1(5):67-80.

He Y, Chen D, Yang L, Hou Q, Ma H, Xu X. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure *Stem Cell Research & Therapy* 2018 9(1):263 doi: 10.1186/s13287-018-1008-9

Huang B, Lu J, Ding C, Zou Q, Wang W, Li H.Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of premature ovarian insufficiency by targeting SMAD. *Stem Cell Res Ther* 2018 9(1):216. doi: 10.1186/s13287-018-0953-7.

Huang B, Qian C, Ding C, Meng Q, Zou Q, Li H. Fetal liver mesenchymal stem cells restore ovarian function in premature ovarian insufficiency by targeting MT1. *Stem Cell Res Ther* 2019 10:362 <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1490-8>

Jankowska K. Premature ovarian failure. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny* 2017 July 16(2): 51–56

Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burn out"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med*. 2013; 5(185):185ra62

Kara N, Tural S, Oktena G, Kocak I, Tekcan A Prematüre ovaryen yetmezlik ve 46,X,del(X)(q21). *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2012; 29:167-168.

Kara N, Tural S, Oktena G, Kocak I, Tekcan A Prematüre ovaryen yetmezlik ve 46,X,del(X)(q21). *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2012; 29:167-168.

Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler, Derya kitabevi, Trabzon: 2004;1-157.

Karaöz e. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu. Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma Merkezi, Kocaeli,2010

Kierszenbaum AL (2006) (ed. Demir R.) *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Palme yayıncılık, s:565-584.

Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and Cell Biology*. 4th Edition 2016: Saunders

Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *J Transl Med* 2015 13:155. doi: 10.1186/s12967-015-0516-y

Li J, Mao Q, He J, She H, Zhang Z, Yin C. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):55. doi: 10.1186/s13287-017-0514-5.

Liu AL, Liao HQ, Li ZL, Liu J ,Zhou CL,Guo ZF et al.New Insights into mTOR Signal Pathways in Ovarian-Related Diseases: Polycystic Ovary Syndrome and Ovarian Cancer, *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016; 17(12): 5087–5094. doi: 10.22034/APJCP.2016.17.12.5087

Liu R, Zhang X, Fan Z, Wang Y, Yao G, Wan X et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice. *Stem Cell Res Ther* 2019 10(1):299. doi: 10.1186/s13287-019-1315-9.

Liu T, Huang Y, Guo L, Cheng W, and Zou G. CD44+/CD105+ Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells Survive and Proliferate in the Ovary Long-Term in a Mouse Model of Chemotherapy-Induced Premature Ovarian Failure. *Int J Med Sci*. 2012; 9(7): 592–602.doi: 10.7150/ijms.4841

McGee EA, Hsubeh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21:200-14

Mescher AL. Junqueira's Temel Histoloji. Solakoğlu S, Çev. Ed, 13. Baskı,İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2015:449-458

Mohamed SA, Shalaby S, Brakta S, Elam L, Elsharoud A, Al-Hendy A. Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells as an Infertility Treatment for Chemotherapy Induced



Premature Ovarian Insufficiency. *Biomedicines* 2019 7(1)  
doi:10.3390/biomedicines7010007.

Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, Brakta S, Hill WD, Ismail N et al. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reprod. Sci* 2018 25(1):51-63. doi: 10.1177/1933719117699705.

Nelson LM, Anasti JN, Kinzey JN et al. Development of luteinised Graffian follicles in patient with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1470-75

Peng J, Xiao N, Cheng L. Therapeutic potential of BMSCs for premature ovarian failure in mice. *J Cent South Univ (Med Sci)* 2018 43(1):7-13 doi:10.11817/j.issn.1672-7347.2018.01.002.

Rastegar F, Shenaq D, Huang J, Zhang W, Zhang BQ, Cheng He B et al. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications *World J Stem Cells* 2010 2(4): 67-80 doi: 10.4252/wjsc.v2.i4.67

Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S. Oocyte-Specific Deletion of *Pten* Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool. *Science*. 2008 1;319(5863):611-3. doi: 10.1126/science.1152257.

Ross MH (2011) *Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molacular Biology*. 6th edition ed. Vol. LWW: 6th edition.

