



Ovaryum Dokusunun Eksplant Kültürü

Explant Culture of Ovarian Tissue

Murat Serkant Ünal¹, Elif Önder¹, Nazlı Çil¹, Hatice Şiyzen Çoban¹, Mücahit Seçme², Gül Yıldırım¹, Gülçin Abban Mete¹

¹Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

²Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

Özet

Amaç: Ovaryum dokusu eksplant kültürü oluşturarak dokulardan göç eden stromal hücreleri izole etmeyi, çoğaltmayı ve karakterize etmeyi hedefledik.

Gereç ve Yöntem: 2 adet 4 haftalık (prepubertal) dişi Wistar Albino tipi sıçanların ovaryum dokularından eksplant kültürler oluşturuldu. Daha sonra proliferasyon gösteren ovaryan stromal hücrelere 2. pasajda (P2) flow sitometri analizi yapılarak CD29, CD54, CD90 (mezenkimal kök hücre yüzey antijeni) ve CD45 (hematopoetik kök hücre yüzey antijeni) ifadelerine bakıldı.

Bulgular: Kültür ortamındaki hücrelerin proliferasyon yetenekleri ve morfolojik özellikleri seri pasajlar yapılarak incelendi. Stromal hücreler 2. günde dokulardan göç ederek kültür kaplarına yapıştılar ve çoğalıp 7. günde konflue (%70-80) oldular. Kültür ortamındaki ovaryan stromal hücrelerin morfolojileri, faz kontrast mikroskopu ile incelendiğinde iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olarak görüldü. Stromal hücre çoğalan kültür kaplarında mikroskop altında yapılan sayımda sırasıyla 2×10^6 ve 1.5×10^6 hücrenin ürediği gözlemlendi. İzole edilen ovaryan stromal hücrelerin flow sitometri analizlerinde CD54, CD90 ve CD45 yüzey antijenlerini ekspres ettikleri, CD29 yüzey antijenlerini ise ekspres etmedikleri belirlendi.

Sonuç: Yapılan analizde kültür ortamında izole edip, ürettiğimiz ovaryan stromal hücrelerin hem hematopoetik hem de mezenkimal kök hücre belirteçlerinden bazılarını ekspres ettiklerini belirledik.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültür teknikleri; kriyoprezervasyon; stromal hücreler.

Abstract

Introduction: In this study, it was aimed to isolate, reproduce and characterize stromal cells migrating from tissues by creating ovarian tissue explant culture.

Materials and Methods: Explant cultures were formed from ovarian tissues of 4 week old (prepubertal) two female Wistar Albino type rats. Then, the expression of CD29, CD54, CD90 (mesenchymal stem cell surface antigen) and CD45 (hematopoietic stem cell surface antigen) was investigated by performing flow cytometry analysis on proliferating ovarian stromal cells in the 2nd passage (P2).

Results: The proliferation abilities and morphological characteristics of the cells in the culture medium were examined by serial passaging. Stromal cells migrated from the tissues and adhered to the culture dishes within the second day. They were confluent (79-80%) on the 7th day. The morphology of the ovarian stromal cells in the culture medium was observed as spindle-shaped and fibroblast-like cell aggregates when examined by phase contrast microscopy. When the proliferating stromal cells were counted under the microscope in culture dishes, 2×10^6 and 1.5×10^6 cells were observed to grow, respectively. In flow cytometry analysis of isolated ovarian stromal cells, it was determined that they expressed CD54, CD90 and CD45 surface antigens, but did not express CD29 surface antigens.

Conclusion: In the analysis, we determined that the ovarian stromal cells we isolated and produced in the culture medium expressed hematopoietic and some mesenchymal stem cell markers.

Keywords: Cell culture techniques; cryopreservation; stromal cells.

Giriş

Ovaryum, germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı yassı epitelden, kübik epitele kadar değişkenlik gösteren modifiye pelvik mezotel ile çevrelenmiştir (1). Ovaryum korteks ve medulla'dan oluşmaktadır. Ovaryum folikülleri korteksin stromasında yerleşmiştir. Ovaryumun yapısal birimi olan folliküller, oositlere mikroçevre oluştururlar. Oositin çevresindeki folikül hücrelerinin dış yüzeyi bazal lamina ile sınırlandırılmıştır ve çevresinde stromal hücreler

bulunur. Stromal hücrelerin dağılımı da siklulara bağlı değişikliklerden (foliküllerin gelişmesi, ovulasyon ve korpus luteum) oldukça çok etkilenir. Özellikle graaf folikülden oositin atılmasından sonra meydana gelen korpus luteum çok büyük hacimlere ulaşır ve hem hücrelerin hem de gelişen foliküllerin yerlerini değiştirir (2,3). Ovaryumda en çok bulunan folikül çeşidi primordiyal foliküldür (1). Primordiyal foliküller tek sıralı yassı folikül hücreleriyle çevrili bir primer oosit içerir. Daha sonra gelişen primer

