TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OVER TORSİYON-DETORSİYONUNDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN ETKİSİ

NEVİN ERSOY

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2014

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc- 2011970025

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OVER TORSİYON-DETORSİYONUNDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN ETKİSİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEVİN ERSOY

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. H.Alper BAĞRIYANIK

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2013. KB. SAG.034 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc- 2011970025

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Nevin ERSOY'un **'Over Torsiyon-Detorsiyon'unda Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisi'** konulu Yüksek Lisans tezini 10/01/2014 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Doç. Dr. H.Alper BAĞRIYANIK

BAŞKAN

Doç. Dr Çetin PEKÇETİN

ÜYE

Doç. Dr Müge KİRAY

ÜYE

Prof. Dr Neşe ATABEY

ÜYE (YEDEK)

Doç. Dr Işıl TEKMEN

ÜYE(YEDEK)

İÇİNDEKİLER……i
TABLO DİZİNİ iii
ŞEKİL DİZİNİ iv
KISALTMALAR vi
ÖZET 1
ABSTRACT 3
1. GİRİŞ VE AMAÇ 5
2.GENEL BİLGİLER 8
2.1.Ovaryum 8
2.1.1.Ovaryumun Anatomisi 8
2.1.2. Ovaryumun Embriyolojisi 10
2.1.3.Ovaryum Histolojisi 12
2.1.4. Ovaryum Fizyolojisi 21
2.1.5.Rodentlerde Follikül Gelişminin Kronolojisi 22
2.1.5.1.Östrus Siklusu 23
2.2. Ovaryum Torsiyon ve Detorsiyonu 23
2.3. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem 24
2.3.1. İskemi/Reperfüzyon'un Biyokimyası 26
2.4. Kök Hücre 29
2.4.1. Kök Hücre Tanimi ve Kriterleri 29
2.4.2. Plastisite 30
2.4.3. Kök Hücre Sınıflandırılması 30
2.5. MKH'nin Biyolojik ve Fonksiyonel Tanımlanması 34
2.5.1. İmmünfenotipleme 34
2.5.2. Kök Hücre Rezervuarları (Niche) 35
2.5.3.MKH' lerin Kültür Koşullarında Büyüme ve Çoğalması 35
2.5.4. Adezyon Molekülleri 35
2.5.5. Kemokin ve Kemokin Reseptörleri 36
2.5.6. Farklılaşma 36
2.5.7.MKH' lerin Hipoimmünojenik Özelliği ve Klinik Kullanım Alanları 36
3. GEREÇ VE YÖNTEM 39
3.1. Araştırmanın Tipi 39

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı 39
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları 39
3.4. Çalışma Materyali 40
3.5. Araştırmanın Değişkenleri 40
3.6. Veri Toplama Araçları 40
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler 40
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler 40
3.6.2.1. Histokimyasal İncelemeler 40
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi 51
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi 52
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları 52
3.10 Etik Kurul Onayı 52
4. BULGULAR 53
4.1. Kök Hücrelerin Farklılaştırılmasının Görüntülenmesi 53
4.1.1.Kök Hücrelerin Yüzey Markırlarıyla İşaretlenmesi 54
4.2. Morfometrik Değerlendirmeler 57
4.2.1. Ovaryum Hacim Hesabı 57
4.2.2. Folikül Sayısının Değerlendirilmesi 59
4.3. Işık Mikroskobik Bulgular 62
4.3.1. Hematoksilen&Eozin Boyama Değerlendirmesi 62
4.3.2. Masson Trikrom Boya Değerlendirmesi 71
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular 72
4.4.1. TUNEL Boyama Değerlendirmesi 72
4.4.2. Aktif Kaspaz-3 Değerlendirmesi 77
4.5. Biyokimyasal Değerlendirme 82
4.5.1. MDA Düzey Değerlendirmesi 82
5. TARTIŞMA 84
6. SONUÇ 87
7. KAYNAKLAR 88
8.EKLER 100

TABLO DİZİNİ

Tablo 1 . Rutin doku takibi protokolü. 41
Tablo 2 . Hematoksilen-Eozin boya protokolü. 42
Tablo 3 . Masson Trikrom boya protokolü. 43
Tablo 4 . Gruplar arası hacim oranlarındaki istatistiksel farklar 58
Tablo 5 . Gruplar arası folikül sayılarındaki istatistiksel farklar 60
Tablo 6 . TUNEL pozitif boyanan hücre verilerinin gruplar arası istatistiksel farklılıklar 73
Tablo 7 . Aktif Kaspaz-3 pozitif boyanan hücre verilerinin gruplar arası istatistiksel farklılıkları 79

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Ovaryumun şematik görüntüsü 15
Şekil 2. Primordial folikül 16
Şekil 3. Primer folikül 17
Şekil 4. Sekonder folikül 18
Şekil 5. Tersiyer (Graaf) Folikül 19
Şekil 6. Rodentler ve insanlarda prepuberte ve puberte aşamasında folikül gelişimi süreleri . 22
Şekil 7. İnsan dişi üreme sisteminin genel görünüşü. 24
Şekil 8. Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşan ürünler. 25
Şekil 9. Hücrede oksidatif ve antioksidan sistemin basit bir şeması 26
Şekil 10. Kök hücre tedavisi 37
Şekil 11. Alizarin red S boyası ile boyanan Ca depozitleri. 53
Şekil 12. Red-oil boyasıyla boyanan yağ dropletleri 54
Şekil 13. İn-vitro ortamda mezenkimal kök hücrelerin İng β1 yüzey markırıyla pozitif işaretlenmesi. (Floresan mikroskobu, X20) 55
Şekil 14. İn-vitro ortamda MKH'lerin CD54 yüzey markırıyla pozitif boyanması (Floresan mikroskobu, (a) X10, (b)X20'lik büyütmede) 55
Şekil 15. İn-vitro ortamda MKH'lerin İng β1 ve CD54 yüzey markırlarıyla double pozitif boyanması (Floresan mikroskobu, X10) 56
Şekil 16. İn-vitro ortamda MKH'lerin CD45 ve CD14 ile negatif boyanması. (floresan mikroskobu, X10) 56
Şekil 17. Gruplar arasındaki ovaryum hacim oranları 59
Şekil 18. Gruplar arası folikül sayılarının ortalaması 61
Şekil 19. Gruplar arası primordiyal folikül sayılarının ortalaması 61
Şekil 20. Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X20) 63
Şekil 21. Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X40) 63
Şekil 22. Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X40) 64
Şekil 23. Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X10) 64
Şekil 24. Torsiyon grubuna ait ovaryum kesitleri.(H&E, X10) 65
Şekil 25. Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X20) 65
Şekil 26. Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. (H&E, X4) 66
Şekil 27. Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X10) 66
Şekil 28. Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X20) 67
Şekil 29. MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X10) 67
Şekil 30. MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X20) 68
Şekil 31. MKH grubuna ait ovaryum kesiti. (H&E, X20) 68
Şekil 32. T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X4) 69
Şekil 33. T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X10) 69
Şekil 34. T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(H&E, X20) 70
Şekil 35. Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. (Masson Trikrom, X10) 71

Şekil 36. Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti 71
Şekil 37. T/D grubuna ait ovaryum kesiti. 71
Şekil 38. MKH grubuna ait ovaryum kesiti 71
Şekil 39. T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti.....71
Şekil 40. TUNEL pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması.....74
Şekil 41. Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti.(Tunel, X20) 75
Şekil 42. Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti.(Tunel, X20) 75
Şekil 43. Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti.(Tunel, X20) 76
Şekil 44. MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(Tunel, X20) 76
Şekil 45. T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(Tunel, X20).....77
Şekil 46. Aktif Kaspaz-3 pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması 78
Şekil 47. Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti.(Aktif kaspaz-3, X40).....80
Şekil 48. Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti.(Aktif kaspaz-3, X40).....80
Şekil 49. Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti.(Aktif kaspaz-3, X40).....81
Şekil 50. MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(Aktif kaspaz-3, X40) 81
Şekil 51. T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(Aktif kaspaz-3, X40) 82
Şekil 52. Gruplar arası MDA seviyesi farklılıkları 83

KISALTMALAR

FSH: Folikül Stimülan Hormonu

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon

GPx: Glutatyon Peroksidaz

GSH: Glutatyon

CAT: Katalaz

H&E: Hematoksilen Eozin

LH: Luteinizan Hormon

MDA: Malondialdehit

SOD: Superoksitdismutaz

PAS: Periyodik Asit Schiff

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling

OMI : Oosit maturasyon İnhibitörü

ZP : Zona Pellusida

hCG : Koryonik Gonadotropin Hormonu

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormon

NK : Doğal Öldürücü Hücreler

O^{-}_{2} : Süperoksit Anyonu

OH^{-} : Hidroksil Radikali

NO^{-} : Nitrik oksit

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

OX : Ksantin Oksidaz

XDH : Ksantin Dehidrogenaz

KH : Kök Hücre

MKH : Mezenkimal Kök Hücre

HKH : Hematopoietik Kök Hücre

TBF : Testis Belirleyici Faktör

FITCH : Floresein İzotiyosiyanat

PE : Fikoeritrin

OVER TORSİYON/DETORSİYONUNDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN ETKİSİ

Nevin ERSOY, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Narlıdere, İzmir, nevinersoy@gmail.com

ÖZET

Amaç:

Over torsiyonu acil müdahele gerektiren cerrahi bir patolojidir. İhmal edilmiş ya da geç kalınmış olgularda kan akımı uzun süre kesildiğinden over dokusunda nekroz meydana gelir. Yani overlerde geri dönüşümsüz hasarlar oluşmaktadır. Bu da kadınlarda infertiliteye neden olmaktadır.

Mezenkimal kök hücreler genetik ve metabolik hastalık için umut verici sonuçlar ortaya koymuştur. Biz de bu çalışmada sıçanlarda deneysel oluşturulmuş over torsiyonunda mezenkimal kök hücre(MKH) uygulamasının doku onarımındaki katkısının histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelemeyi amaçladık.

Yöntem:

35 adet Wistar suşu dişi sıçanlar (200-250g) rastgele 5 gruba ayrıldı (n=7). Grup I, Kontrol Grubu: Hiçbir müdahale yapılmayan grup (n=7). Grup II, Torsiyon Grubu (T): 2 saat torsiyonun uygulandığı grup (n=7). Grup III, Torsiyon/Detorsiyon Grubu (T/D): 2 saat torsiyon süresini takiben 2 hafta detorsiyon uygulanan grup (n=7). Grup IV, Mezenkimal Kök Hücre Grubu (MKH); Torsiyonun uygulanmadığı, sadece over başına $1x10^6$ mezenkimal kök hücrenin enjekte edildiği grup (n=7). Grup V, Torsiyon/Detorsiyon+Mezenkimal Kök Hücre Grubu(T/D+MKH); 2 saat torsiyon süresi sonunda ovaryumlara $1x10^6$ mezenkimal kök hücrenin enjekte edilip 2 hafta detorsiyon uygulanan grup (n=7). Deney sonunda deneklerin ovaryum dokuları cerrahi yöntemlerle alındı. Histokimyasal incelemeler için Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Masson Trikrom ve immünohistokimyasal olarak da apoptozun belirlenmesi için TUNEL ve Aktif Kaspaz- 3 boyamaları yapıldı. Deneylerde iskemi-reperfüzyon modelinin oluşup oluşmadığını incelemek için ise biyokimyasal olarak doku homojenatlarında total glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri incelendi. Gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak Kruskal Wallis, Mann Whitney-U ve ANOVA testi ile değerlendirildi.

Bulgular:

Kontrol grubunda her iki ovaryumda da korteks bölgesinde çok sayıda primordiyal, primer, sekonder, graff folikül ve korpus luteumların gözlenmesini yanında medullada bulunan kan damarları ve bağ dokusu yapısı normal histolojik yapıda gözlendi. Torsiyon grubunda bunun aksine, deneklerin her iki ovaryumunun medulla bölgesinde şiddetli hemoraji gözlendi. Ayrıca bu gruptaki deneklerin ovaryumunda primordiyal foliküllerin sayısı azalırken, atretik folikül sayısında çok ciddi bir artış olduğu gözlendi. T ve T/D grubundaki primordiyal folikül sayılarının kontrol grubuna göre azaldığı tespit edildi. Yapılan immunohistokimyasal incelemeler sonucu T ve T/D grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptotik hücre sayısında ciddi bir artış olduğu, MKH ve T/D+MKH grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ise apoptotik hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak bir fark olmadığı gözlenmiştir. Biyokimyasal olarak T grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında MDA seviyesi çok ciddi bir artış göstermiştir.

Sonuç:

Torsiyon ve torsiyon/detorsiyonun oksidatif strese ve apoptoza bağlı histolojik doku hasarını arttırdığını ve ayrıca biyokimyasal değişikliklere neden olduğunu gözlemledik. Mezenkimal kök hücrelerin de bu hasarı en aza indirgediğini saptadık. Sonuç olarak ovaryum torsiyon/detorsiyonundan etkilenen primordiyal folikül sayısının mezenkimal kök hücre tedavisi ile korunabileceğini söylemek mümkündür.

Anahtar kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, Ovaryum, Torsiyon, Detorsiyon, İskemi, Reperfüzyon, Sıçan

EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELL ON TORSİON/DETORSİON RAT OVARY

ABSTRACT

Objective:

Ovarian torsion is a surgical pathology that requires immediate intervention. Necrosis occurs in the tissue blood flow of the ovary is interrupted for a long time. Ovary consist of irreversible damage. It also causes infertility in women.

Mesenchymal stem cells have revealed promising results for genetic and metabolic disease. In this study we aimed to investigate effect of mesenchymal stem cell on experimentally induced ovarian torsion/detorsion ischemia/reperfusion injury of female rats by using different morphometric, immunohistochemically and biochemical analysis.

Method:

In this study, thirty-five female Wistar rats (200-250 gr) were divided randomly into five groups (n=7). Group I, Control group; No application was performed to this animals. Group II, Torsion group(T); Torsion was performed for 2 hours. Group III, Torsion/Detorsion(T/D) group; Following 2 hours torsion, detorsion was performed for 2 weeks. Group IV,Mesenchymal Stem cell injected group(MSC); Ovary torsion was not performed. Only $1x10^6$ mesenchymal stem cells were injected into for each ovary. Group V,Torsion/Detorsion+MSC group(T/D+MSC); After torsion was performed for 2 hours, $1x10^6$ mesenchymal stem cells were injected into each ovary and following 2 weeks detorsion was performed. Both ovaries were surgically removed from all groups. Ovary tissue slides were stained with Hematoxylene&Eosine (H&E) and Masson Trichrome for histochemical analysis. Glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were also evaluated in order to understand whether ischemia and/or ishemia/reperfusion worked properly in the experiments. Further, apoptosis were analysed both by TUNEL assay and immunostaining of active form of Caspase 3. Results were statistically compared between groups by using Kruskal Wallis, Mann Whitney-U and ANOVA tests with SPSS 15.0.

Results:

In control group, both ovary tissues had normal histological structures including many primordial, primer, seconder, mature follicles and corpora lutea in the ovary cortex as well as normal blood vessel and connective tissue organization in medulla. Contrarily, there was severe hemorage in medulla of both ovaries in the animals that torsion was performed (Group T). Additionally, atretic follicle numbers were increased significantly, while there was a decrease in primordial follicule numbers in these animals. Primordial follicle numbers were low in the ovaries of T and T/D group's animals with respect to control group. Based on immunohistochemical analysis, apoptotic cell death was increased significantly in both T and T/D groups as compared with control group. MCS and T/D+MCS group were observed no significant difference in number of apoptotic cells compare with control group. Furthermore, Level of MDA was significant increased in T group animals as compare with control groups.

Conclusion:

We found that torsion and torsion/detorsion caused increase in histological tissue damage including oxidative stress and apoptosis as well as biochemical changes in ovary. And mesenchymal stem cell minimize damage effect of torsion/detorsion in ovary tissue. In conclusion it is possible to tell that treatment of MSC migth be possible way to protect the numbers of primordial follicule affected by torsion/detorsion in ovary.

Key Words: Mesenchymal Stem Cell, Ovary, Torsion, Detorsion, Ischemia, Reperfusion, Rat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Over torsiyonu ilk kez 1865'te C. Rokitansky tarafından tanımlanmış ve o günden bu yana bir çok araştırmacı bu konu ile ilgilenmişlerdir (1). Daha çok üreme çağında karşımıza çıkan adneksial torsiyon (2), ender olarak preoperatif tanı konulabilen acil bir klinik durumdur.

Over torsiyonu kadınlardaki şiddetli karın ve kasık ağrılarının nadir görülen ancak çok önemli bir nedenidir. Klinik bulgular, çoğu zaman sadece over torsiyonunda karşılaşılan durumlar olmadığından tanıda gecikilmesi çok ciddi ve istenmeyen sonuçlar doğurabilir. Over torsiyonu nadir görülen bir durumdur ve cerrahi müdahale gerektiren jinekolojik acil durumlar arasında 5. sırada yer alır.