Ross MH, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. Baykal B, Çev. Ed, 6.Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2014: 830-39.

Ross MH, Pawlina WP. *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* 7th Edition: 2016 Wolters Kluwe

Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *BioMed Research International* 2016 Mar: 2517514

Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *Biomed Res Int* 2016;2016:2517514. doi: 10.1155/2016/2517514.

Sun X, Su Y, He Y, Zhang J, Liu W, Zhang H et al. New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. *Cell Cycle*. 2015;14(5):721-31. doi: 10.1080/15384101.2014.995496.

Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, Kuroda T, Yamadera R, Sano C et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Laboratory Investigation* 2013,93;181-193

Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, Kuroda T, Yamadera R, Sano C et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function *Lab Invest* 2013 93(2):181-93. doi: 10.1038/labinvest.2012.167

Tong Y, Li F, Lu Y, Cao Y, Gao J, Liu J. Rapamycin-Sensitive mTORC1 Signaling Is Involved in Physiological Primordial Follicle Activation in Mouse Ovary. *Mol Reprod Dev*. 2013 Dec;80(12):1018-34. DOI:10.1002/mrd.22267.

Tuch BE "Stem cells — a clinical update". *Australian Family Physician* 2006; 35 (9): 719–21

Ünal F. Ratlarda siklofosfamide bağlı ovaryan toksisitenin azaltılmasında nasetilsistein ile artırılmış hücre içi glutatyon düzeyinin rolünün araştırılması (Tıpta Uzmanlık Tezi). İstanbul. İstanbul Üniversitesi. 2009

Xiao GY, Cheng CC, Chiang YS, Cheng WTK, Liu IH, Wu SC. Scientific. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. Reports 2016; 6, Article number: 23120

YabaA, DemirN. The mechanism of mTOR (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS) J Ovarian Res. 2012; 5: 38. doi: 10.1186/1757-2215-5-38

Yang Z, Du X, Wang C, Zhang J, Liu C, Li Y et al. Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived microvesicles on premature ovarian insufficiency in mice Stem Cell Res Ther 2019 10(1):250. doi: 10.1186/s13287-019-1327-5.

Yin N, Zhao W, Luo Q, Yuan W, Luan X, Zhang H. Restoring Ovarian Function With Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in Autoimmune-Induced Premature Ovarian Failure Mice Mediated by Treg Cells and Associated Cytokines. Reprod Sci 2018 25(7):1073-1082 doi: 10.1177/1933719117732156.

Zheng Q, Fu X, Jiang J, Zhang N, Zou L, Wang W et al. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation Prevents Chemotherapy Induced Ovarian Failure via the NGF/TrkA Pathway in Rats. Biomed Res Int 2019: 6539294 doi:10.1155/2019/6539294

Zhou L, Xie Y, Li S, Liang Y, Qiu Q, Lin H et al. Rapamycin Prevents cyclophosphamide-induced Over-activation of Primordial Follicle pool through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in vivo. J Ovarian Res. 2017 16;10(1):56. doi: 10.1186/s13048-017-0350-3.

Zhu SF, Hu HB, Xu HY, Fu XF, Peng DX, Su WY et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries. J Cell Mol Med 2015 19(9):2108-17. doi: 10.1111/jcmm.12571

## 9. EKLER



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı :60758568-020/33047  
Konu :Başvurunuz hk.

05/06/2020

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL

İlgi :10/02/2020 tarihli dilekçeniz

**"Deneysel Olarak Siklofosfamid ile Ovaryan Yetmezlik Oluşturulan Sıçanlarda Over Dokusu Kaynaklı Stromal Kök Hücrelerin Foliküller Üzerine Etkisi"** konulu PAUHADYEK-2020/10 no'lu çalışmanız **01.06.2020** tarih ve **2020/02** sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, çalışmanın adının **"Deneysel Olarak Siklofosfamid ile Ovaryan Yetmezlik Oluşturulan Sıçanlarda Over Dokusu Kaynaklı Stromal Kök Hücrelerin ovaryum dokusu üzerine Etkisi"** olarak değiştirilmesinin **Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna** oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE  
Başkan