*Sorumlu Yazar: Murat Serkant Ünal, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye
E-mail: msunal@pau.edu.tr Orcid: Murat Serkant Ünal [0000-0003-1992-7909](https://orcid.org/0000-0003-1992-7909), Elif Önder [0000-0002-7187-1669](https://orcid.org/0000-0002-7187-1669), Nazlı Çil [0000-0002-2164-8688](https://orcid.org/0000-0002-2164-8688), Hatice Şiyzen Çoban [0000-0003-4269-3979](https://orcid.org/0000-0003-4269-3979), Mücahit Seçme [0000-0002-2084-760X](https://orcid.org/0000-0002-2084-760X), Gül Yıldırım [0000-0001-9099-515X](https://orcid.org/0000-0001-9099-515X), Gülçin Mete [0000-0001-6794-3685](https://orcid.org/0000-0001-6794-3685)

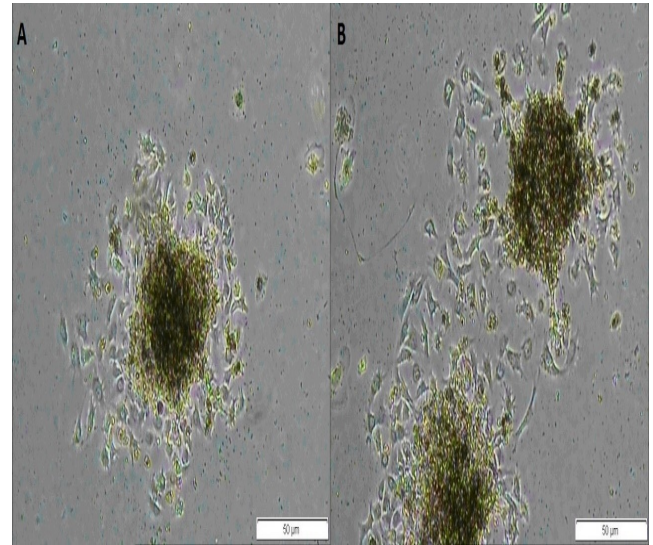
foliküllerdeki granüloza hücreleri proliferasyona uğrayınca stromal hücreler folikülün teka tabakasını oluşturur (4). Teka tabakası da teka interna ve eksterna olarak iki kısma ayrılır. Teka interna epiteloid karakterde salgı hücrelerinden oluşur ve damarlanma yönünden zengindir. İçerisinde fibroblastlar, kollajen lifler vardır. Mural granüloza hücrelerine komşu teka interna tabakasında androjen prekürsoru olan androstenedion, testosteron, dihidrotestosteron sentezlenir. Androstenediyon granüloza hücrelerine taşınır ve aromataz (CYP19A1) tarafından östrodiyole (E2) çevrilir. Mural granüloza hücreleri östrojenlerin üretimi için gerekli enzimlere sahip değildir. Graaf foliküllerindeki granüloza hücreleri FSH reseptörleri yanında LH reseptörleri de kazanırlar ve bu korpus luteumun lutenizasyonu için gereklidir. Teka eksterna tabakasında ise myofibroblastlar, tip I ve tip III kollajen lifler bulunur. En büyük çapa sahip ve olgunlaşmış foliküller graaf foliküllerdir. Oosit, graaf folikül içerisinde etrafı kumulus granuloza hücreleriyle çevrili olarak bulunur. Mural granüloza hücreleri ise bütün folikül boyunca uzanmaktadır (1,5,6). Ovulasyon, graaf folikülünden sekonder oositin atılması sürecidir. Stromal hücrelerin morfolojisi korteks ve medullada farklıdır. Fibroblastlara benzeyen stromal hücrelerin, mezenkimal hücre topluluğundan kaynaklandığına inanılmaktadır. Kortekste, stromal hücreler yüzeye paralel olarak düzenlenir ve yuvarlak bir yapıdadır. Medullada ise hücreler rastgele bir organizasyon sergiler ve uzun bir yapıya sahiptir (7). Ovaryum üzerinde şimdiye kadar yapılan çalışmaların çoğunda yapısal birimler olan foliküllere ve oositlere odaklanılmıştır. Bizim bu çalışmadaki amacımız overyan stromal hücreleri izole etmek, karakterizasyonunu yapmak ve özelliklerini incelemektir. Overyan stromal hücrelerle ilgili özelliklerin daha ayrıntılı olarak bilinmesi over dokusunun dondurulması ve çözülmesi sürecinde, fertilitenin korunmasına yönelik olarak kriyoprezervasyon tekniklerin geliştirilmesine neden olabilir.