Genelde kist ya da başka bir sebebe bağlı olarak büyümüş olan overlerde ortaya çıkar ancak çok nadiren tüp ve etrafındaki dokularda aşırı bir spazm ya da aşırı genişlemiş yani varisleşmiş damarlara bağlı olarak normal boyutlardaki overlerde de görülebilmektedir. Tüplerin aşırı uzun olması gibi bazı doğuştan gelen nedenler de torsiyona yol açabilmektedir. Over torsiyonu hemen her zaman tek taraflıdır ve daha çok sağ tarafta gözlenir.

Her yaştaki kadında görülebilmekle birlikte olguların %70-75'i otuz yaşın altındadır. Bununla birlikte rapor edilen over torsiyonlarının %20'si gebe kadınlarda ortaya çıkmaktadır.

Over tosiyonun nedenini saptamak her zaman mümkün değildir ancak normalden büyük, ağır ve hareketli bir over olması temel risk faktörüdür. En büyük risk grubunu overlerdeki dermoid kistler oluşturmaktadır. İçinde yağ, saç, diş gibi pekçok madde bulunan bu kistler oldukça ağırdırlar ve overlerde aşırı hareketliliğe neden olabilirler. Over torsiyonu olgularının %51-80'ninde neden dermoid kisttir. Öte yandan yardımcı üreme tekniklerinde overlerlerin uyarılması sonucu da benzer bir durum ortaya çıkar ve bu durum da over torsiyonu açısından risk oluşturur. Bir diğer risk faktörü de gebeliktir.Gebelik sırasında büyüyen overlerin kendi etraflarında dönme olasılığı artar. Daha nadir görülmekle birlikte over tümörleri de bu duruma neden olabilir.

Over torsiyonunda, dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik etkenle tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulması ve oksijensiz kalması yani iskemi durumu ortaya çıkmaktadır. Devamında bu olayın düzenlenmesinde tekrar dokunun oksijenlenmesi ve beslenmesinin düzeltilmesi durumuna ise reperfüzyon denilmektedir. Tıbbın pek çok dalında iskemi ve reperfüzyonun yer aldığı olgular karşımıza çıkabilmektedir. Yanık, sepsis, şok gibi durumlarda ortaya iskemik hasar ve bu durumların geriye

döndürülmesinde ise reperfüzyon hasarı oluşabilmektedir (3). Adneksal torsiyon oksijenin azalmasına neden olarak dokuda laktik asit ve hipoksantin ile lipid peroksitlerin artışına neden olarak iskemik hasara neden olabilir. Koruyucu uygulama olarak ovaryumda birbirine dolanmış segmentlerin detorsiyon yapılması uygulaması reperfüzyon benzeridir. Hipoksik dokunun oksijenlenmesi çok daha ciddi doku hasarına yol açar.

Detorsiyon, hasarın ileri derecede artmasına sebep olan diğer bir işlemdir. İskemik dokuda kan akımının tekrar düzenlenmesi reperfüzyon süresince ksantin oksidaz (XO) enzimiyle hipoksantinin ürik aside dönüştürülmesine yol açar.Bu esnada oldukça fazla oksijen radikali oluşur. Bu radikaller protein, nükleik asit ve lipitlerle etkileşirler. Lipid peroksidasyonuna ve diğer makromoleküllerde oksidan hasarlara neden olurlar. Bu duruma da reperfüzyon hasarı denir. Dokuda meydana gelen hasar, iskemi ve reperfüzyon sonucu meydana gelen hasarların toplamıdır (4, 5). Erken dönemde fark edilip ameliyat edildiğinde kalıcı hasar olmaz. Ancak ihmal edilmiş ya da geç kalınmış olgularda kan akımı uzun süre kesildiğinden over dokusunda nekroz meydana gelir. Yani overlerde geri dönüşümsüz hasarlar oluşmaktadır. Bu da kadınlarda infertiliteye neden olmaktadır.

Serbest radikallerin zarar verici etkileri birçok hastalığın nedeni olarak gösterilmektedir. Kardiyovasküler, akciğer ve karaciğer rahatsızlıkları ile kanser ve yaşlanma, dokularda oluşan lipit peroksit ürünlerinin büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Lipitler serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller, yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna neden olurlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasarı kendi kendini devam ettiren zincirleme bir reaksiyon olup, geri dönüşümsüz membran hasarlarına neden olmaktadır (6). İskemi ve reperfüzyon beyin, kalp, kas gibi dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna yol açar (7). ROT ve onların ürünleri hücre membranlarında hasara neden olmaktadır (8). Süperoksit radikali, hidroksil radikali gibi ROT, iskemi/reperfüzyon boyunca doku hasarının patogenezinde işe karışmaktadır (9).

Kök hücre; uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneğinde olan, özelleşmemiş, farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneği olan ve hasarlı dokularda dokunun işlevini kazanmasını sağlayan hücrelerdir. Bu özellikleriyle vücuttaki somatik hücrelerden farklıdırlar. Kök hücreler farklı uyaranlarla değişik vücut hücrelerine dönüşümlerini gerçekleştirir ve vücudumuzdaki hemen tüm hücre çeşitlerine dönüştürülebilir.

Henüz bilinen üç tip kök hücre bulunmaktadır: Totipotent Hücre, Pluripotent Hücre ve Multipotent Hücre (10).

Totipotent hücre tek başına bir organizmayı oluşturacak güce sahipken, Pluripotent hücre bilinen tüm hücre tiplerine dönüşebilmekte ancak bir organizmayı oluşturamamaktadır. Multipotent hücre bulunduğu doku ve organdaki hücre tiplerine dönüşebilmesine karşın diğer hücre tiplerine dönüşememektedir.

Kök hücre kaynaklarına baktığımızda 3 çeşit kaynaktan söz edebiliriz. Bunlardan ilki embriyonel kök hücredir. Bu kök hücreler embriyo halindeki canlıdan elde edilen hücrelerdir. İkinci kaynak fetüs kök hücreleri iken üçüncü kaynak ise erişkin kök hücreleridir.

Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, yağ, tendon, kas gibi farklı mezenkimal dokulara ‘in vitro’ veya ‘in vivo’ olarak dönüşebilen multipotent, hematopoetik olmayan hücrelerdir (11). Bunlar kemik iliği hücrelerinin yaklaşık %0,01 ile %0,001’ini oluşturur (12). Cam ve plastiğe yapıştıkları için hematopoetik kök hücrelerden kolaylıkla ayrılabilirler (13). Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ, kas, deri gibi dokularda bulunurlar (14).

Mezenkimal kök hücrelerin en önemli özelliklerinden birisi, alıcıda inflamasyonu ve immunolojik yanıtları baskılamasıdır (15, 16).

Mezenkimal kök hücrelerin, in vitro birçok değişik hücre tipine farklılaşmaları, kültür koşullarında kolayca çoğalabilmeleri, genetik olarak stabil olmaları, alternatif kaynaklardan elde edilebilir olmaları ve hipoimmunolojik karakteristikleri, doku kaybı ile seyreden pek çok hastalığın tedavisinde güvenilir bir kaynak olduklarını düşündürmektedir (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

Mezenkimal kök hücreler, hasar gören dokulara dönüşebilme kapasiteleri yanında, sınırlı sayıda canlı kalmış hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyip, ömrünü uzatabilir, yeni damar oluşumu sağlayarak dolaşımı düzenleyebilir, doku rejenerasyonuna katkıda bulunabilir ve hasarlı dokuda inflamasyonu baskılayarak skar doku oluşumunu engelleyebilir.

Over torsiyonuna bağlı iskemi durumunda kök hücre uygulamasının, diğer dokularda olduğu gibi doku yenilenmesinde etkin olabileceği düşünülmektedir. Bunun doğrulanması durumunda bir sağlık durumu olmanın yanı sıra sosyal açıdan da önemli olan fertilizasyon ve hormonlar açısından büyük önem taşıyan overler onarılmış olabilecektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Ovaryum

Ovaryumların temel işlevi sağlıklı nesillerin sürdürülmesi için olgun oositlerin üretilmesidir. Ayrıca ovaryumlar dişilerde cinsel olgunluk ve üreme yeteneği için gerekli olan endokrin işlevlere sahiptir. Ovaryumlar oosit olgunlaşması ve follikül gelişimi gibi önemli işlevlerin yürütülmesi için çeşitli sinyal moleküllerine sahiptir (24). Follikül gelişimi boyunca bu sinyal moleküllerinin geçici ve sınırlı düzenlenişi, follikül tipine göre değişmektedir. Sinyal moleküllerindeki herhangi bir hata ya da eksiklik oosit kalitesini, ovulasyonu ve döllenmeyi doğrudan etkilemektedir.

Apoptozisin en önemli evrelerinden biri olan DNA parçalanması, histokimyasal olarak TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling) yöntemi ile gösterilmektedir. TUNEL apoptozisin erken aşamasındaki apoptotik hücrelerin tanımlanmasını sağlayan özel bir yöntemdir. TUNEL tepkimesi atretik follikül'lerde en çok granüloza ve teka hücrelerinde gözlenmiştir. Bu nedenle granüloza ve teka katmanlarında TUNEL pozitif hücrelerin bol olduğu folliküller, atretik follikül olarak sınıflandırılır (25). Apoptoziste etkili rol oynayan Kaspaz ailesi arasında apoptozisle en bağlantılı olan ve hücreyi ölüme götüren etkileyici enzim kaspaz-3'tür. Ayrıca apoptozisde sonlandırıcı enzim olan kaspaz-3'ün, ovaryum'un granüloza hücrelerinde apoptozis işlemini tamamladığı bilinmektedir (26). APAF-1 ise kaspaz'ların etkinliği ve kuvvetlenmesi için son derece önemli bir öncül-apoptotik moleküldür (27). Apoptozisin mitokondriyal yolunda sitokrom-c sitosole salınarak APAF-1'in de katıldığı apoptozom bileşenini başlatır. Ovaryum follikülleri ile ilgili yapılan çalışmalarda APAF-1'in insan ve fare granüloza hücrelerinde salındığı ve gonadotropin uygulanması ile APAF-1 salınımının baskılandığı gösterilmiştir (28).

2.1.1.Ovaryumun Anatomisi

Ovarium'lar küçük pelvis'in yan duvarında fossa ovarica'ya yerleşmiş bir çift organdır. Fossa ovarica, a.iliaca externa ile a.iliaca interna arasında bulunur. Aşağı ve ön taraftan lig.latum uteri'nin tabanı, yukarıdan a.iliaca externa ve arkadan da üreter ile sınırlıdır. Peritoneum'un altından a.v.obturatoria ile n.obturatorius geçer. İlk hamilelikte ovarium'lar uterus ile birlikte karın boşluğuna doğru çekilir ve bir daha aynı yerine dönemezler. Doğum yapanlarda ovariumlar genelde biraz daha aşağıda bulunurlar.

Tuba uterina'nın arka ve aşağı kısmında yerleşik ovarium'lar, lig.latum uteri içinde bulunur ve uzun eksenleri de vertikal yöndedir. Pembemsi-gri renkli olan ovariumların yüzü

puberteye değin peritoneum'la örtülü olup düz ve parlaktır, puberteden sonra matlaşır. Ovulasyon ve doğurmaya bağlı olarak da üzeri pürtüklü bir görünüm alır. Her bir ovarium yaklaşık 4 cm uzunluğunda, 2 cm eninde ve 0,8 cm kalınlığındadır. Ağırlığı 3-5 gramdır. Facies lateralis ve facies medialis olarak iki yüzü, extremias tubaria ve extremias uterina olarak iki ucu, margo liber ve margo mesovaricus olarak iki kenarı vardır. Extremitas tubaria komşuluğunda fimbria ovarica ile lig.ovarii suspensorium tutunur. Lig.suspensorium ovarii, iliac damarların ön tarafında yukarı doğru uzanan bir periton plikası olup, içinde a. ve v. ovarica bulunur. Extremitas uterina, aşağı pelvis döşemesine doğru yönelerek, lig.ovarii proprium aracılığı ile uterus'un cornu uteri'sine tutunur. Bu bağ gubernaculum artığının bir bölümü olup, lig.latum uteri içinde bulunur ve az olarak düz kas lifleri içerir.

Facies lateralis, fossa ovarica'yı örten pariyetal periton'a oturur. Facies medialis, dış yüze oranla daha konvekstir. Bu yüzü infundibulum tubae uterinae örter. Serbest olması nedeniyle, arka kenarına margo liber denir. Ön kenara oranla daha konveks ve künt olan bu kenar, üreter ile komşuluk yapar. Ön kenarına, mesovarium tutunması nedeniyle, margo mesovaricus denir. Arka kenara göre daha ince olan ön kenarda, hilum ovarii bulunur ve a.umbilicalis'in artığı ile komşudur. Bu kenara, lig. latum uteri'nin bir bölümü olan mesovarium tutunur. Mesovarium'un iki yaprağı arasında bulunan damar ve sinirler, hilum ovarii'den ovarium'a girer ve çıkarlar. Tuba uterina, margo mesovaricus üzerinden bir kavis ile geçip, extremitas tubaria'nın üzerinden kıvrılarak, margo liber'e ve buradan da facies medialis'e gelir (29).

Ovarium'un arterleri, abdominal aortadan çıkan a.ovaricalar'dır. A.ovarica, lig. suspensorium ovarii içinde pelvis'e iner. Hilum ovarii'den ovarium'a girer ve folliküller çevresinde kılcal ağlar oluşturur.

Ovarium'un venleri, arterleri izleyerek hilum ovarii'den çıkar. Bu venler plexus pampiniformis denilen venöz ağı oluştururlar. Bu ağı oluşturan venler, yukarı çıktıkça biribirleriyle birleşirler ve sonunda v.ovarica'yı oluştururlar. V.ovarica, a.ovarica ile birlikte seyreder. Sol tarafta v.renalis'e, sağ tarafta ise v.cava inferior'a açılır.

Ovarium'un lenf drenajı, kan damarları ile birlikte uzanır ve nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'lere açılırlar.

Ovarium'un sinirleri, plexus hypogastricus inferior ve a.ovarica'nın çevresindeki plexus ovaricus'dan gelir. Parasempatikleri n.vagus'tan, sempatikleri ise n.splanchnicus minor ve bir

kısmı torakal medulla spinalis segmentlerinden gelir. Bunların ovarium içindeki dağılımı ve görevleri tam bilinmemektedir (29, 32)

2.1.2. Ovaryumun Embriyolojisi

Cinsiyetin farklanması çok sayıda genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. SRY geni (Y kromozomu'nun üzerindeki seks belirleyici bölge) Y kromozomunun kısa kolunda (Yp11) bulunur ve cinsiyetin belirleyicisidir. Bu genin protein ürünü olan transkripsiyon faktörü, gelişmemiş durumdaki üreme organlarının cinsiyetini belirleyen genleri harekete geçirir. SRY geni Testis Belirleyici Faktör'dür (TBF). Bu faktörün var olması durumunda fetusun cinsiyeti erkek, yokluğunda ise kızdır. Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak döllenme sırasında belirlenmiş olmasına karşın, gelişimin 7. haftasına değin gonadlar erkek ya da dişi yapısal özelliklerine sahip değillerdir.

Gonadlar başlangıçta sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş, bir çift genital ya da gonadal kabartılar şeklinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına değin bu kabartılar içinde üreme hücreleri görülmez.

İlkel (Primordiyal) üreme hücreleri, gelişimin 2. haftasında embriyonik primer ektodermden (epiblast) köken alırlar. Daha sonra epiblasttan ayrılarak ameboid hareketlerle vitellus kesesinin ekstraembriyonik yapılarına göç ederler. Önce embriyonun kaudalinde yerleşik ekstraembriyonik mezodermde görülürler, sonra vitellus kesesi duvarı endoderminde izlenirler. 4. haftada son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşırlar. 6. haftada ise genital kabartıları işgal ederler. İlkel üreme hücrelerinin izlediği bu yola germ çizgisi (hattı) denir. İlkel üreme hücreleri açık renk sitoplazmaları ve oval şekilleriyle kolayca ayırt edilirler. Alkalen fosfataz enzim işaretlemesiyle belirlenebilirler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum ya da testis'e farklanmalarında ilkel üreme hücrelerinin tetikleyici etkisi vardır.

İlkel üreme hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartının epiteli çoğalır ve epitel hücrelerinin altındaki mezenşimin içine gömülürler. Burada ilkel cinsiyet kordonları olarak adlandırılan düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Erkek ve dişi embriyonlarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede erkek ya da dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi olanaksızdır. Bu nedenle bu evreye faklanmamış dönem, bu gonad'a ise farklanmamış gonad denir.

XX kromozomlarına sahip dişi embriyonlarda, ilkel cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır. İlkel üreme hücresi grupları içeren bu kümeler, daha çok ovaryum'un medullar bölgesinde yerleşmişlerdir. Bu hücre kümeleri bir süre sonra kaybolarak yerlerini damarlı stromaya (ovarian medulla) bırakırlar. Dişi gonad'ın yüzey epiteli, erkek gonad'ının aksine çoğalmayı sürdürür.