Gereç ve Yöntem

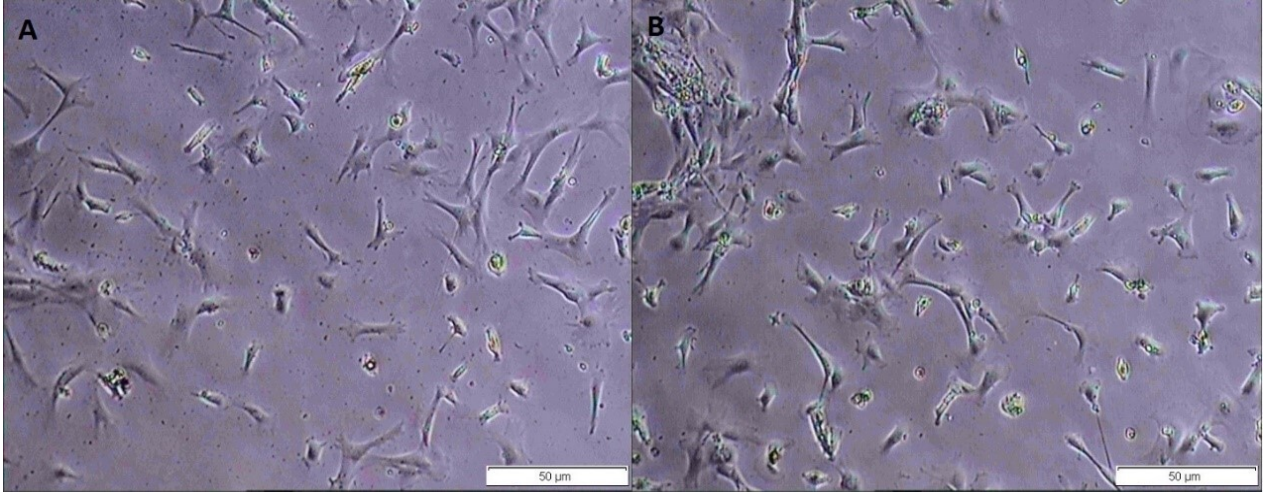
Çalışmamız Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 10.02.2022 tarih E.165378 sayılı kararı ile onaylandı. 2 adet 4 haftalık dişi Wistar Albino tipi sıçan Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Dişi sıçanların ovaryumları anestezi altında 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 kabininde 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. Dokular %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı. 24. saatte kontaminasyon ve hücre kontrolleri yapıldı. Komplet besiyeri Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (Capricorn Scientific, Germany), %10 Fetal Bovine Serum FBS (Capricorn Scientific, Germany), %0.5 Penisilin-Streptomisin (Pan Biotech, Germany) içermektedir. 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 tespit edildi. Tüm bu aşamalar invert mikroskop (CKX41 Olympus, Japan) kullanılarak gözlendi. 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.

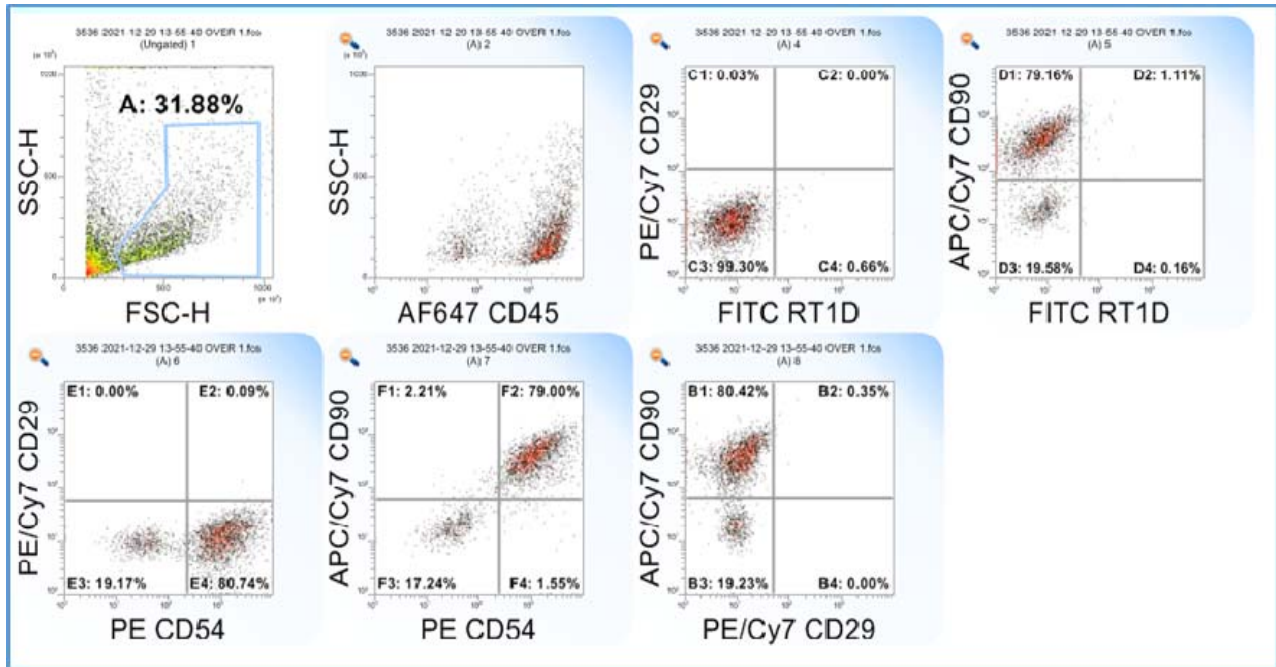
İstatiksel Analiz: Bu çalışmada elde edilen sonuçlar bir ön veri çalışmasının sonuçları olarak değerlendirilmiş olup, istatistiksel anlamlı sonuç elde edebilmek için denek sayısının bu çalışmadakinden çok artırılması gerektiği istatistiksel güç analizi ile tespit edilmiştir.



Resim 1. 2. günde stromal hücrelerin ovaryum dokusundan (PO) migrasyonu.



Resim 2. Overyan stromal hücrelerin (P0) morfolojik görünüşleri.



Resim 3. Overyan stromal hücrelerle (P2) yapılan flow sitometri analizinde CD54, CD90, CD45 yüzey antijenlerinin ekspresyonu olduğu ve CD29 yüzey antijeninin ise ekspresyon olmadığı gösterilmiştir.

Bulgular

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 (Resim-1) ve çoğalıp 7. günde konflue (%70-80) oldular. Kültür ortamındaki stromal hücrelerin morfolojileri, faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olarak görüldü (Resim-2). Hücreler, konfluent hale

geldikten sonra pasajlanarak çoğaltıldı. Eş zamanlı olarak bazı plate'lerde sadece ovaryum yüzey epiteli çoğalırken, bazı plate'lerde bu hücrelerle birlikte stromal hücrelerin de çoğaldığı görüldü. Bazı plate'lerde ise sadece stromal hücrelerin proliferasyonu olduğu izlendi. Stromal hücre çoğalan kültür kaplarında mikroskop altında yapılan sayımda sırasıyla 2×10^6 ve 1.5×10^6 hücrenin ürettiği 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. Stromal hücrelerle yapılan flow sitometri analizinde CD54, CD90, CD45 yüzey antijenlerinin eksprese olduğu fakat CD29 yüzey antijeninin ise eksprese olmadığı görülmüştür (Resim-3).