7. haftada yüzey epitelinden köken alan hücre kordonları alttaki mezenşim içine gömülür. Bunlar yüzeye yakın yerleşirler ve ikincil kordonlar olarak adlandırılırlar. 4. ayda, bu kordonlar bir ya da daha çok sayıda ilkel üreme hücresini çevreleyen izole hücre toplulukları haline gelirler. Bu üreme hücreleri zamanla oogonyum'a dönüşürken yüzey epitelinden aşağıya göç eden ve üreme hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden de folliküler hücreler oluşur (30, 31)

2.1.2.1.Cinsiyetin Belirlenmesi

Kromozomal ve genetik cinsiyet fertilizasyon ile sağlanır, X kromozomuna sahip ovum'un X veya Y kromozomu taşıyan bir sperm ile döllenmesine bağlıdır. Gelişmekte olan gonadlar XX ve XY kromozom kompleksine sahip olurlar. Erkek fenotipinin gelişimi için bir Y kromozomu gereklidir, fakat bu kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için son derece kritiktir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geninin, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleştiği saptanmıştır (Berta vd. 1990, DiGeorge 1992). Dişi fenotipinin gelişmesi için iki X kromozomuna gerek vardır. X kromozomunda yer alan bir seri genin ve bölgenin, seksin belirlenmesinde özel rolleri bulunmaktadır.

Y kromozomu, farklanmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir. Y kromozomu tarafından düzenlenen, testis belirleyici faktör (TDF) testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır. Bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşırlar. Y kromozomunun yokluğu over gelişimiyle sonuçlanırken seks kromozom kompleksinin tipi, fertilizasyonla sağlanır, bu da farklanmamış gonadın hangi yönde gelişeceğini belirlemektedir (Mittwoch 1992).

Mevcut gonadın tipi, daha sonra dış genitallerde ve genital duktuslarda oluşan seksüel farklılaşmayı belirlemektedir. Fötal testisler tarafından üretilen testosteron erkekliği belirlemektedir. Dişide primer seksüel farklılaşma hormonlara bağlı değildir; overlerin yokluğunda bile, dişiliğin oluşması hormonal bir etkinin söz konusu olmadığını göstermektedir (Carr vd. 1970).

2.1.3.Ovaryum Histolojisi

Ovarium'u en dıştan periton örter. Bu periton da, diğer organları örten peritonlar gibi yassı epitel yapısında olup düz ve parlaktır. Ancak puberteden sonra ovarium'un periton yapısı değişir ve germinal epitelyum (Waldeyer katmanı) olarak adlandırılan kübik hücre katı ile sarılır. Bu nedenle de mat gri renge döner. Eğer erişkinlerde de normal periton yapısı korunsa idi, ovulasyon sırasında, oosit sağlam olan periton'u delerek dışarı çıkamazdı. Bu nedenle erişkinlerde, ovariumları örten normal bir periton bulunmaz (29, 32)

Ovaryum en dıştan tek sıralı yassı epitelden kübiğe (epithelium superficiale-germinativum) değişen bir epitel ile sarılmıştır. Ovaryum yüzeyindeki bu epitel katmanı, embriyonda birkaç kez çoğalarak primer ve sekonder cinsiyet kordonlarını yapan peritonal mezotelyumdan geliştiği için germinal epitel (epitelyum germinale) olarak adlandırılır. Epitelin peritona bakan yüzünde mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyalar bulunur. Hücre sitoplazması mitokondriyon ve pinositoz veziküllerinden zengindir. Germinal epitelin altında damardan fakir, sıkı kollajenöz bağ dokusundan yapılı tunika albuginea bulunur. Bu katmandaki kollajen lifler ovaryum yüzeyine koşut yerleşmişlerdir. Kesitlerde her bir ovaryum'un içte medulla dışta korteks olarak iki bölümü ayırt edilir. Bu katmanlar arasında kesin bir sınır yoktur.

Medulla, kollajen demetlerden ve elastik lif ağlarından yapılmış oldukça sıkı bir bağ dokusu içinde, kan ve lenf damarları, kalın sinir demetleri ve hilus yakınında birkaç düz kas hücresi içerir.

Ovaryum Korteksi; Korteks, stroma ve çeşitli gelişim evrelerindeki ovaryum folliküllerinden oluşur. Stroma, kollajen ve elastik lifler, retiküler lif ağları ve iğ biçimli bağ dokusu hücrelerinden (fibroblastlar) yapılmıştır. Bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir. Korteksin bu interstisyel bağ dokusu germinal epitel altında sıkılaşarak tunika albuginea'yı oluşturur.

Kortekste stroma içinde çeşitli gelişim evrelerinde folliküller yerleşmiştir. Ovaryum folliküleri, ortada iri bir germ hücresi (oosit) ile bunu çevreleyen follikül epitelinden oluşan yapılardır (33, 34, 35, 36, 37).

Ovaryum Medullası; Ovaryum'un merkezi olan medulla gevşekçe örgü oluşturan kollajen ve elastik lifler ile fibroblastlar içeren bağ dokusundan oluşur. Medulla ayrıca büyük kan, lenf damarları ve sinir lifleri içerir. Folliküler atrezi sırasında granüloza hücreleri ile oosit'ler dejenerasyona uğrarken, teka interna hücreleri etkin steroid salgı yapmayı sürdürürler. Medullada yerleşik bu epiteloid hücrelere 'interstisyel hücreler' denir. Bu

hücreler, kümeler oluşturmak üzere biraraya gelirler ve ‘interstisyel bezleri’ oluştururlar. İşlevlerini puberteden başlayıp menapoz’a değin sürdürürler ve östrojen salgılarlar.

Hilus hücreleri ovaryum medullasındaki diğer epiteloid tip hücrelerdir. Bu hücreler testislerdeki Leydig hücreleriyle eşdeş organel içeriği ve sitoplazmik özelliğe sahiptirler. Ayrıca androjenleri salgılarlar (33, 34)

2.1.3.1.Oogenezis

Doğum Öncesi (Prenatal) Olgunlaşma: İlkel üreme hücreleri, dişi gonad’a ulaşır ulaşmaz genetik olarak oogonyum’lara farklanırlar. Ardarda geçirdikleri mitotik bölünmelerle çoğalan oogonyum’lar 3. ayın sonunda kümeler halinde dizilir, yassı epitel hücreleriyle çevrelenirler. Bir küme içindeki oogonyum’ların tümü, olasılıkla tek bir ilkel üreme hücresinden gelişir. Oogonyum’ları çevreleyen yassı epitel hücreleri, yüzey epitelinden köken alır ve follikül hücreleri olarak adlandırılırlar (30, 31, 33).

Oogonyum’ların çoğunluğu mitozla bölünmeyi sürdürürken, bir kısmı bölünmesini I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında durdurarak primer oosit’lere farklanırlar. 3. aydan başlayarak oogonyum’ların sayısı hızla artar. Gelişimin 5. ayında ovaryum içindeki üreme hücrelerinin sayısı ortalama 7 milyona ulaşır. Bu evreden sonra hücre ölümü başlar. Çok sayıda oogonyum ve primer oosit atretik hale gelir. 7. ayda yüzeye yakın yerleşmiş birkaç oogonyum dışında çoğu dejenere olur. Hayatta kalan primer oosit’lerin tümü, I. Mayoz bölünmenin profaz evresine girmiş ve her biri tek sıra yassı follikül hücre sırasıyla çevrelenmiştir. Ortada bir primer oosit, çevresinde birbirine desmozomlarla tutunmuş tek sıra yassı epitel hücreleriyle sarılı bu yapıya primordiyal follikül denir. Primordiyal follikül çevre dokudan belirgin bir bazal lamina ile ayrılmıştır.

Doğum Sonrası (Postnatal) Olgunlaşma: Doğumda tüm primer oosit’ler I. Mayoz bölünmenin profazı’nın diploten evresindedir. Bu evrede oosit I çekirdek kromatinin seyrek ve düzensiz bir yapılanma gösterdiği dinlenme evresine girer. Primer oosit’ler, puberteye değin dinlenme evresinde kalırlar ve birinci mayoz bölünmelerini tamamlamazlar. Bu süre boyunca, oosit olgunlaşması follikül hücrelerince salgılanan oosit olgunlaşmasını baskılayan madde (OMI,oocyte maturation inhibitor) ile baskılanır. Doğumda ovaryum’lardaki primer oosit sayısı 700 bin ila 2 milyon arasında değişir. Puberteye değin bunların büyük çoğunluğu atretik hale geldiğinden, puberte başlangıcındaki bu sayı 400.000’e düşer ve 500’den daha azı bir kadının üreme döngüsü içinde ovulasyonla atılır. Diğerleri çeşitli gelişim evrelerinde

dejenere olup atretik folliküller haline gelir. Geç olgunlaşan oosit'lerin bazıları 40 yıl süresince 1.mayoz bölünmenin profaz evresinde bekler.

Pubertenin başlamasıyla dişi gonad primordiyal folliküllerden beslenen bir follikül havuzu işlevi görür. Her ovaryal döngüde bu havuzdan seçilen 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordiyal follikül, primer (preantral), sekonder (antral) ve Graaf (tersiyer, preovulatuar) olarak adlandırılan 3 aşamadan geçerek olgunlaşmaya başlar. Bunlar arasında en uzun olanı antral follikül evresidir.

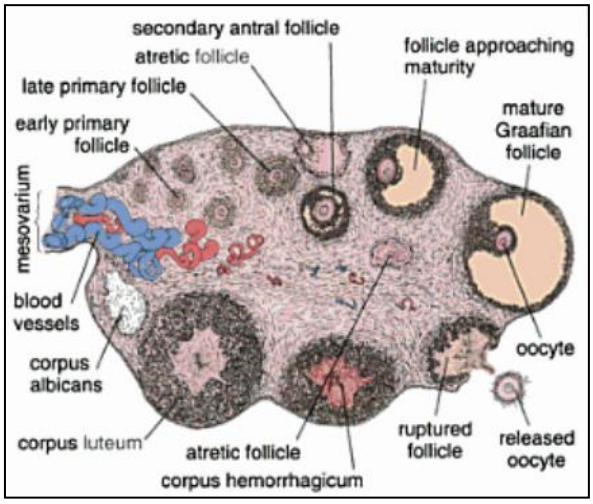
Preovulatuar evre yaklaşık 37 saat sürer. I. Mayoz bölünmenin diploten evresinde dinlenme aşamasında olan primer oosit büyümeye başlar. Oosit'i çevreleyen yassı epitel hücreleri önce kübikleşir. Bu folliküle gelişen (unilaminar) primer follikül denir. Daha sonra kübik biçimli follikül hücreleri çoğalarak çok sıralı epitel katmanını oluştururlar. Buna granüloza katmanı (stratum granulozum) denir. Bu biçimi alan folliküle multilaminar (preantral) primer follikül adı verilir. Granüloza hücrelerinin çoğalması primer oosit'lerce salgılanan 'aktivin' denilen sinyal molekülünce sağlanır. Primer follikül çevresinde, stromal hücre ve bağ dokusu yoğunlaşarak teka follikülü denilen bir kılıf oluştururlar. Bu arada granüloza hücreleri ve oosit glikoprotein yapıda bir madde salgılayarak oosit'in çevresinde zona pellusida denilen bir katman oluşturur. Follikül büyümeyi sürdürürken teka follikül hücreleri, içte salgı yapan hücrelerden oluşan teka interna ve dışta fibroblast benzeri hücreler içeren bağ dokusundan yapılı, fibröz bir kapsül olan teka eksterna adlı iki belirgin katman şeklinde farklanır. Aynı zamanda oosit'in çevresindeki follikül hücreleri eldiven parmağı biçimindeki küçük sitoplazmik uzantılarını, zona pellusida'yı geçip oosit'in zarının mikrovilluslarıyla iç içe geçirirler.

Gelişme ilerledikçe granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar belirir. Bu boşlukların birbirleriyle birleşmesiyle antrum oluşur. Bu folliküle sekonder (veziküler) follikül denir. Başlangıçta küçük hilal görünümünde olan antrum zamanla genişler. Oosit'i çevreleyen granüloza hücreleri bozulmadan kalarak kum yığını görüntüsündeki kümulus ooforus'u oluştururlar. Olgun bir sekonder follikül 25 mm ya da daha fazla çaptadır. İçte steroit salgı oluşturan hücrelerden yapılı teka interna ve dışta teka eksterna ile sarılıdır. Teka eksterna derece derece ovaryum stromasına karışır. Follikül ovulasyona yakın daha da büyür ve Graaf (tersiyer, preovulatuar) follikül olarak adlandırılır.

Her menstrüal döngüde bir grup follikül gelişmeye başlarsa da, bunlardan ancak bir tanesi tam anlamıyla olgunlaşır. Diğerleri çeşitli gelişim evrelerinde dejenere olarak atretik

hale gelirler. Sekonder follikül olgunlaştıktan sonra lüteinizan hormonun (LH) etkisiyle ovulasyon öncesi (preovulatuar) evreye girer. Primer oosit I. Mayoz bölünmeyi tamamlayarak büyüklükleri farklı, ancak her biri 23 çift yapılı (2nDNA) kromozom içeren iki yavru hücre oluşturur. Bu hücrelerden biri sitoplazmanın büyük bölümünü alan sekonder oosittir, diğeri ise çok az sitoplazma içeren 1. kutup cisimidir. Kutup cismi oosit'in hücre zarıyla zona pellusida arasındaki perivitellin aralıkta yer alır. I. Mayoz bölünme ovulasyondan hemen önce tamamlanır. I. Mayoz bölünmenin tamamlanmasından hemen sonra ve sekonder oosit'in çekirdeği dinlenme evresine geçmeden önce, DNA eşleşmesi olmaksızın hücre II. Mayoz bölünmeye girer. Oosit II'de bölünme mekiği oluşur. Kromozomlar ovulasyondan 3 saat önce metafaz plağında dizildiklerinde ovulasyon gerçekleşir ve oosit dışarıya atılır. II. Mayoz bölünme ancak oosit II, bir spermiyumla döllenirse tamamlanır. Döllenme olmazsa ovulasyondan 24 saat sonra oosit II dejenere olur. Bu sırada birinci kutup cisimi de ikinci kez bölünebilir. Böylece ovaryum'da oogonyum'lardan oosit II oluşuncaya değin gerçekleşen değişimlere oogenezis denir (30, 31, 33, 34)

2.1.3.2.Ovaryum Folliküller



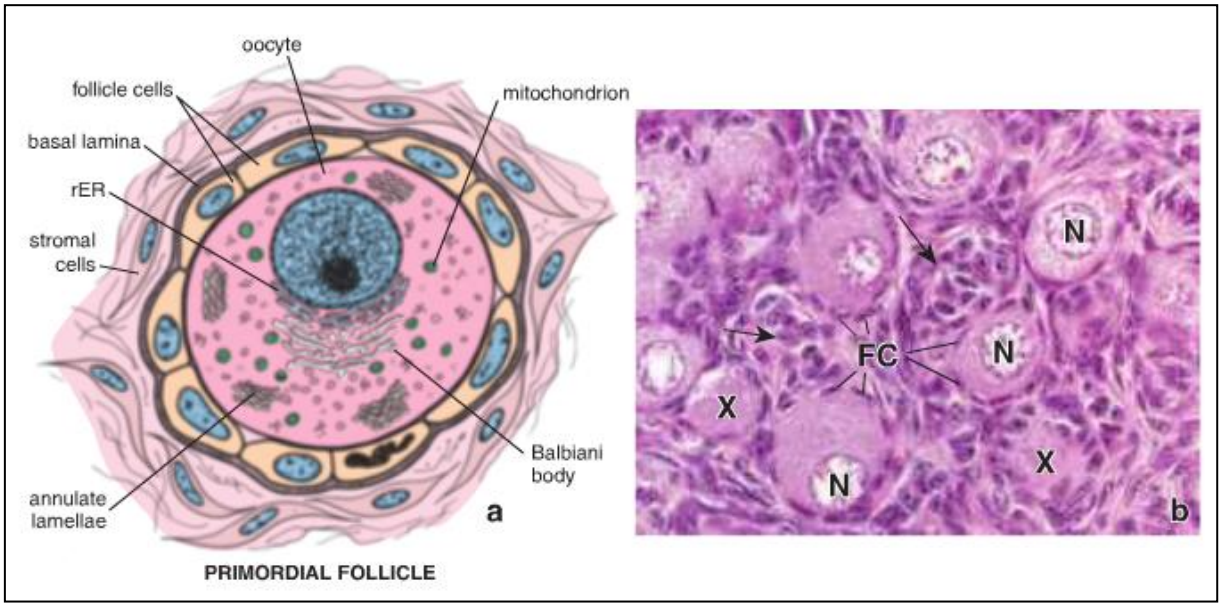
Şekil 1: Ovaryumun şematik görüntüsü

Folliküler gelişimde 4 evre ayırt edilir.

1- Primordiyal Folikül

Primordiyal folliküller, fetal yaşam sırasında oluşan tek sıralı yassı follikül hücreleriyle çevrili primer oosit'leri içerir. Primer oosit'ler 25 μm çapında yuvarlak şekilli hücrelerdir.

Geniş ve periferik yerleşimli çekirdekleri tek çekirdekçik kapsar. Primer oosit'ler organellerden zengindirler. Çok sayıda mitokondriyon, gelişkin Golgi kompleksi, granüllü endoplazmik retikulum tubulusları ve birkaç ribozom içerirler. Bu folliküller, korteksin en üst katmanında yer alırlar ve sayıları artmaz. Ancak cinsel yaşam süresince büyüyüp gelişirler ve çoğu dejenere olur (33, 34).



Şekil 2: Primordial folikül (34)

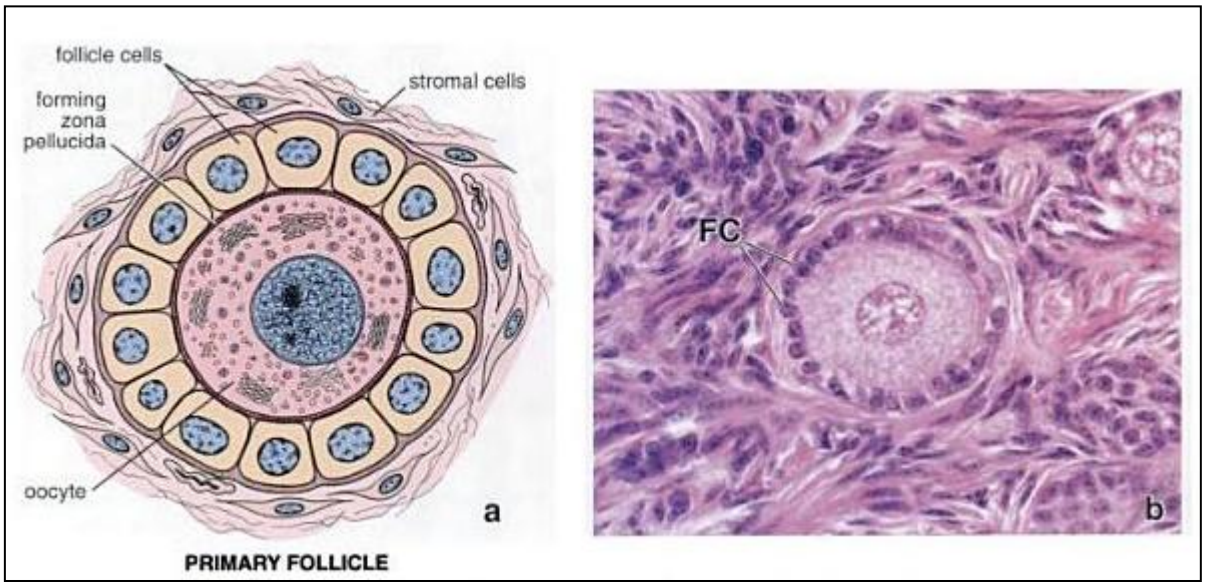
2- Primer Folikül

Pubertenin başlamasıyla birlikte, her menstrüel döngüde 5-15 arası primordiyal follikül olgunlaşmaya başlar. I. mayoz bölünmenin diploten evresinde olan oosit I büyür, oosit'i çevreleyen follikül hücreleri önce kübikleşir ve sonra çoğalarak çok sıralı bir epitel katı oluştururlar. Bu hale gelen folliküle primer follikül denir. Primer oosit'in çapı yaklaşık 100-150 μm'dur ve genişlemiş bir çekirdek, çok sayıda Golgi kompleksi ve mitokondriyon, gelişkin granüllü endoplazmik retikulum tubulusları ve serbest ribozomlar içerir.

Oosit'in çevresindeki follikül hücreleri zamanla kübikleşir ve bu folliküle tek katmanlı (büyüyen, unilaminar) primer follikül denir. Follikül hücreleri çevrelerindeki stromal hücrelerden bir bazal membranla ayrılmışlardır. Folliküler hücreler çoğalmaya başladıklarında çok sıralı hale gelirler ve granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar. Follikülün bu haline çok katmanlı (preantral, multilaminar) primer follikül denir. Granüloza hücrelerinin çoğalma yetisi primer oositce üretilen aktivin ile gerçekleştirilir. Bu evre süresince granüloza hücreleri

ve oosit glikoprotein yapısında bir madde salgılarlar. Bu madde oosit'in çevresinde zona pellusida olarak adlandırılan bir katman oluşturur. Zona pellusida ZP1, ZP2 ve ZP3 denilen 3 farklı glikoproteinden oluşur. Ayrıca follikül hücre zarı eldiven parmağı biçiminde küçük sitoplazmik uzantılar içerir. Bunlar zona pellusidayı geçerek, oosit yüzeyindeki mikrovilluslarla sıkı bağlantı birimleri (gap junction) aracılığıyla bağlanırlar. Bu sitoplazmik uzantılar folliküler gelişim süresince iletişim kurarak besin maddelerinin follikül hücrelerinden geçişini kolaylaştırırlar.

Follikülün dışındaki stromal hücrelerin oluşturduğu teka follikülü de iki kata ayrılır. İçte salgı yapan hücrelerden oluşan, kan damarlarından zengin teka interna, dışta fibroblast benzeri hücreler içeren bağ dokusundan yapılı teka eksternadan oluşur. Teka internayı oluşturan hücreler hücre zarlarında LH reseptörleri içerirler. Ayrıca sitoplazmalarında çok sayıda yağ damlaları, granülsüz endoplazmik retikulum tubulusları ve tubuler kristalı mitokondriyonlar kapsarlar. Teka interna hücreleri androstenedion üretirler ve bu hormon granüloza hücrelerine girerek aromataz enzimiyle östradiol'e dönüşür. Granüloza hücreleri ile teka interna hücreleri arasında kalın bir bazal lamina vardır (33, 34)



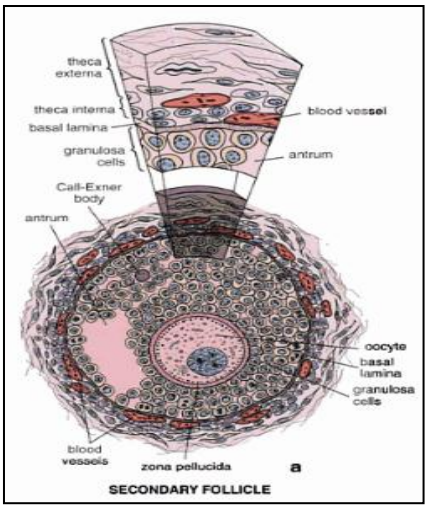
Şekil 3 : Primer folikül (34)

3- Sekonder Folikül

Gelişme ilerledikçe çok katmanlı primer follikül 200 µm çapa ulaşır ve granüloza hücrelerinin arasında içi sıvı dolu boşluklar belirir. Kısa sürede boşluklar birbirleriyle

birleşerek yarım ay şeklinde follikül antrum'unu oluşturur. Bu hale gelen folliküle sekonder follikül denir. Sekonder follikül'ün granüloza hücrelerinin çoğalması hipofiz ön lobundaki bazofil hücrelerinden salınan FSH'a bağlıdır. FSH'ın etkisi altında granüloza hücrelerinin sayısı artar ve hücrelerarası boşluğa follikül sıvısı birikir. Bu sıvı glikozaminoglikan, proteoglikan ve hormon bağlayıcı proteinleri içeren kan plazması benzeridir. Ayrıca follikül sıvısı hormonlardan progesteron, östradiol, inhibin, folliostatin ve FSH ile LH'ın salınımını düzenleyen aktivin içerir. Zamanla granüloza hücreleri yeniden düzenlenmeye başlar ve primer oosit bir miktar granüloza hücresiyle birlikte antrum boşluğu içinde bir kenara toplanır. Bu yapıya kumulus ooforus denir. Zona pellusida çevresinde gevşek yerleşmiş kübik ya da alçak boylu prizmatik granüloza hücreleri sitoplazmik uzantılarıyla oosit ile bağlantılarını sürdürmektedirler. Primer oosit'i çevreleyen bu tek sıralı granüloza hücre katmanına korona radiata denir. Diğer granüloza hücreleri poligonal şekillidirler. Oosit sitoplazmasında mitokondriyonlar çekirdek yakınında toplanırlar. Sitoplazmada protein-lipit yapısında vitellus oluşmaya başlar.

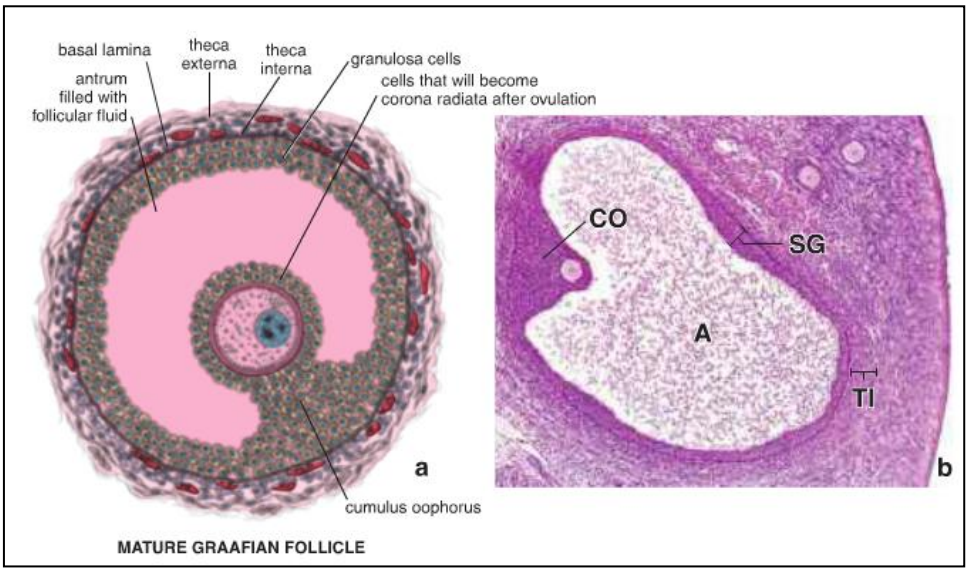
Bu evrenin sonuna doğru stromal hücreler genişlemeye başlar ve teka interna yaygın ağ oluşturmuş kapillerle beslenir. Sekonder follikül aşamasına gelmiş çoğu follikül atreziye uğrar. Ancak atretik folliküllerin bazı granüloza hücreleri dejenere olmaz ve menapoz'a değin düşük düzeylerde androjen salgılayan interstisyel bezlere dönüşür (33, 34)



Şekil 4 : Sekonder folikül (34)

4- Graaf (Olgun) Folikülü

Birkaç sekonder follikül olgun follikül oluşturmak üzere gelişmeyi sürdürür ve Graaf (tersiyer, preovulatuar) follikülü oluşturur. Graaf follikülünde granüloza hücreleri çoğalır, antrum genişler ve follikül sıvısı ile dolar. Ovulasyondan hemen önce follikülün çapı 2,5 cm'ye ulaşır. Follikül duvarındaki folliküler hücreler membrana granüloza'yı oluştururlar. Graaf follikülünde primer oosit'in çevresindeki korona radiata ve kumulus ooforus oluşumunu sürdürür ve zamanla tutunduğu yerden ayrılır ve follikül sıvısının içinde serbest kalır. Graaf follikülü en dıştan saran bazal membran kalın, homojen ve saydamdır. Buna camsı zar denir. Graaf folliküllü döngünün başlangıcından başlayarak 10-12 günde oluşurlar (33, 34).



Şekil 5 : Tersiyer (Graaf) Folikül (34)

5-Atretik Folikül

Atretik folliküller doğum öncesinden başlayarak menapoz'un birkaç yıl sonrasına değin ovaryum'da oluşurlar. Genelde menstrüal döngü süresince her ovulasyonda bir oosit atılır. Dişilerin tüm yaşamı boyunca, ovaryum'da yerleşik çok sayıda çeşitli evredeki folliküllerden yalnızca % 0,1'i olgunlaşıp ovulasyona uğrar. Bu nedenle ovaryum folliküllerinin büyük bölümü, follikül hücreleri ve oosit'in ölümüyle geriler ve fagositoz yapan hücrelerce ortadan kaldırılırlar. Bu işlev sırasında granüloza hücrelerinde mitoz durur, granüloza hücreleri bazal membrandan ayrılır ve dejenere olurlar (33, 34, 35, 36, 37).

2.1.3.3.Ovulasyon

Menstrüal döngünün 14. gününde gelişmekte olan Graaf follikülü'nün granüloza ve teka hücrelerinden salgınan östrojen nedeniyle kandaki östrojen düzeyi artar. Bu da uterus endometriyum'unun folliküler ya da proliferatif evreye girmesi, servikal mukus'un spermiyumların içeri girmesine izin verecek kadar incelmesi ve hipofiz'i LH (luteinize edici hormon) salgılaması için uyarır. LH'ın döngünün tam ortasında aniden yükselmesiyle olgunlaşmayı destekleyen etkenlerin yoğunluğu artar ve o zamana değin diploten evresinde kalmış olan primer oosit'in I. Mayoz bölünmesini tamamlamasını ve follikülün tersiyer evreye girmesini sağlar. Aynı zamanda II. Mayoz bölünme başlar ancak oosit ovulasyondan yaklaşık 3 saat öncesine değin metafaz evresinde duraklar. Bu sırada ovaryum'un yüzeyinde bir kabarıklık oluşur ve bu kabarıklığın tam tepesinde stigma olarak adlandırılan damarsız bir nokta belirir. Yüksek LH düzeyi kollajenaz yetisini arttırır ve follikülün çevresindeki kollajen lifler sindirilir. LH düzeyindeki ani artışın diğer etkisi prostaglandin miktarını arttırmasıdır. Prostaglandin ovaryum duvarında yerel kas kasılmalarına neden olur. Oosit bu kasılmalarla çevresindeki granüloza hücreleriyle birlikte, kumulus ooforus bölgesinden dışarı atılır ve ovaryum'un dışında gezinir. Fimbriya ovarika'ların hareketi ile oosit tuba uterina'nın içine alınır (33, 34, 35, 36, 37).

Ovulasyon puberteden menapoz'a değin 28 günde bir olaylanır. Ovulasyon iki kanama arasındaki döngünün ortasına rastlar. Ovulasyon, döngünün 14. gününde gerçekleşir. Ovulasyonda genelde bir oosit atılır. Bazen aynı anda birkaç oosit atılabilir. Graaf follikülünde ovulasyon sonrasında bir iç basınç düşmesi gerçekleşir. Teka katmanlarından kan sızması ile kısa bir süre için follikül içine kan toplanır. Bu yapıya korpus rubrum (kırmızı cisim) denir (35, 36, 37).

Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra yırtılan tersiyer follikülünün duvarında kalan granüloza ve teka interna hücreleri yaşamlarını çevrelerindeki damarlar yoluyla sürdürürler. Lüteinize edici hormon'un etkisiyle bu hücrelerin sitoplazmalarında sarımsı bir pigment birikmeye başlar ve büyüyerek granüloza lutein hücreleri ve teka lütein hücrelerine dönüşürler. Bu hücrelerin oluşturduğu geçici endokrin bez yapısına '*korpus luteum'* (sarı cisim) denir. Korpus luteum progesteron ve östrojen hormonlarını salgılar. Progesteron, östrojenik hormonların da katkısıyla, uterus mukozasının embriyonun implante olabilmesine uygun duruma geldiği sekretuar ya da progestasyonel evreye girmesini sağlar (33, 34, 35, 36, 37).

Döllenme olmadığında, ovulasyonu izleyen 9. günde korpus luteum erişebileceği üst boyuta ulaşır ve ovaryum'un yüzeyinde sarımtrak bir çıkıntı şeklinde izlenebilir. Bu sonra progesteron üretimi azaldığı için dejenere olur ve menstrüal kanama başlar. Buna '*menstrüasyon korpus luteumu'* denir (35, 36, 37).

Oosit'in döllenmesi durumunda, gelişmekte olan embriyonun sinsityotrofoblastlarca salgılanan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu ile korpus luteum'un dejenere olması engellenir. Böylece korpus luteum büyümesini sürdürür ve '*gebelik korpus luteumu*'na (korpus luteum graviditatis) dönüşür. Bu yapı gebeliğin 3. ayının sonunda ovaryum'un 1/3 ile 1/2'si büyüklüğüne ulaşır. Sarımtrak renkteki luteal hücreler dördüncü ayın sonuna değin progesteron salgılamayı sürdürürler. Bu süreçten sonra plasenta'nın trofoblastik bileşenince salgılanan progesteron'un miktarı gebeliğin sürdürebilmesine yetecek düzeye geldiği için, luteal hücreler yavaş yavaş dejenere olurlar. 4. aydan önce gebelik korpus luteum'unun ortadan kaldırılması genelde düşükle sonuçlanır (33, 34).