Tartışma

Ovaryum temel olarak parankim ve stroma olmak üzere iki bileşimden oluşur. Foliküller parankimi oluştururken, stroma folikülleri destekleyici bölüm olarak görev yapar. Ovaryum stromasında immün hücreler, endotelial hücreler, perivasküler hücreler, kan ve lenf damarları, ekstrasellüler matriks içeriği, tunika albuginea, rete ovarii, overyan yüzey epitel hücreleri, hilar hücreler, mevcudiyeti tartışmalı olan overyan kök hücreler, ovaryumun tanımlanmamış stromal hücre topluluğu olarak; fibroblast benzeri hücreler, iğ şeklinde hücreler ve interstisyel hücreler bulunur. Stromal hücreler tek bir homojen hücre topluluğunu oluşturmaz (2,8). Over yüzey epitel kültürlerde izole edildiği zaman morfolojik görünümünün cobblestone tarzında (Arnavut kaldırımı) olduğu görülmüştür (9,10). İn vitro kültürlerde, ovaryum yüzeyi epitel hücrelerin epitelial-mezenkimal geçişe uğradığı ve zamanla sitokeratin ifadelerini kaybettiği gösterilmiştir (11). Teka hücrelerinin kökeninin kortikal veya meduller stromal hücreler olup olmadığı uzun süredir devam eden bir araştırma konusu olmuştur. Yapılan çalışmalarda kortikal stromal hücrelerin, granüloza hücrelerinin varlığında aktif olarak teka hücrelerine dönüştüğü görülmüştür. Oositten kaynaklanan büyüme farklılaşma faktörü (GDF-9) ise teka hücrelerinin farklılaşmasını sağlar. Erken folikül gelişimi aşamasında teka hücrelerinden kaynaklanan çözünür büyüme faktörleri, granüloza hücrelerinin proliferasyonuna neden olurken aynı zamanda bu hücrelerin apoptozunu baskılar. Over korteksinden izole edilen stromal hücrelerin oranlarının 95.4 ± 3.4 , mezenkimal hücre (vimentin), 6.6 ± 1.8 endotelial hücre (von-Willebrand faktör) olduğu, medulladan izole edilen hücrelerin ise oranlarının $92.3 \pm 6.6\%$, mezenkimal hücre, 10.8 ± 2.5 ise endotelial hücre olduğu gösterilmiştir (12-17). Yapılan çalışmalarda ovaryum biyopsilerinde dokunun korteks bölümünden overyan stromal hücreler kültür ortamında izole edilmiştir. Daha sonra endotelial hücre (CD34 eksprese eden) içeren stromal hücreler ve endotelial hücreleri içermeyen stromal hücreler olarak iki gruba ayrılmıştır. Araştırmacılar bu iki grup hücreyi fibrin pıhtıları içinde farelere transplante (ksenotransplantasyon) ederek greftlerin durumlarını değerlendirmişlerdir. Greftlerde

endotelial hücreleri içeren overyan stromal hücrelerin, endotelial hücreleri içermeyen overyan stromal hücrelere göre kanlanmalarının ve canlılıklarının daha iyi durumda olduğunu göstermişlerdir (18). Fabbri ve ark. kadın over dokularının korteks bölümünden stromal hücreleri izole ederek in vitro kültürlerini yapmışlardır. Yaptıkları immunofloresan ve RT-PCR analizleriyle bu hücrelerin mezenkimal hücre belirteci olan vimentini eksprese ettiklerini, epitel hücre belirteci olan sitokeratin-8 (CK-8) ise eksprese etmediklerini göstermişlerdir. Daha sonra hücrelere doksorubisin ve sisplatin uyguladıklarında bu kemoterapötik ilaçların stromal hücrelerdeki çoğalmayı apoptozis mekanizması ile durdurduğunu göstermişlerdir (19). Lopes ve ark. insan ve sıçan over doku kültürü oluşturarak kemoterapötik ajanlar olan sisplatin ve doksorubisinin farklı dozlarını tekli veya kombine olarak uygulamışlardır. Kemoterapötik ajanların sağlıklı foliküllerin sayısını düşürdüğünü ve stromal hücrelerde apoptozisi artırarak proliferasyonu azalttığını göstermişlerdir (20). Başka bir çalışmada kadın hastaların ovaryum dokularının korteks bölümünden overyan hücreler izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Hücrelerin %84'nün vimentini (mezenkimal hücre belirteci) eksprese ettiğini, %3'nün CD31'i (endotelial hücre belirteci) eksprese ettiğini, %1'inde inhibin α 'y (granüloza hücre belirteci) eksprese ettiğini ve büyük çoğunluğun stromal hücre olduğunu göstermişlerdir (21). Jabara ve ark. menapoz sonrası kadınlardan alınan over stromal hücrelerin izolasyonunu yaparak kültüre etmişler ve homojen morfolojide olan bu hücrelerin vimentini güçlü bir eksprese ettiklerini, sitokeratin 18'i ise zayıf bir şekilde eksprese ettiğini bildirmişlerdir (22). Chen ve ark. maymunların ovaryumlarının korteks bölümünden tekal kök hücre (TSC) izolasyonunu yaparak kültüre etmişlerdir. Teka hücreleri teka kök hücrelerinden farklılaşır ve folikülogenezde önemli rol oynarlar. Teka kök hücrelerinin iğ şeklindeki fibroblastlara benzediğini; kendini yenileme (self-renewal) ve farklılaşma özelliklerinin olduğunu göstermişlerdir. Bu hücrelerin mezenkimal hücre belirteçleri olarak NESTİN, VİMENTİN, (PDGFR α) ve CD271'i eksprese ettiğini fakat CD90, CD73, CD105 belirteçlerini ise eksprese etmediklerini bildirmişlerdir. Prematür overyan yetmezlik modelinde yaptıkları otolog transplantasyonla bu hücrelerin ovaryumdaki fonksiyonları düzelttiğini göstermişlerdir (23). Cui ve ark. prepubertal (3 ve 4 haftalık) sıçanların ovaryumlarının korteks bölümünden overyan stromal hücreleri izole etmişlerdir. İmmunofloresan teknikle hücrelerin

vimentini (mezenkimal belirteç) eksprese ettiğini, sitokeratin 8 (epitelyal belirteç) ve faktör 8'i ise (endotelyal belirteç) eksprese etmediğini göstermişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda ise stromal hücrelerin foliküllerdeki teka interna hücrelerine ve teka eksternadaki myofibroblastlara farklılaştıkları bildirilmiştir (5). Soares ve ark. menapoz öncesi kadınların (34-49 yaş) overlerinin korteks ve medullar bölgelerinden stromal hücreler izole ettiler. Daha sonra iki grup oluşturularak (korteks ve medulladan izole edilmiş stromal hücreler) ve (korteks ve medulladan izole edilmiş; yavaş dondurma tekniğiyle dondurulmuş stromal hücreler) çözme sonrası bu hücreleri enkapsüle bir şekilde fibrin pıhtılar içinde farelere transplante (ksenotransplantasyon) ettiler. Greftlerde mezenkimal hücre belirteci olarak vimentin, endotelyal hücre belirteci olarak CD34, proliferasyon belirteci olarak Ki-67 kullanılmıştır. Greftlerdeki kanlanmanın ve canlılığın dondurulma işlemi yapılmayan meduller stromal hücrelerle yapılan transplantasyonlarda daha fazla olduğu göstermişlerdir. Meduller bölgede kortekse göre daha fazla sayıda endotelyal hücre olduğu için, greftlerin kanlanmasının daha iyi olduğunu bildirdiler (24). Beşikçiöglü ve ark. fetal ovaryum dokularından overyan stromal kök hücreleri (OSSCs) eksplant kültür yöntemiyle izole etmişlerdir. Daha sonra sıçanlarda bir kemoterapik ajan olan siklofosfamidle prematur overyan yetmezlik modeli oluşturmuşlardır. Ovaryum dokularından izolasyonunu yaptıkları OSSCs'nin flow sitometri analizinde CD 90 ve CD49 belirteçlerini eksprese ettiklerini fakat CD45 ve CD 11b/c belirteçlerini eksprese etmediğini göstermişlerdir. Ayrıca bu hücrelerin yağ, kemik ve kıkırdak hücrelerine farklılaştığını bildirdiler. Kemik iliğinden elde ettikleri mezenkimal kök hücreleri (BMMSCs) ve overyan stromal kök hücreleri prematür overyan yetmezlik oluşturdukları sıçanlara vermişler; overyan stromal kök hücrelerin foliküllerin tekrar yapılması aşamasında kemik iliğinden elde ettikleri mezenkimal kök hücrelere göre daha etkili olduklarını bulmuşlardır (25). Ying ve ark. over foliküllerinden (3-5 mm) elde ettikleri folikül sıvısından ekstrasellüler vezikül (EV) izole ettiler. Daha sonra sığır over dokularının korteks tabakasından stromal hücreleri izole edip kültüre ettiler. Farklı dozlarda uyguladıkları (0, 10, 30, 100 µg/ml) ekstrasellüler veziküllerin kortikal stromal hücrelerin proliferasyonunu ve salgıladıkları androstenedion, progesteron hormonlarını artırdığını bildirdiler. EV'lerin 100 µg/ml dozunun ovaryum stromal hücreleri üzerinde en fazla etkiye sahip olduklarını gösterdiler (26). Birçok çalışmada, over dokusunun yavaş teknikle