Menstruasyon ve gebelik korpus luteum'ları işlevleri sonlanınca dejenerasyona uğrarlar. Yerlerini kollajen liflerden zengin bağ dokusundan yapılı, beyaz renkli bir yapı olan '*korpus albikans*'a (beyaz cisim) bırakırlar. Bu yapı ovaryum içerisinde zamanla absorbe edilerek ortadan kalkar (35, 36, 37)

2.1.4. Ovaryum Fizyolojisi

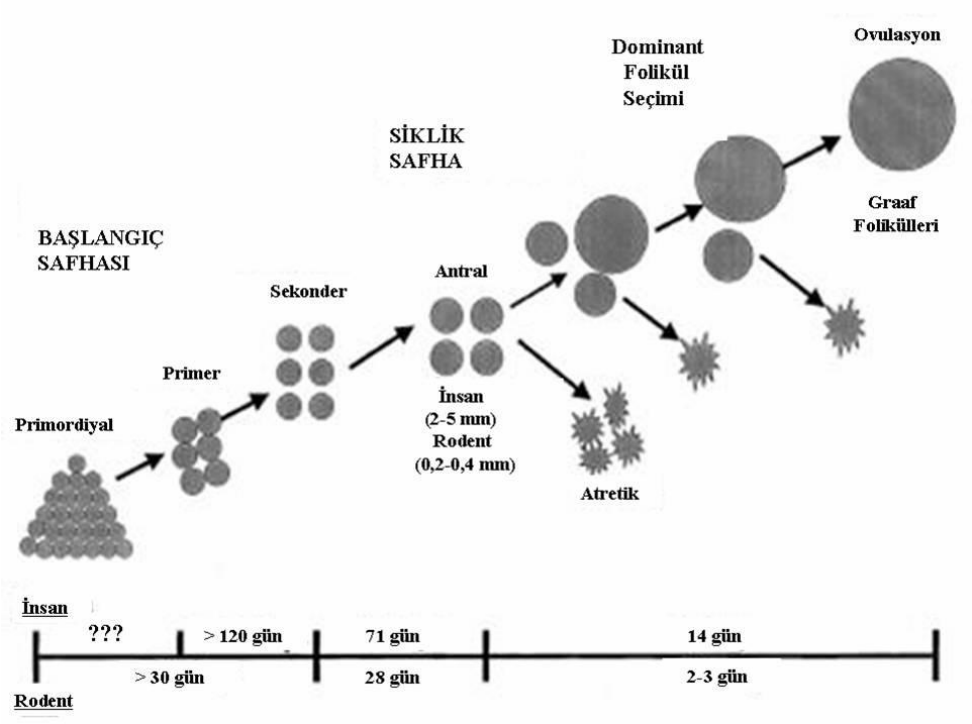
Kadın genital hormon sistemi, üç ayrı hormon grubundan oluşur.

1. Hipotalamik-serbestleştirici bir hormon olan; Gonadotropin-Serbestleştirici Hormon (GnRH).
2. Hipofiz ön lobundaki hormonlarından Follikül Uyaran Hormon (FSH) ve Luteinize edici Hormon (LH). Bu hormonların her ikisi de hipotalamus'ta sentezlenen GnRH-serbestleştirici hormona yanıt olarak salgılanırlar.
3. Ovaryum hormonları, östrojen ve progesterondur. Bu hormonlar hipofiz ön lobundan salgılanan iki hormona (FSH, LH) yanıt olarak, ovaryumlarca salgılanır.

Kadında menstrüel döngü sürecinde, bu hormonların salgı miktarları değişkenlik gösterir. Döngünün farklı evrelerinde son derece farklı hızlarda salgılanırlar (38, 39).

2.1.5.Rodentlerde Follikül Gelişminin Kronolojisi

Rodentlerdeki ovaryan gelişim insanlardakine benzer ancak zamanlama farklıdır. Primordiyal germ hücreleri ileri embriyonik gelişimde oogonya oluşturmak üzere gonadlara göç eder. Doğumda, rat ovaryumu kordonlardan ve oogonyalardan oluşur. Primordiyal foliküller doğumdan sonra, üçüncü günün sonunda oluşurlar. İlk folikül dalgasının antral foliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur. İyi gelişmiş sekonder foliküller yedinci günde gözlenir. Minimal ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (40, 41). Bu dönemde erken antral foliküller de gözlenir. Puberte ya da ilk östrus 34. gün civarında meydana gelir. Düzenli östrus siklusu, 10-12. aylarda düzensiz siklusların oluşumuna kadar devam eder. 12-15. ayların sonunda hayvanlar persistent siklusa girerler ve bunu persistent diöstrus ve ardından anöstrus takip eder. Folikül gelişimi 25 μm'den (primordial folikül) 500-800 μm (preovulatuar folikül) çapa kadar, 60 günden fazla bir sürede ulaşır (yaklaşık 15 östrus siklusu). Primordiyal folikülün sekonder foliküle gelişim aşaması 30 günden uzun olabilir. Sekonder aşamadan ovulasyona kadar olan gelişim süresi 28±2-3 gün olabilir (42). Bu durumda erken folikül gelişimi, insanlardakine benzer şekilde rodentlerde de oldukça uzundur.



Şekil 6 : Rodentler ve insanlarda prepuberte ve puberte aşamasında folikül gelişimi süreleri (42)

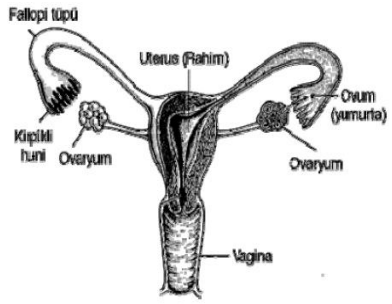
2.1.5.1.Östrus Siklusu

Farelerde genital siklus (östrus siklusu) post-natal 28-42. günlerde vajinal açıklığın gözlenmesiyle, vajinal smear yöntemi kullanılarak takip edilmektedir (41, 42, 43). Östrus siklusu yaklaşık 4-5 gün sürer (44, 45). Fare ve ratlarda, insanlardakine benzer olarak, genital siklus çeşitli hormonlar ile kontrol edilmektedir. Östrus siklusu, proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) olmak üzere başlıca 4 fazdan oluşur. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürmektedir (46, 47, 48).

Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarının siklik değişimleri vajinal epitelin histolojik görünümünde belirgin değişiklikler meydana getirir. İlk defa 1917'de Stockard ve Papanicolou tarafından, guinea pig'lerde başlayan östrus siklusu çalışmalarından bugüne kadar, farklı memeli türlerinde östrus aşamalarını belirlemek için kabul edilen yöntem 'vajinal smear'dir (48, 49). Bu yöntem, vajinal duvardan sürüntü alınması ya da vajinal yıkama sonucu elde edilen preparatlar üzerinde, her bir faz ile ilintili hücre tiplerinin (epiteliyal hücre, kornifiye hücre, lökositler) histolojik olarak tanınması esasına dayanır. Bu yöntem canlı hayatta iken, tekrarlayan sikluslara ait gözlemler için güvenilir bir kayıt sağlamaktadır. Ayrıca hayvanlarda ovulasyon zamanı, kızgınlık dönemi (davranışsal östrus) ve gebeliğin tespiti için de kullanılan pratik bir yöntemdir (46, 50, 51, 52).

2.2. Ovaryum Torsiyon ve Detorsiyonu

Overler hafifce yassılaşmış, yüzeyi girintili çıkıntılı oval şekle sahip organlardır. Graf folikülleri oositleri içerirler, bunlar olgunlaşmayla yeteri derecede büyürler ve yüzeyden görünür şekilde çıkıntı oluştururlar. Tamamen olgunlaşınca, ovum serbestleşir ve folikül korpus luteuma dönüşür. Overlerin temel fonksiyonları hormon üretimi ve gebelik oluşması için ovumun gelişmesini sağlamaktır. Bu fonksiyonlar birçok faktör tarafından kesintiye uğrayabilir. Torsiyon oluşabilir ve vasküler yetmezlikle nekroza neden olabilir.



Şekil 7 : İnsan dişi üreme sisteminin genel görünüşü (141)

Adneksal torsiyon iskeminin sebebidir ve cerrahi yöntemle düzeltilmesi gerekir. İskeminin tedavisinde ana hedef dokunun kan dolaşımını tekrar sağlamakla birlikte, aynı zamanda dokunun oksijenlenmesini de düzeltmeyi amaçlar. Cerrahi yaklaşımda önceleri tercih edilen yöntem, adneksal pedikülün açılmasını sağlamaksızın adneksanın kesilip alınmasını içermekteydi. Böylece ovaryum venlerinden bir trombotik embolinin oluşmasının önüne geçilmesi amaçlanıyordu (53, 54).

Bununla birlikte son 20 yıldan bu yana, adneksal pedikülün dolaşımının açılarak dokunun tekrar oksijenlendirilmesi güvenilir ve koruyucu alternatif bir yaklaşım olarak uygulanmaktadır (9, 55, 56).

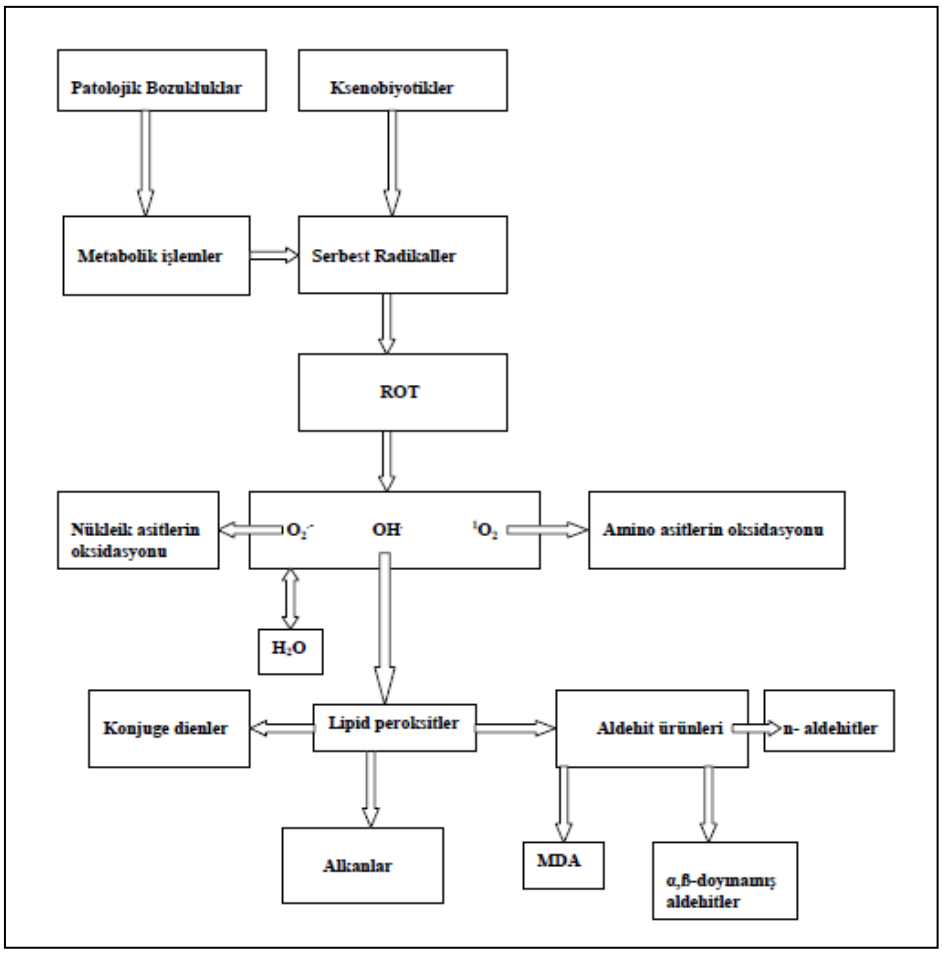
Torsiyon sonucu siyah-morumsu renge dönüşen overlerin yaşamsal fonksiyonlarının bu nedenden dolayı etkilenmediği ve dolanan overlerin tekrar detorsiyonu yapıldığında trombo embolism riskinin artmadığı bildirilmiştir (56, 57). Adneksal torsiyon jinekolojik acil bir durumdur. Erken teşhis ve cerrahi tedavi doğurganlığın devamı için önemlidir ve adneksanın bükümünün çözülmesi tercih edilen tedavi yöntemidir (9, 58).

2.3. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem

Serbest radikaller; biyokimyasal redoks tepkimeleri ile ortaya çıkan, dış yörüngelerinde çok az bir süre için bile olsa bir çiftlenmemiş elektron bulunduran atom ya da moleküllere denir. Aşırı derecede reaktiftirler ve bu nedenle diğer moleküller ile hızla reaksiyona girebilirler. Bu radikaller hücre içinde, aerobik metabolizma sırasında sürekli oluşmakta ve belli patolojik durumlarda üretimleri artmaktadır. Serbest oksijen radikalleri; süperoksit anyonu ($O2^{-}$), hidroksil radikali (OH^{-}), singlet (tekil) oksijen ($^{1}O2$) ve nitrik oksit (NO^{-}) gibi radikal türleridir.

Serbest radikaller, canlılarda iç ve dış kaynaklı olarak üretilebilirler. İç kaynak olarak, mitokondrial elektron taşıma sistemi, oksidan enzimler, fagositik hücreler, otooksidasyon

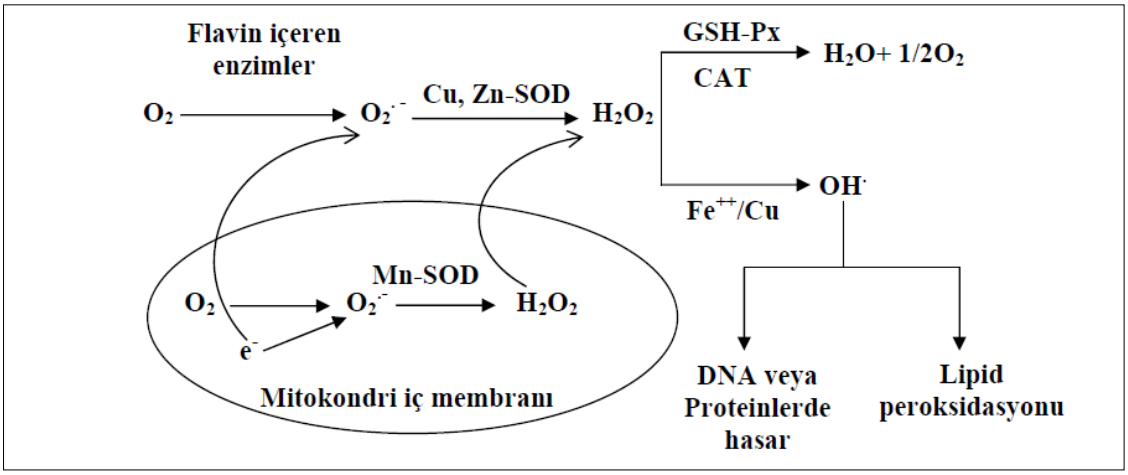
reaksiyonları, yaşlanma gibi kaynaklar ile ortaya çıkarlar (59). İlaçlar, sigara, alkol, uyuşturucu kullanımı, ksenobiyotikler, kirli hava, nitrojen dioksit, benzen, kükürt dioksit, karbon monoksit gibi maddeler önemli dış radikal kaynaklarıdırlar. Serbest radikaller, aşırı reaktiviteleri nedeniyle canlılarda bulunan her çeşit biyomoleküle hasar verebilirler. Serbest radikallerin hasar verdiği biyomoleküller arasında nükleik asitler, lipidler, proteinler, serbest amino asitler, lipoproteinler, karbohidratlar ve bunlardan türeyen kompleks moleküller sayılabilir (60). (Şekil 8).



Şekil 8 : Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşan ürünler (60).

Normal fizyolojik şartlarda oksijenin %2-5'i ROT'a dönüşmekte ve antioksidan sistem ile ortadan kaldırılmaktadır. Reaktif oksijen türleri eğer antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılmazsa, protein, karbohidrat, lipid ve nükleik asitler gibi makromoleküllere saldırıp onların yapılarında bozulmalar meydana getirirerek hücresel

hasara neden olabilmektedir. $O2^{-}$, H2O2, OH^{-} gibi ROT'lar, insan hastalıklarının bir çoğunun patogenezinde işin içine karışmaktadır. Bununla birlikte fizyolojik şartlarda oluşan ROT, antioksidan savunma sistemi ile ortadan kaldırılmaktadır. $O2^{-}$ radikalleri SOD ile H2O2'ye, oluşan bu H2O2 ise, GSH-Px ve CAT ile su ve oksijene dönüştürülerek detoksifiye edilmektedir (Şekil 9).



Şekil 9 : Hücrede oksidatif ve antioksidan sistemin basit bir şeması (61)

Süperoksit ($O2^{-}$) başlıca, solunum zincirinden elektron kaçaklarından dolayı sitozolde flavin içeren enzimler ile, mitokondride ise hücre içinde anlamlı miktarda üretilmektedir. Süperoksit, ya süperoksit dismutaz (SOD) ile ya da kendiliğinden hidrojen peroksiti (H2O2) oluşturur. Hidrojen peroksit, değişik enzimler ile (GSH-Px = Glutatyon peroksidaz, CAT=Katalaz) su ve dioksijene enzimatik olarak metabolize olabilir veya transisyon metal iyonlarıyla ve kimyasal bir reaksiyonla (Fenton ve Haber- Weiss reaksiyonları) çok aşırı reaktif olan hidroksil radikaline (OH.) dönüşebilir. OH. radikali ise lipid peroksidasyonuna, DNA veya proteinlerde hasara neden olur (61).

2.3.1. İskemi/Reperfüzyon'un Biyokimyası

Doku kanlanmasının ilaçlar veya mekanik müdahaleler kullanılarak tekrar sağlanmasına reperfüzyon denir. Reperfüzyon işlemi boyunca kanın akışı ile reperfüzyon hasarından sorumlu süperoksit radikallerinin yüksek miktarı ve hipoksantinden ürik asit oluşumu XO tarafından meydana getirilir. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, süperoksit anyonları, nitrik oksit formasyonları ve peroksinitrit gibi oksijen radikalleri iskemik dokunun reperfüzyonu esnasında oluşurlar. Bu serbest radikaller mitokondrial ve hücre membranlarındaki lipidlerin peroksidasyonu boyunca hücresel hasara neden olurlar.