dondurulmasının dokulardaki folikülleri korumasına rağmen stromal hücrelere zarar verdiği bildirilmiştir. Ovaryum dokusu için geliştirilecek kriyoprezervasyon stratejileri tüm doku bileşenlerinin korunmasını amaçlamalıdır. Fabri ve ark. 15 kadın hastanın ovaryum dokularını küçük parçalara bölerek hızlı dondurma (vitrikasyon) yöntemiyle dondurmuştur. Vitrikasyon ve çözme sonrasında yapılan ışık mikroskopisinde granüloza ve stromal hücrelerin iyi bir şekilde korunduğunu ama oositin nükleusunun düzensizleşmiş ve kromatinin hafifçe kalınlaşmış olduğunu göstermişlerdir. Elektron mikroskopisiyle (TEM) yapılan çalışmalarda ise oositlerin nükleuslarının hafif düzensiz bir şekile ve ince dağılmış kromatine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Yaptıkları TUNEL tekniğiyle ovaryumdaki stromal hücrelerde, apoptozisin oluşmadığını göstermişlerdir (27). Genç kadın hastalar için over kortikal dokularının dondurularak saklanması ve sonrasında transplantasyonu şu an için fertilitenin korunması için tek yol olarak sunulmaktadır. Bu yöntem ise tüm hastalar için uygun bir seçenek değildir. Alternatif olarak elde edilen foliküllere kombine olarak *in vitro* büyüme (IVG) ile birlikte *in vitro* olgunlaşma (IVM) tekniklerinin uygulanarak primordiyal folikülden graaf foliküle kadar folikül kültürlerinde gelişimlerinin sürdürülmesi ve matür oosit elde edilmesi yönünde çalışmalar devam etmektedir (28). Liu ve ark. farelerin ovaryum dokularından preantral folikülleri izole etmişlerdir. *In vitro* kültür ortamında farelere rekombinant gonadotropinler uygulayarak graaf foliküller elde etmişler ve bu foliküllerin %90'nın hayatta kaldığını gözlemlemişlerdir. Foliküllerin %53,5'inin MII oositleri ürettiğini ve elde edilen MII oositlerinin %50'sinin döllenenek blastosist aşamasına ulaştığını bildirmişlerdir (29).

Çalışma Sınırlandırmaları: Stereomikroskop altında ovaryum dokusu çevresindeki adipoz dokudan ve yüzey epitelinde dikkatli bir şekilde eksize edilerek ayrılmıştır. Buna rağmen farklı hücre kontaminasyonları görülen petri kapları deneye alınmamış sadece overyan stromal hücrelerin proliferasyonu olduğu hücre kültürleriyle çalışmaya devam edilmiştir.

Sonuç

Çalışmamızda overyan stromal hücreler izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Overyan stromal hücrelerin hem hematopoetik hem de mezenkimal kök hücre belirteçlerinden bazılarını eksprese ettikleri belirlenmiştir.

Etik Onam: Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından

10.02.2022- tarih E.165378 sayılı kararı ile onaylandı.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Finansal Beyan: Bu çalışma için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

Yazar Katkıları: Makalenin ana fikrinin belirlenmesi, literatür taranması, makalenin yazımı ve materyallerin seçimi MSÜ, EÖ, NÇ, HŞÇ, MS, GY ve GAM tarafından yapıldı.

Teşekkür: Yardımlarından dolayı Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinde görevli olan Öğr. Görevlisi Mehmet Başeğmez, Öğr. Görevlisi Barboros Şahin ve Vet. Hekim Abdullah Coğupluğil'e teşekkür ederiz. Ayrıca yapılan flow sitometri analizindeki destekleri için Nepenthe Araştırma Teknolojileri Şirketi temsilcisi İrem Eltutan'a şükranlarımızı sunuyoruz.

Kaynaklar

1. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Baykal B, Çev. Ed. Ankara: Palme Yayıncılık, 2014: s784–830.
2. Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang FL, Moravek MB, Xu M, Padmanabhan V. et al. The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction* 2020;160(3):25-39.
3. Junoquira LC, Carneiro J. Temel Histoloji text-atlas. Solakoğlu S, Aytekin Y, Çev. Ed. İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri, 2009; s435-455.
4. Elder K, Dale B. In-vitro fertilizasyon, 3. Baskı. İrez T, Çev. Ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2013; s1–108.
5. Cui L, Bao H, Liu Z, Man X, Liu H, Hou Y. et al. hUMSCs regulate the differentiation of ovarian stromal cells via TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway to inhibit ovarian fibrosis to repair ovarian function in POI rats. *Stem Cell Res Ther* 2020;11(1):1-12.
6. Ünal MS, Kabukçu C. Isolation of Human Cumulus Granulosa Cells. *Van Med J* 2022; 29(1): 84-89.
7. Tagler, DJ, Shea, LD, Woodruff, TK. Contributions of ovarian stromal cells to follicle culture. *Principles and Practice of Fertility Preservation*. Cambridge University Press 2011;s409-420.
8. Wagner M, Yoshihara M, Douagi I, Damdimopoulos A, Panula S, Petropoulos S. et al. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell

- populations but no oogonial stem cells. *Nat Commun* 2020;11(1):1-14.
9. Dunfield LD, Shepherd TG, Nachtigal MW. Primary culture and mRNA analysis of human ovarian cells. *Biol Proced Online* 2002;28(4):55-61.
10. Kruk PA, Bandiera SLM, Auersperg N. A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab Invest* 1990;63(1):132-136.
11. Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3(17):1-13.
12. Orisaka M, Tajima K, Mizutani T, Miyamoto K, Tsang BK, Fukuda S. Granulosa Cells Promote Differentiation of Cortical Stromal Cells into Theca Cells in the Bovine Ovary. *Biol Reprod* 2006;75(5):734-740.
13. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res* 2009;2(1):1-7
14. Parrott JA, Skinner MK. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: Effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol Reprod Dev* 2000;55(1):55-64.
15. Qiu M, Quan, F, Han C, Wu B, Liu J, Yang Z. et al. Effects of granulosa cells on steroidogenesis, proliferation and apoptosis of stromal cells and theca cells derived from the goat ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;138:325-333.
16. Qiu M, Liu J, Han C, Wu B, Yang Z, Su F. et al. The Influence of Ovarian Stromal/Theca Cells During In Vitro Culture on Steroidogenesis, Proliferation and Apoptosis of Granulosa Cells Derived from the Goat Ovary. *Reprod Dom Anim* 2014;49:170–176.
17. Matur İ, Solmaz S. Ovarian foliküler gelişiminin moleküler temelleri. *Arşiv kaynak tarama dergisi* 2010;19:193-205.
18. Dath C, Dethy A, Van Langendonck A, Van Eyck AS, Amorim CA, Luyckx V. et al. Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. *Human Reproduction* 2011;26: 1431-1439.
19. Fabbri R, Macciocca M, Vicenti R, Paradisi R, Klinger FG, Pasquinelli G. et al. Doxorubicin and cisplatin induce apoptosis in ovarian stromal cells obtained from cryopreserved human ovarian tissue *Future Oncol* 2016;12(14):1699-1711.

20. Lopes F, Liu J, Morgan S, Matthews R, Nevin L, Anderson RA. et al. Single and combined effects of cisplatin and doxorubicin on the human and mouse ovary in vitro. *Reproduction* 2020;159(2):193-204.
21. Shahri PAK, Chiti MC, Amorim CA. Isolation and characterization of the human ovarian cell population for transplantation into an artificial ovary. *Anim Reprod* 2020;16(1):39-44.
22. Jabara S, Christenson LK, Wang CY, McAllister JM, Javitt NB, Dunaif A. et al. Stromal Cells of the Human Postmenopausal Ovary Display a Distinctive Biochemical and Molecular Phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):484-492.
23. Chen H, Xia K, Huang W, Li H, Wang C, Ma Y. et al. Autologous transplantation of thecal stem cells restores ovarian function in nonhuman primates. *Cell Discovery* 2021;7(75):1-16.
24. Soares M, Sahrari K, Chiti MC, Amorim CA, Ambroise J, Donnez J. et al. The best source of isolated stromal cells for the artificial ovary: medulla or cortex, cryopreserved or fresh? *Hum Reprod* 2015;30(7):1589-98.
25. Besikcioglu HE, Saribas GS, Ozogul C, Tiryaki M, Kılıç 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.
26. Ying W, Hengqin W, Xiaomei W, Yunqi Z, Yong Z, Fusheng Q. Extracellular vesicles of bovine small follicular fluid promote ovarian cortical stromal cell proliferation and steroidogenesis. *Reprod Domest Anim* 2021;56(11):1425-1434.
27. Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, Pasquinelli G, Paradisi R, Battaglia C. et al. Good Preservation of Stromal Cells and No Apoptosis in Human Ovarian Tissue after Vitrification. *Biomed Res Int* 2014;2014(1):1-7.
28. Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian Follicle Culture: Advances and Challenges for Human and Non-human Primates. *Fertil Steril* 2013;99(6):1523-1533.
29. Liu HC, Zhiying He, Rosenwaks Z. In vitro culture and in vitro maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fert and Steril* 2002;77(2):373-383.