Lipidlerin peroksidasyonu ile zar permabilitesi veya membran ve hücre bütünlüğü bozulabilir (4, 9). XO, birçok dokuda ROT'un başlıca kaynaklarından sayılmakta ve hücresel hasarın oluşumunda anahtar bir enzim olduğu düşünülmektedir (62).

İskemi/reperfüzyon gibi hipoksik durumlarda, reperfüzyonu takiben doku hasarının meydana gelme mekanizmasının, ksantin dehidrogenaz'ın (XDH), XO'ya dönüşümüyle olduğu rapor edilmiştir (63). Özellikle bu dönüşümün hipoksik şartlarda hızlandığı bildirilmiştir (64).

XO'nun iskemi/reperfüzyon hasarındaki rolü çok dikkat çekicidir. XO ile üretilen $O2^{-}$ ve H2O2 bir taraftan XDH'nin XO'ya dönüşümünü hızlandırmakta ve böylece devamlı ROT üreten kör bir döngü meydana gelmektedir (65). Doku reperfüzyonu sırasında oluşan süperoksit anyonu barsak, deri, iskelet kası, beyin, kalp, akciğer, böbrek ve karaciğeri içine alan çeşitli dokularda iskemi sonrası hasarın kritik bir parçası olarak işe karışmaktadır. XO inhibitörleri ve antioksidan enzimler, iskemi sonrası hasarın alanını önemli derecede sınırlarlar.

Enzim olmayan antioksidan maddelerden en önemlisi GSH'tır. GSH, iç ve dış kaynaklı toksik kimyasallara karşı hücresel savunma sisteminde önemli bir rol oynar**.** Ksenobiyotiklerin ve ROT'un detoksifikasyonunda hücre içi GSH'ın rolü çok önemlidir. Ayrıca GSH, GSH-Px gibi çeşitli enzimler için bir koenzimdir. GSH, özellikle dış toksinlere şiddetli şekilde maruz kalan karaciğer gibi organlarda önemlidir. Karaciğer, GSH sentezinin yapıldığı başlıca organdır (66). Hücre içi bir antioksidan olan GSH'ın azlığı, hücresel sistemlerin birçoğunun serbest radikal hasarına karşı hassasiyetini artırır. GSH, iki farklı mekanizmayla hücrenin antioksidan aktivitesine katılır. Birincisi, GSH bir enzimin aracılığı olmaksızın oksidanlara doğrudan hidrojenleri transfer ederek antioksidan etki gösterir. İkincisi GSH, GSH-Px katalizine enzimin koenzimi olarak katılır ve H2O2'nin, suya ve oksijene dönüşümünü sağlar (67). GSH'ın hücre içi seviyesinin herhangi bir şekilde azalması, lipid peroksidasyonuna veya diğer hücresel hasarlara yol açabilmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarı birçok dokuda GSH'ın düşüşünde önemli etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin, Hasçalık ve ark. (68) rat ovaryumlarında iskemi/reperfüzyon hasarına karşı resveratrolün koruyucu rolünü araştırdıkları çalışmalarında, iskemi/reperfüzyona maruz kalmanın ovaryumların GSH seviyesini düşürürken, malondialdehit (MDA) seviyesinde ve XO enzim aktivitesinde yükselişe yol açtığını bildirmişlerdir. Yine, rat ovaryumunda melatoninin torsiyondetorsiyon hasarına karşı koruyucu rolünün araştırıldığı bir başka çalışmada,

iskemi/reperfüzyona maruz kalan rat ovaryumlarında artan XO aktivitesi ve MDA düzeyleri bulunurken, düşen GSH seviyesinin tespit edildiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (69). Çelik ve ark. (70) CAPE'nin rat ovaryumunda iskemi-reperfüzyon kaynaklı hasarın önlenmesine yönelik araştırmalarında, rat ovaryumlarını 3 saat boyunca torsiyona ve 3 saat boyunca da detorsiyona maruz bırakarak, dokuda MDA, GSH seviyelerini ve XO aktivitesini araştırmışlardır. Araştırmacılar, torsiyon-detorsiyona maruz kalmanın rat ovaryumlarında GSH seviyesini düşürdüğünü, MDA düzeyini ve XO aktivitesini ise yükselttiğini bildirmişlerdir. Uğuralp ve ark. GSH için benzer bulguları testis torsiyon-detorsiyonu yapılan ratlarda da bildirmişlerdir (71).

$^{1}O2$ ve OH^{-} radikali, lipid peroksidasyonuna neden olan en önemli radikallerdir. Lipid peroksidasyonu sonucunda, özellikle doymamış yağ asitlerinin çift bağlarının oksidasyonu, membran akışkanlığında azalmaya, membran salınım fonksiyonlarında düzensizliğe, membran geçirgenliğinde bozulmaya neden olur (59). Aldehitler, lipid hidroperoksitlerinin yıkımı sırasında daima oluşurlar ve pek çoğu biyolojik olarak aktiftir. Bunlardan en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenal'dir (72). Bu maddeler oluşum yerlerinden kolayca difüze olur ve hücrenin diğer bölümlerinde hasara yol açarlar. Oluşan bu aldehidlerden MDA, membran doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun işareti olup, lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir (73).

İskemi/reperfüzyon hasarı MDA seviyesinin önemli derecede yükselmesine neden olmaktadır. Usta ve ark. torsiyon ve detorsiyona maruz bırakılan rat ovaryumlarında doku hasarında L-karnitin ve N-asetil sistein'in koruyucu rolünü araştırmışlar ve bu amaçla ratlara 3 saat boyunca adneksal torsiyon ve adneksal torsiyonu takiben 24 saat boyunca detorsiyon uygulamışlardır. Koruyucu amaçla ratlara iskemi bitimine 30 dakika kala karın içi olarak L-karnitin ve N-asetil sistein'in verildiği bu araştırmada, rat ovaryumlarında iskemi ve iskemi/reperfüzyon sonrası MDA seviyesinde yükselme tespit edilmiştir. Histopatolojik bulgu olarak araştırmacılar, ovaryum dokularında torsiyona uğramanın ciddi kanama ve ödem oluşturduğunu, detorsiyon uygulanan grupta ise kanama olmaksızın ödem oluşumunun devam ettiğini bildirmişler, L-karnitin ve N-asetil sistein'in reperfüzyon kaynaklı hasarda önleyici rolüne dikkat çekmişlerdir (74). Rhoden ve ark. ratlarda deneysel böbrek iskemi/reperfüzyonu oluşturarak yaptıkları araştırmada, böbrek MDA düzeyinin, iskemi/reperfüzyon grubunda yükseldiğini tespit etmişlerdir (75). Yine ratlarda testislerin torsiyon-detorsiyona maruz bırakıldığı bir başka araştırmada, torsiyon-detorsiyon sonrası MDA seviyesinin testislerde

yükseldiği bildirilmiştir (76). CAT, SOD ve GSH-Px enzimleri antioksidan savunma enzimleri olup iskemi/reperfüzyon bu enzimlerin aktivitelerini önemli bir şekilde etkileyerek antioksidan savunma sistemini bozmaktadır (77). Somuncu ve ark. Yeni Zelanda ırkı tavşanların overlerinde, iskemi/reperfüzyon hasarı gerçekleştirerek trapidilin koruyucu etkisini araştırmışlar ve ovaryum dokusunda SOD, CAT, GSH-Px ve MDA seviyelerini incelemişlerdir (78).

Araştırmacılar, iskemi/reperfüzyonun MDA seviyesini ovaryum dokusunda oldukça yükselttiğini, CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerini ise düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Özerol ve ark. ratlarda kısa süreli beyin iskemi reperfüzyonunda erdostein'in koruyucu rolünü araştırmışlardır. Araştırmacılar iskemi reperfüzyon ile etkilenmiş olan dokuda SOD, CAT ve GSH-Px gibi endojen antioksidanların oksidatif hasarın önlenmesinde önemli bir role sahip olduklarını ifade ederek, beyin dokusunda antioksidan aktivitelerindeki bir artışın iskemi reperfüzyon hasarında nöronal iyileştirme için potansiyel olarak faydalı olabileceğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmalarında, serebral iskemi reperfüzyon uygulanan ratların eritrositlerinde CAT aktivitesini değişmemiş bulurlarken, SOD ve GSH-Px aktivitesinde bir düşüş tespit etmişler ve yükselen MDA seviyesine dikkat çekmiştirler (79).

2.4. Kök Hücre

2.4.1. Kök Hücre Tanimi ve Kriterleri

Kök hücre (stem cell) organizmanın en öncül hücreleridir. Bu hücreler bölünebilme, kendilerini yenileyebilme ve kendisinden başka hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahiptir (80). Kök hücreler uygun sinyallarle karşılaşmadıkları için diferansiye olmamış hücreler olup herhangi bir dokuya özgü özelliklere sahip değildir. Bir hasar oluştuğunda, burada yeni bir dokuyu oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Temelde gerçek kök hücre tanımını oluşturan prensipler şunlardır:

1. Kendi kendini yenileyebilme yeteneği ya da başlangıçtaki hücrenin karakterlerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (self-renewal)
2. Tek bir hücreden birden fazla seri hücresine farklılaşabilme (multi-lineage differentiation)
3. Belli bir dokunun in-vivo fonksiyonel rekonstrüksiyonu.

KH'ler özgün koşullar altında mesodermal, ektodermal ve endodermal kaynaklı hücre tiplerine dönüşebilmektedirler (81).

Kök hücrelerin önceden belirlenmiş fonksiyonları yoktur; genlerden ve dış uyaranlardan aldıkları kimyasal sinyallere göre mesodermal, ektodermal veya endodermal kaynaklı hücre tiplerine dönüşebilmekte ve herhangi bir hücrede ölüm ya da hasar meydana geldiğinde hangi hücreye ihtiyaç varsa o hücreye farklılaşabilmektedirler. Simetrik ya da asimetrik bölünerek kendilerini yenilerler. Simetrik bölünürken, tüm kök hücre karakteristiğini taşıyan kardeş iki hücre oluştururlar; asimetrik bölünmede ise oluşan bir hücre kök hücre karakteristiğini korurken, diğeri farklılaşma yönünde uyarı alan bir hücre niteliğindedir (17, 82).

Bir hücrenin kök hücre sayılabilmesi için şu özelliklere sahip olması gerekir:

- Uzun zaman dilimleri boyunca kendilerini yineleyebilme yeteneğindedirler.
- Özelleşmemiş hücrelerdir.
- Yüksek farklılaşma kapasitesine sahiptirler.
- Hasar gören kaynak dokuyu işlevsel olarak yeniden yapılandırabilirler.
- Farklılaşma yetilerini invitro ortamlarda da gösterebilmektedirler (83).

2.4.2. Plastisite

Erişkin kök hücrelerinin uygun ortamda, uygun uyarılarla farklı hücrelere dönüşebilmesine transdiferansiyasyon ya da plastisite adı verilir. Kök hücrenin, başka bir doku veya organa ait kök hücre fenotipini kazanabildiği ve bazı durumlarda da mezoderm, ektoderm ve endoderm kökenli hücrelerin birbirlerine dönüşebildiği düşünülmektedir; bu duruma "kök hücre plastisitesi" denir. Plastisiteden bahsedebilmek için 3 koşul gerçekleşmelidir:

- Değişen hücrenin orijini hücre markırları ile belirlenmelidir.
- Değişen hücrenin, bulunduğu dokunun morfolojik parçası olduğu gösterilmelidir.
- Değişen hücre bulunduğu dokunun ya da organın fonksiyonlarını edinmelidir.

2.4.3. Kök Hücre Sınıflandırılması

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılırlar (81).

"Totipotent" kök hücreler, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip, embriyonik gelişimde ilk bölünen hücreler olarak tanımlanmaktadır. Fertilizasyonu takiben ilk 4-5 gün içerisinde, 8 blastomerli mórula evresine kadar, blastomerlerin her biri tek başına bir organizmayı meydana getirebilme yeteneğindedir.

"Pluripotent" kök hücreler, fertilizasyondan 5 gün sonra oluşan blastokistin, iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler olarak belirtilmiştir. Bu hücreler, üç germ tabakasına da dönüşebilme yeteneğindedir ancak tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar.

"Multipotent" kök hücreler, bu dönemden sonra oluşur. Gestasyonun ileri evrelerindeki hücreler, biraz daha özel görevlere sahip hücrelere dönüşürler ve bu hücreler yer aldıkları dokunun hücre tipini üretmeye başlarlar. Biraz daha özelleşmiş bu hücrelere multipotent hücreler denir. Daha sınırlı fonksiyonlara sahiptir. Sadece tek bir hücreye veya germ yaprağına farklılaşabilir (81, 82). Bunun en iyi örneği kemik iliği hücreleridir. HKH'ler kan hücrelerine farklılaşabilmektedir.

Sadece bir tip hücrenin kaynağını oluşturan kök hücrelere de progenitor ve prekürsör kök hücre adı verilir (örneğin karaciğer kök hücreleri, nöronal kök hücreler)

Kök hücreler köken aldıkları dokulara göre ise başlıca üç ana grupta tanımlanabilirler:

1. Embriyonik kök hücreler
2. Erişkin tip kök hücreler
    a. Hematopoetik kök hücre
        - Kemik iliği
        - Periferik kan
        - Kordon kanı
    b. Mezenkimal kök hücre
3. Fetüs kaynaklı kök hücreler (Fetal kök hücreler)

2.4.3.1.Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler, blastokistin iç hücre kitlesinden köken alan, sınırsız bölünme özelliği olan ve her üç germ yaprağına (mesoderm, ektoderm, endoderm) ait hücre tiplerine farklılaşabilen pluripotent hücrelerdir (17, 81, 82, 84, 85, 86). Bir başka dokuya nakledildiklerinde, bu hücrelerin spontan olarak olgunlaştığına ve fonksiyonel olarak

farklılaştığına dair çalışmalar mevcuttur (82). En güçlü kök hücre kaynağı olan **embriyonik KH'** ler, embriyonun iç hücre kitlesinden alınması nedeni ile etik sorun yaratmaktadır ayrıca vericiye nakledildiklerinde tümör (teratom) oluşturma potansiyelleri, allojenik kullanımlarında immün red oluşturmaları ve elde edilmelerindeki teknik problemler bu hücrelerin klinik kullanım olanaklarını kısıtlamaktadır (87). Etik problemler ve teratom oluşturma potansiyelleri, embriyonik kök hücrelerin klinik uygulamalardaki en önemli dezavantajlarıdır (81).

2.4.3.2.Erişkin Kök Hücreler

2.4.3.2.1.Hematopoetik Kök Hücreler

Erişkin dokularında bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Organizma yaşadığı sürece kopyalarını üreterek çoğalırlar ve bulundukları dokuda bir hasar olduğunda doku rejenerasyonunu sağlarlar (88). Erişkin kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlıdır, multipotentdîrler, tüm hücre tiplerine farklılaşamazlar, bulundukları doku hücreleri dışında sınırlı bir kaç farklı doku hücresine dönüşebilirler.

Erişkin doku kaynaklı ilk kök hücreler kemik iliğinden elde edilen hematopoetik kök hücrelerdir (HKH). HKH 'ler, kan hücrelerine farklılaşabilmektedir (81).

2.4.3.2.2.Mezenkimal Kök Hücreler

Son yıllardaki çalışmalar kök hücrelerin sadece kemik iliğinden değil, kemik iliği stroması içerisinde yer alan fibroblast benzeri uzantılı hücrelerden köken alan yeni bir kök hücre kaynağından da oluşabildiğini tariflemiştir. Bunlar mezenkimal kök hücre olarak adlandırılır (89). Mezankimal kök hücreler, günümüzde vücudun farklı doku ve organlarından izole edilebilen, farklılaşma potansiyelleri embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlı olan hücrelerdir. Bu hücreler, hücre yüzey işaretleri olarak HKH'lerden farklı olarak CD 14,CD 34, CD 38 ve CD 45 negatiftirler. Akım sitometrik analizlerle CD11, CD14, CD34, CD38, CD40, CD80, CD86, CD45 ve HLA-DR negatif olan bu MKH popülasyonlarının, SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD106, CD120a, CD124, CD73, CD90, CD105, CD166, Stro-1 ve HLA-ABC gibi hücre yüzey antijenleri için pozitif oldukları gösterilmiştir (88, 90, 91, 92, 93, 94).

Çalışmalar mezenkimal kök hücrelerin (MKH) kendilerini yenileyebilme ve farklı dokulara dönüşme açısından hematopoetik kök hücrelerden (HKH) daha güçlü olduklarını ve bu farklılaşmayı daha uzun süre koruyabildiklerini göstermiştir. Dokuya spesifik olmaksızın tüm vücut için rezervuar tamir hücreleridir (95). MKH'ler tüm bu özelliklerine ek olarak immunosupresif özelliklere de sahiptirler. Bu özelliği klinik olarak transplantasyon sonrası oldukça yarar sağlar. Erişkin kemik iliği MKH'lerinin hipoimmünojenik ve immunomodülatör özellikleri bulunmaktadır (96, 97). Kimi araştırmalar, bu hücrelerin allojenik olarak reddedilmediklerini ve allojenik hücre naklinde immünsupresyona ihtiyaç duyulmadığını göstermektedir (18, 90). Erişkin MKH'e kıyasla fetal kök hücrelerde hipoimmünojenite özelliği daha belirgindir. MKH'lerin en önemli özelliklerinden birisi, alıcıda inflamasyonu ve immünolojik yanıtları baskılamasıdır. İnvitro testlerde MKH'nin karışık lenfosit tepkime testlerinde allojenik yanıt göstermediği ve sitotoksik hücreler ile doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından ortadan kaldırılmadığı saptanmıştır. Bu özelliği klinik olarak çok önemli olup HLA Tip 1 reseptörü içermemesi ile açıklanabilir. Gelecekte özellikle insan kaynaklı MKH tıpta ve gen tedavilerinde daha önemli hale gelecektir.

MKH'lerin farklılaşabildiği hücreler arasında osteojenik, kondrojenik, adipojenik, kalp ve iskelet miyojenik hücreler vardır (14, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 99, 100). Son çalışmalar bu hücrelerin aynı zamanda nöronal, pankreatik,hepatik, damarsal endoteliyal gibi nöroektoderm ve endoderm kökenli hücrelere de farklılaşabildikleri gösterildiğinden, multipotent kök hücre sınıfına dahil edilmişlerdir.

MKH' ler, halen başta kemik iliği olmak üzere, kemik dokusu, kas dokusu, yağ dokusu, karaciğer, akciğer, dalak, pankreas, diş eti pulpası, plasenta, fetal kan, kord kanı gibi vücutta pek çok dokudan elde edilebilmektedir (14, 88, 101, 102, 103, 104, 105, 106). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, amnion sıvısının da zengin bir MKH veya multipotent kök hücre kaynağı olduğu gösterilmiştir (19, 20, 90, 93, 97, 99, 100, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115).

Aynı vericiden alındığında bile MKH' lerin kalitesi alındığı dokuya göre değişmektedir. Kemik iliğinden elde edilen MKH sayısı, diğer erişkin dokulardaki mezankimal hücrelerden elde edilenlere oranla daha fazladır. Bu nedenle, kemik iliğinin, klinik uygulamalarda kullanılabilecek en uygun MKH kaynağı olabileceğini göstermektedir (116).

İmmünsupresif özelliklere sahip bu hücreler, etik sorun yaratmamaları, otolog ya da allograft olarak elde edilebilir ve kullanılabilir olmaları nedeniyle özellikle doku mühendisliği ile birçok hastalığın tedavisinde kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (101, 117).

Kemik iliği, halen klinikte en yaygın kullanılan erişkin MKH kaynağı olmasına rağmen klinik kullanım alanları kısıtlıdır, ilikte MKH sıklığının göreceli düşük olması, yeteri kadar hücre elde edilmesinde güçlük çekilmesi (kemik iliği kaynaklı toplam hücrenin yaklaşık % 0.001-% 0.01 kadarı MKH'dir (88, 92), yeterli hücre elde edilmesi için tekrarlayan aspirasyonlar gerektirmesi, hücrelerin invazif bir işlemle elde edilmesi, hücrelerin farklılaşma ve kendilerini yenileme kapasitelerinin sınırlı olması (93, 102), kültür sürecinde hücre oranı ve farklılaşma kapasitesinin azalması, hücre sayılarının yaşa ve alındığı dokuya bağlı olarak azalmaları, kök hücrelerle ilgili araştırmaların tıpta uygulama alanlarının giderek artması nedenleriyle, yeni kök hücre kaynaklarının aranması gereksinimi doğmuştur (94, 103, 107, 116, 118, 119).

Sonuç olarak MKH'lerin avantajları,

-Diğer KH'lere göre daha kolay elde edilebilmeleri

-Teratom benzeri tümör gelişimi göstermemeleri

-Transplantasyon sonrası immünsupresif tedavi gerektirmemeleri

-Etik sorun yaratmamalarıdır.

2.5. MKH'nin Biyolojik ve Fonksiyonel Tanımlanması

2.5.1. İmmünfenotipleme

İmmünfenotipleme, hücrelerin yüzeyinde veya hücre içindeki antijenik yapıda olan proteinlerin, floresein izotiyosiyanat (FITC) ve fikoeritrin (PE) gibi floresan boyalarla (florokrom) işaretlenmiş özgün monoklonal antikorlarla inkübe edilerek bu antikorlara bağlanması esasına dayanır. Taşıdıkları antijenik yapının özelliğine göre farklı florokromlarla işaretlenen hücreler akım sitometrisinde bir basınç altında akarken lazer ışınlarına maruz kalırlar. Hücrelerin üzerine bağlanan floresanla konjuge edilmiş monoklonal antikorlar, lazer ışınını absorbe ederek, üzerindeki florokromun özelliğine göre farklı dalga boylarında ışın saçarlar. Her hücreden saçılan ışınlar, çoklu dedektörler yardımı ile belirlenir ve elektirik enerjisine çevrilen bilgiler, bilgisayar ortamına aktarılarak analiz edilir (120).

2.5.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerde Eksprese Olan Antijenik Belirteçler

MKH, heterojen bir hücre topluluğudur. Bu hücreler birçok yüzey antijen belirteci

eksprese ederler; morfolojik, immünfenotipik, fonksiyonel özellikleri birbirine benzemektedir, fakat hiçbirisi MKH' lere spesifik değildir (90, 92). Literatürde, MKH'lerin hematopoetik belirteçlerden CD11b, CD14, CD34, CD45, CD38 (82, 90, 92, 93, 101), endotelyal belirteçlerden CD34, CD31 (adezyon molekülü, platelet/endotelyal hücre adezyonu molekülü), vWF, CD133, CD33 (92), CD80, CD86, CD40, CD18 (lökosit fonksiyon ilişkili antijeni), CD56 (nöronal hücre adezyon molekülü) ve MHC-Klas 2 'yi (90, 101) eksprese etmediğini (21,24,26,28,29,32,33,37,39), buna karşın Stro-1, S B10/C D166/ALCAM, CD105/SH2, CD106, CD73/SH3-4, a1, (31, a5, 01, a2, a3, a6, av, (32, (34, MHC-klas 1), CD44, CD90 / thy-1, CD71, CD106 (VCAM1), ICAM1 (17,26), CD13, CD54, CD63, CD140b (24), CD49e, CD117 , scal, CD120, CD124 ve CD29'u eksprese ettiği görülmüştür (82, 88, 90, 92, 94).

2.5.2. Kök Hücre Rezervuarları (Niche)

Farklılaşmamış multipotent MKH'lerin yeri ve özellikleri hakkında bilinenler azdır. Bu hücreler birçok dokuda, kök hücre reservuarlarında (niche) bulunabilir. Travma, hastalık veya yaşlanma durumunda sessiz kalmış kök hücreler, kendini yenileyerek ve farklılaşarak etki gösterirler. Uyaran aldıklarında, kök hücreler rezervuarından ayrılır ve dolaşıma geçerek spesifik mikroçevrede bir başka hasarlı alana doğru (homing) çekilir. MKH' lerin homing özelliği kemokin reseptörleri sayesinde olur. Kemokin reseptörleri kök hücrelerinin migrasyonunda rol oynarlar (92, 93).

2.5.3.MKH' lerin Kültür Koşullarında Büyüme ve Çoğalması

MKH' ler kültür kaplarında ve özgün besiyerlerinde çoğaltılırlar. Kültür işleminin ilk haftasında kültüre yapışan hücreler fibroblastik bir görünüm alır ve koloniler halinde hızla prolifere olurlar (121). MKH'ler in vivo uygulandığında hasarlı organa yerleşebilmektedir (96, 107). Travma ve enflamasyon durumunda, travma sahasına gidip gelmelerini sağlayan (trafficking), hücre adezyonunu gerçekleştiren ve infiltrasyonda rol alan spesifik reseptörler ve ligandlar eksprese etmektedirler. İnflamasyonda da MKH'lerin lökositlerin göçü için, endotelden lökositlerin göçüne neden olan bazı adezyon moleküllerini de eksprese ettiği bildirilmiştir (90).

2.5.4. Adezyon Molekülleri

Hücre-hücre etkileşimleri, hücrelerin yapı ve fonksiyonlarını korumada gereklidir. Hücre-hücre etkileşimi, hücre adezyon molekülleri aracılığı ile gerçekleşir. Başlıca görevleri, hücre sinyal iletimidir. Hücrelerin dokulara migrasyonunda, hücre büyümesi, farklılaşması,

embriyogenezis ve inflamasyonda görev alırlar (90, 120).

2.5.5. Kemokin ve Kemokin Reseptörleri

Kemokinler (kemotaktik sitokinler) biyolojik ve patolojik süreçte düzenleyici görevleri olan küçük glikoproteinlerdir. Kemokinler, inflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve kök hücrelere göç yaptıran sitokinlerdir. Lökositlerin hasarlı doku sahasına gidip gelmesini (trafficking), hematopoezis, angiogenezis ve organogenezisi sağlarlar (90).

2.5.6. Farklılaşma

MKH'ler, in vitro osteosit, kondrosit, adiposit gibi mezodermal hücre tiplerine (14, 93, 122) farklılaşabildiği gibi, yeni çalışmalarla gösterildiği üzere endotel, myosit, hepatosit (113) ve nöronal hücrelere de (19) farklılaşabilirler.

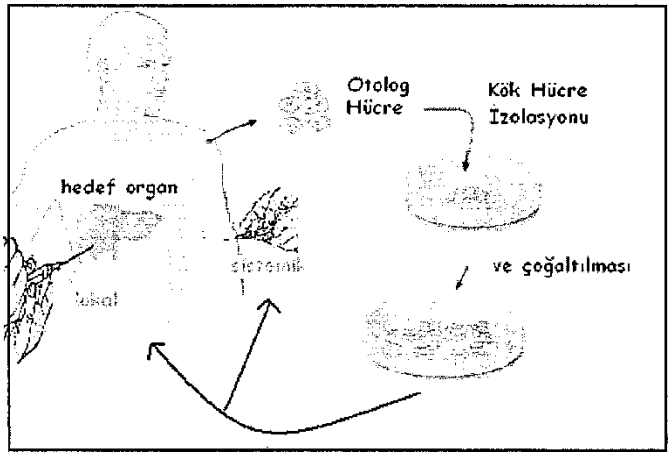
Literatür bilgilerine göre, rutin hücre kültürü uygulanan ve normal hücre besiyerleri ile çoğalmaları sağlanan kemik iliği hücre kültürleri, kültür işleminin sonunda özel besiyerlerinde 37° C de, % 5 CO_2 'li ve nemli ortamdaki kültür kabında tek tabakalı üreme gösterirler ve mezankimal kök hücreler elde edilir (96).

İn vitro koşullarda, MKH kültürlerinde her bir özelleşmiş farklılaşma sürecinin gelişimini sürdürebilmesi için birçok transkripsiyon faktörü, sitokin, büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks molekülleri gibi otokrin ve parakrin faktörler gereklidir (93, 123).

2.5.7.MKH' lerin Hipoimmünojenik Özelliği ve Klinik Kullanım Alanları

Rejeneratif tıp, hasarlı veya kaybedilmiş organ veya dokuların, laboratuar koşullarında oluşturulmasıyla ilgilenen multidisipliner yaklaşımları içermektedir. Hücre tedavisi ve doku mühendisliği, rejeneratif tıbbın ana komponentleridir. Doku mühendisliğinde, üç boyutlu biomateryallerle (skaffold) birlikte doku kültürü ortamında (in vitro, ex vivo) çoğaltılan hücreler, kaybedilen hücre ve dokuların onarılması için alıcıya (in vivo) nakledilmektedir (21, 124).

Kök hücreler, otolog (alıcının kendi dokusu) veya allojenik (kendi türünden) olabilir ve sistemik yolla (kan yoluyla) veya lokal (direkt dokuya) olarak (Şekil 10) uygulanabilirler (17, 21, 95, 124). Literatürdeki örnekleri az olmakla birlikte, insan KH'lerinin hayvanlarda kullanıldığı "ksenograft" (farklı türler arasında) hücre nakilleri de bulunmaktadır (22, 125, 126).



Şekil 10 : Kök hücre tedavisi (12)

MKH' nin en önemli özelliklerinden biri alıcıda inflamasyonu ve immünolojik yanıtları baskılamasıdır (85, 101). Bu nedenle terapötik yaklaşımlarda, allojenik hücre naklinde immunsupresyona gerek duyulmadığı ileri sürülmektedir (18, 101, 117). MKH'lerin, in vitro birçok değişik hücre tipine farklılaşmaları, kültür koşullarında kolayca çoğaltabilmeleri, genetik olarak stabil olmaları, alternatif kaynaklardan elde edilebilir olmaları ve hipoimmünolojik karakteristikleri, doku kaybı ile seyreden pek çok hastalığın tedavisinde güvenilir bir kaynak olduklarını düşündürmektedir (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

MKH 'ler, hasar gören dokulara dönüşebilme kapasiteleri yanında, sınırlı sayıda canlı kalmış hücrelerin fonksiyonlarını da düzenleyip, ömrünü uzatabilir, yeni damar oluşumunu sağlayarak dolaşımını düzenleyebilir, doku rejenerasyonuna katkıda bulunabilir ve hasarlı dokuda inflamasyonu baskılayarak skar dokusu oluşumunu engelleyebilirler.

MKH' lerin potansiyel klinik kullanım alanlarından biri, kemik iliği supresyonu yapılmış kemoterapi veya radyoterapi uygulanan hastalarda yeniden hematopoezin hızlanmasını desteklemektir (127).

Allojenik HKH naklinden sonra hastaların yaklaşık % 50'sinin hayatını tehdit eden ciddi bir transfüzyon reaksiyonu olan, başlıca deri döküntüsü, ishal ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma şeklinde kendini gösteren "Graft Versus Host Disease" (GVHD)' in azaltılmasında da MKH' ler kullanılmaktadır. Bu hastalarda, MKH infüzyonundan sonra, infüzyonun toksik etkisine rastlanmamış, hem graft kaybı olmamış hem de immunomodulator etki gösterilmiştir (127).

-İmmun yetmezliklerde,

-Osteogenezis Imperfekta (Ol) tedavisinde (128, 129),

-Metakromatik lökodistrofi (MLD) ve mukopolisakkaridoz tip 1 (MPS-1H) (hürler) hastalığı gibi kalıtsal hastalıklarda (130),

-Derin deri yanıklarında (131) ve kronik yaralarda,

-Kıkırdak ve kemik defektlerinin tedavisinde (101)

-Myokard infarktüsü ve iskemik kalp hastalıklarında (132, 133),

-Hepatik ve pankreatik rejenerasyonda,

-Renal tübüler rejenerasyonda kullanımı gösterilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Histokimyasal ve immunohistokimyasal değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada toplam beş grup oluşturulmuştur. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir:

Grup 1 (Kontrol grubu, n=7): Hiç bir uygulamanın yapılmadığı gruptur. Deney bitiminde sakrifiye edilen deneklerin sağ overleri histolojik olarak incelenmek üzere, sol overleri ise biyokimyasal ve elektron mikroskobik incelenmek üzere alınmıştır.

Grup 2 (Torsiyon grubu, n=7): Torsiyon uygulaması(2 saat) sonrasında denekler sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası sağ overleri histolojik olarak incelenmek üzere, sol overleri ise biyokimyasal ve elektron mikroskobik incelenmek üzere alınmıştır.

Grup 3 (Torsiyon-Detorsiyon (T/D) grubu, n=7): Torsiyon uygulaması(2 saat) sonrasında 2 hafta detorsiyona bırakılan olan gruptur. Deney bitiminde sakrifiye edilen deneklerin sağ overleri histolojik olarak incelenmek üzere, sol overleri ise biyokimyasal ve elektron mikroskobik incelenmek üzere alınmıştır.

Grup 4 (Mezenkimal Kök Hücre (MKH) grubu n=7): Deneklerin sağ ve sol over dokusu içerisine mezenkimal kök hücrelerin enjekte edildiği gruptur. Deney bitiminde sakrifiye edilen deneklerin sağ overleri histolojik olarak incelenmek üzere, sol overleri ise biyokimyasal ve elektron mikroskobik incelenmek üzere alınmıştır.

Grup 5 (T/D + MKH grubu n=7): Torsiyon süresi(2 saat) sonunda deneklerin ovaryum dokusuna mezenkimal kök hücrelerin enjekte edilip 2 hafta detorsiyona bırakılmasıyla oluşan olan gruptur. Deney bitiminde sakrifiye edilen deneklerin sağ overleri histolojik olarak incelenmek üzere, sol overleri ise biyokimyasal ve elektron mikroskobik incelenmek üzere alınmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Birimi' nden (DETFAB) temin edilen Wistar suşu toplam 35 dişi sıçan (200-250 g) kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçilmiştir. Tüm denekler çalışma sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 ºC oda sıcaklığında barındırılmıştır. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslenmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmamış olup, T grubu, T/D grubunda torsiyon modeli klemplerle gerçekleştirilmiş olup MKH grubuna her bir denekteki ovaryum başına yaklaşık 1 milyon mezenkimal kök hücre enjekte edilmiştir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada; deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler kullanılmıştır. Biyokimyasal incelemeler için HPLC, soğutmalı santrifüj, santrifüj, terazi, pH metre, vorteks, manyetik karıştırıcı, derin dondurucu, plak okuyucu (Abs/Flu/Lum) kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen & Eozin, PAS ve Masson Trikrom, immünohistokimyasal olarak Active Caspase-3 ve Tunel boyamaları yapılmıştır.

3.6.2.1. Histokimyasal İncelemeler

Sağ ovaryum histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fiske edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika

iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo 1).

Tablo 1 : Rutin doku takibi protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.2.2.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 2).

Tablo 2 : Hematoksilen-Eozin boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.2.2. Masson Trikrom Boya Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60˚C'lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçiridi. Distile suda çalkalandıktan sonra masson trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinden dokular üzerine 4 damla weigert hematoksilen boyası ile 4 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 2 damla asit-alkol çözeltisi 4 dakika sonra uzaklaştırıldı. Ardından 2 damla ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı 4 dakika bekletilen kesitler distile su ile yıkandı. Daha sonra 2 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 10 dakika muamele

edildikten sonra uzaklaştırıldı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3 : Masson Trikrom boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda Isısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda Isısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:1 (Weigert Demirli Hematoksilen) + No:2 (Weigert Demirli Hematoksilen) solüsyonu	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:3 (Pikrik asit)	4 dakika
Boyama	No:4 (Fuksin Çözeltisi)	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:5 (Fosfomolibdik Çözeltisi)	10 dakika
Boyama	No:6 (Masson Anilin Mavisi)	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.İmmünohistokimyasal İncelemeler

İmmunohistokimyasal analizler, hücre ve dokularda var olan makromoleküllerin işaretlenmesi esasına dayanmaktadır. Aşağıda belirtilen üç temel adım ile işaretleme gerçekleşir.

1. Primer antior özel antijene bağlanır,
2. Antikor-antijen kompleksibir konjugasyon enzimi yardımıyla ikinci bir antikora bağlanır,
3. Substrat ve kromojen varlığında bu enzim antikor-antijen bağlanma bölgesinde renkli bir depozite dönüşür. Görünüm ışık mikroskobunda histopatolojik olarak değerlendirilir.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi ve hücrelerdeki DNA fragmantasyonunun gösterilmesi için immünohistokimya yöntemler kullanıldı. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırık oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığıyla biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine (DAB), işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Hematoksilen ile art alan boyaması yapılarak işlem sonlandırılır. İmmunohistokimyasal yöntemlerle fragmante nukleuslar veya sitoplazma koyu kahverengi boyanır.

3.6.2.3.1.Tunel Boyama Protokolü

Tez çalışmasında hücre içi DNA fragmantasyonu saptamak amacıyla In Situ Cell Death Detection kiti (ROCHE) kullanıldı.

Her deneğin ovaryum dokusundan alınan 5µm'lik seri kesitlerden 27. preparat bu prosedüre göre boyandı ve analiz edildi.

Alınan kesitler önce 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilmiş daha sonra da rutin ışık mikroskobik deparafinizasyon sürecinden geçirildi. Şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilene tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidratasyon sağlanarak 5'er dakika iki değişim distile suda bekletildi. Distile su aşamasına getirilen kesitler öncelikle nemli çembere yerleştirilmiş ve fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile

beş dakika muamele edildi. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizilerek alan kısıtlandı. Kurutma kağıdı ile üzerindeki PBS emdirilen dokular Proteiaz K solüsyonu ile 15 dakika oda ısısında muamele edildi. Daha sonra dokular 2 kez PBS ile yıkandı. Taze hazırlanmış %3'lük H_2O_2 (hidrojen peroksit) ile 5 dakika oda ısısında bekletilen dokuda endojen peroksizdaz aktivitesi inhibe edildi ve tekrar PBS ile 2 defa yıkandı. Doku üzerindeki fazla sıvı kurutma kağıdı ile emdirildi ve kit içerisinde reaksiyon solüsyonu ve TdT enzim solüsyonu şeklinde ayrı ayrı bulunup kullanımdan önce ikisinin karıştırılmasıyla taze bir şekilde hazırlanan TdT enzim karışımı (450µl reaksiyon solüsyonu + 50µl TdT enzim solüsyonu) ile muamele edilen kesitler 37 C de 1 saat nemli çemberde inkübe edildi. Bu işlemin ardından 3 kes PBS ile yıkama yapıldı. Kesitler Converter POD solüsyonu ile otuz dakika etüvde inkübe edildi. Etüvden çıkarılan kesitler PBS ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) kromojeniyle muamele edilen kesitler distile su ile iyice çalkalandı. Mayer's hematoksilen ile art alan boyaması yapıldı ve 3 değişim ksilol ile şeffaflaştırılan kesitler entellan şle kapatıldıktan sonra mikroskopta görüntülendi.

3.6.2.3.2.Active Caspase-3 Boyama Protokolü

Aktif kaspaz 3 boyaması için (AB3623, Millipore, Temecula, CA, USA, and Polyclonal antibody) kiti kullanılmıştır. Alınan kesitler öncelikle 60 ºC'lik etüvde bir gece bekletildi. Daha sonra şeffaflaştırmak amacıyla 30' ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı PapPen ile çizildi. Ardından mikrodalgada Sodyum Sitrat solüsyonu (Bio-Optica) içerisinde, 600 watta 6 dakika tutuldu. Soğuması için 20 dakika bekletildi. 3 kez PBS ile yıkanan kesitler 10 dk H_2O_2 ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 1 saat Bloklama Solüsyonu (TA-125-UB, Invitrogen-, Fremont, CA) ile bekletildi. Primer antikor rat spesifik anti-caspase-3 (1:100; AB3623, Millipore, Temecula, CA, USA, and Polyclonal antibody) ile + 4 ºC' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (Invitrogen-Plus Broad Spectrum 85-9043) ile 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer's Hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

3.6.2.4.Biyokimyasal Analizler

3.6.2.4.1.Malondialdehit Düzeylerinin İncelenmesi
MDA düzeyleri, spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü.

Bunun için;

-R1 (N-metil-2-fenilindol)

-R2 (konsantre hidroklorik asit)

-MDA standartı (1,1,3,3-tetrametoksipropan, TMOP)

-BHT (Butil Hidroksi toluen)

-Probukol

-Metanol kullanıldı.

R1 ayracının hazırlanışı; 3 volüm (18 ml) R1 ayracına 1 volüm (6 ml) %100 metanol ilave edilir. Ve bu solüsyon +4°C'de 2 gün bekletilir.

Gerekli aletler ise;

-Spektrofotometre

-Spektrofotometrik küvet

-Sıcak su banyosu (45±1 °C)

-Tek kullanımlık tüpler

-Mikrosantrifüjdür.

Uygulama basamakları;

1. Her bir tüpe 10 µl probukol konulur.
2. Üzerine 200 µl örnek (doku homojenatı) ilave edilir.
3. 640 µl dilue edilmiş R1 ayıracı ilave edilir.
4. Her tüp kısa bir süre vortekslenir.
5. Üzerine 150 µl R2 ayıracı eklenir.
6. Tüplerin kapakları kapatılarak tekrar vortekslenir.
7. Tüpler 45°C'de 60 dakika inkübe edilir.
8. Bulanık renkte olan homojenat santrifüj edilerek (10.000g devirde 10 dakika) berrak bir supernatant elde edilir.
9. Supernatant kısmı küvete alınır.
10. 586 nm soğurulmaya bırakılarak değerlendirilir.

3.6.2.5.Kök Hücre Kültürü

3.6.2.5.1.Immunfloresans Boyama

Rat Mesenchymal Stem Cell Kit (SCR026) kullanıldı.

1- Slaytlar üzerine ekilen mezenşimal fare kök hücreleri 80-90% yoğunluğa ulaşana kadar kültüre edildi.
2- 1XPBS ile iki kez yıkandı.
3- 4% paraformaldehid ile 30dakika oda sıcaklığında fikse edildi.
4- 3 kez 5 dakika çalkalamalı olarak yıkandı.
5- 2 saat bloklama solüsyonu (PBS içinde 5% at serumu, 0.3% triton X-100) ile inkübe edildi.
6- Primer antikorlar 5% at serumu içeren 1X PBS içinde hazırlandı. Antikor dilüsyonları;

Tavşan anti-integrin B1: 1/500

Fare anti-CD54: 1/100

Fare anti-CD14: 1/1000

Fare anti-CD45: 1/100

7- Kontrol kuyularında fare ve tavşan IgG antikorları kullanıldı.
8- Hücreler antikorlar ile O/N 4C'de inkübe edildi.
9- Hücreler 10 dakika 2 kez 1X PBS ve 2 kez de bloklama solüsyonu ile yıkandı.
10- Son yıkamada hücreler bloklama solüsyonu içinde 30dk bırakıldı.
11- Anti-rabbit seconder antikor Alexa488 1:2000, anti-mouse seconder antikor Alexa 555 1:2000 ve anti-mouse seconder antikor FITC 1:1000 oranında bloklama solüsyonu ile hazırlandı.
12- 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
13- 5 kez 5'er dakika 1XPBS ile yıkandı.
14- Hücre çekirdekleri DAPI/1XPBS solüsyonu ile boyandı.
15- Mounting media ile slaytlar lam üzerine kapatıldı.

3.6.2.5.2.Mezenşimal Kök hücrelerin Adiposit Hücrelerine Farklılaştırılması

SCR020 Mesenchymal Stem Cell Adipogenesiz kit kullanıldı.

Adipogenez uyarıcı ortam; DMEM büyüme ortamı içerisine, 10% FBS, son konsantrasyon 1uM olacak şekilde dexamethasone, son konsantrasyon 0.5mM olacak şekilde IBMX, 10ug/mL insulin, son konsantrasyon 100uM olacak şekilde Indomethacin, 1X penicillin/streptomycin eklenerek hazırlandı.

Adipogenez sürecinin idamesi için kullanılan ortam; DMEM büyüme ortamı içerisine, 10% FBS, 10ug/mL insulin, 1X penicillin/streptomycin eklenerek hazırlandı.

1. Normal şartlarda büyütülmüş ADAS'lar en geç 3. pasajda %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanarak 24 kuyulu hücre kültür kaplarına $6x10^4$ adet olacak şekilde ekildi.
2. İki gün inkübe edilen %100 yoğunluğa ulaşan hücrelere, ticari *'Adipogenez yönlendirici kit'* içerisinde yer alan bileşenlerle hazırlanan adipogenezi uyaran ve adipogenezi idame ettiren ortamlar eklendi ve 21 gün sonunda adipojenik diferansiyasyonları değerlendirildi,

3. Adipogenezi uyarıcı kültür ortamı 1., 3., 5., 9., 11., 13., 17., 19. ve 21. günlerde yenilendi. Bu inkübasyon sürecinde hücreler 7. ve 15. günlerde adipogenezi idame ettiren ortam ile inkübe edildi.
4. Adipogeneze yönlendirilmiş ADAS'ların diferansiyasyonunun gerçekleştiği ışık mikroskobunda net bir şekilde gözlendi, literatürde kabul edilmiş adiposit boyası olan red-oil boyası ile boyanarak yağ vakuolleri gösterildi.
5. Boyama için adipositler %4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonu ile 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek fikse edildi.
6. PBS'le yıkanıp PFA uzaklaştırıldıktan sonra red-oil boyası ile 50 dakika oda sıcaklığında boyama yapıldı.
7. Su ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırılan boyanın ardından hematoksilen boyası ile çekirdekler boyandı.

Hücre görüntüleri ışık mikroskobunda incelendi ve görüntüler kaydedildi.

3.6.2.5.3.Mezenşimal Kök hücrelerin Osteosit Hücrelerine Farklılaştırılması

SCR028 Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis kit kullanıldı.

Osteogenez uyarıcı ortam; DMEM büyüme ortamı içerisine, 10% FBS, son konsantrasyon 0.1uM Dexamethason solüsyonu, 0.2mM askorbikasid-2fosfat solüsyonu, 10mM gliserol-2fosfat solusyonu , 1X L-Glutamin ve 1X penicillin/streptomycin eklenerek hazırlandı.

1- Normal şartlarda büyütülmüş ADAS'lar en geç 3. pasajda %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanarak önceden vitronektin ve kollajen ile kaplanmış 24 kuyulu hücre kültür kaplarına $6x10^4$ adet olacak şekilde ekildi.
2- Kültür kapları kaplaması yapılırken her birinin son konsantrasyonu 12 µg/ml olacak şekilde kollajen ve vitronektin aynı steril PBS içerisinde çözüldü ve 24 kuyulu hücre kültür kaplarına eklendi. Gece boyunca oda sıcaklığında kaplama jellerinin donması beklendi. Bir sonraki gün hücreler bu jellerin üzerine ekildi.

3- İki gün sonra %100 yoğunluğa ulaşan hücrelere, *'osteogenez yönlendirici kit'* içerisinde yer alan bileşenlerle hazırlanan osteogenez uyarıcı ortam eklendi ve 21 gün sonunda osteojenik diferansiyasyonları değerlendirildi.

4- Osteogenez uyarıcı kültür ortamı 2 günde bir yenilendi.

5- Osteogeneze yönlendirilmiş ADAS'ların diferansiyasyonunun gerçekleştiğinin gösterilmesi amacıyla Alizarin Red boyası kullanılarak ve hücreler arası kalsiyum depozitleri gösterildi.

6- Boyama için fiksasyon amacıyla %70'lik etanol ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

7- PBS ile yıkama ardından etanol ortamdan uzaklaştırılarak, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle Alizarin Red boyası ile boyama yapıldı.

Boya, su ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırılıp, hücreler ışık mikroskobunda farklı büyütmelerde incelendi ve görüntülendi.

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

Tez Konusu Belirlenmesi ve Literatür Taraması
Haziran 2012-Eylül 2012
Etik Kurul ve Yönetim Kurulu Onayı
Ekim 2012-Kasım 2012
BAP Proje Girişi ve Kabulü
Aralık 2012-Mart 2013
Deneysel Materyallerin Toplanması ve Dokuların Değerlendirilmesi
Nisan 2013-Mayıs 2013
BAP Malzeme İsteği
Haziran 2013-Temmuz 2013
Laboratuvar Çalışmaları
Ağustos 2013-Ekim 2013
Tez Yazımı
Ekim 2013-Aralık 2013

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Histolojik kesitler boyandıktan sonra ışık mikroskop altında değerlendirilmiştir. İmmunohistokimyasal boyama ardından ışık mikroskopta seçilen DNA fragmantasyonundan yoğun alanlarda birim karedeki (4000μm²) hücreler sayılmış ve TUNEL pozitif olan hücre sayıları not edilmiştir. Her grup için elde edilen veriler SPSS 15.0 istatistik programında Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiş ve $p<0,05$'den küçük bulunmuştur. Gruplar arası istatistiksel farklılık ise Mann-Whitney-U testi ile değerlendirilmiştir ve $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş ve herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır. Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10 Etik Kurul Onayı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 67/2012 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

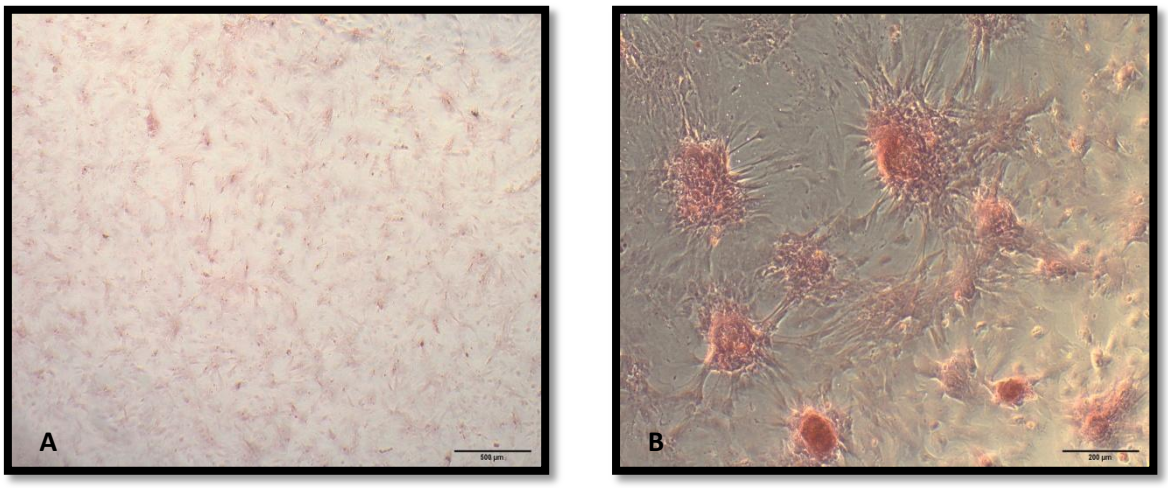
Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Kök Hücrelerin Farklılaştırılmasının Görüntülenmesi

Osteogenesis;

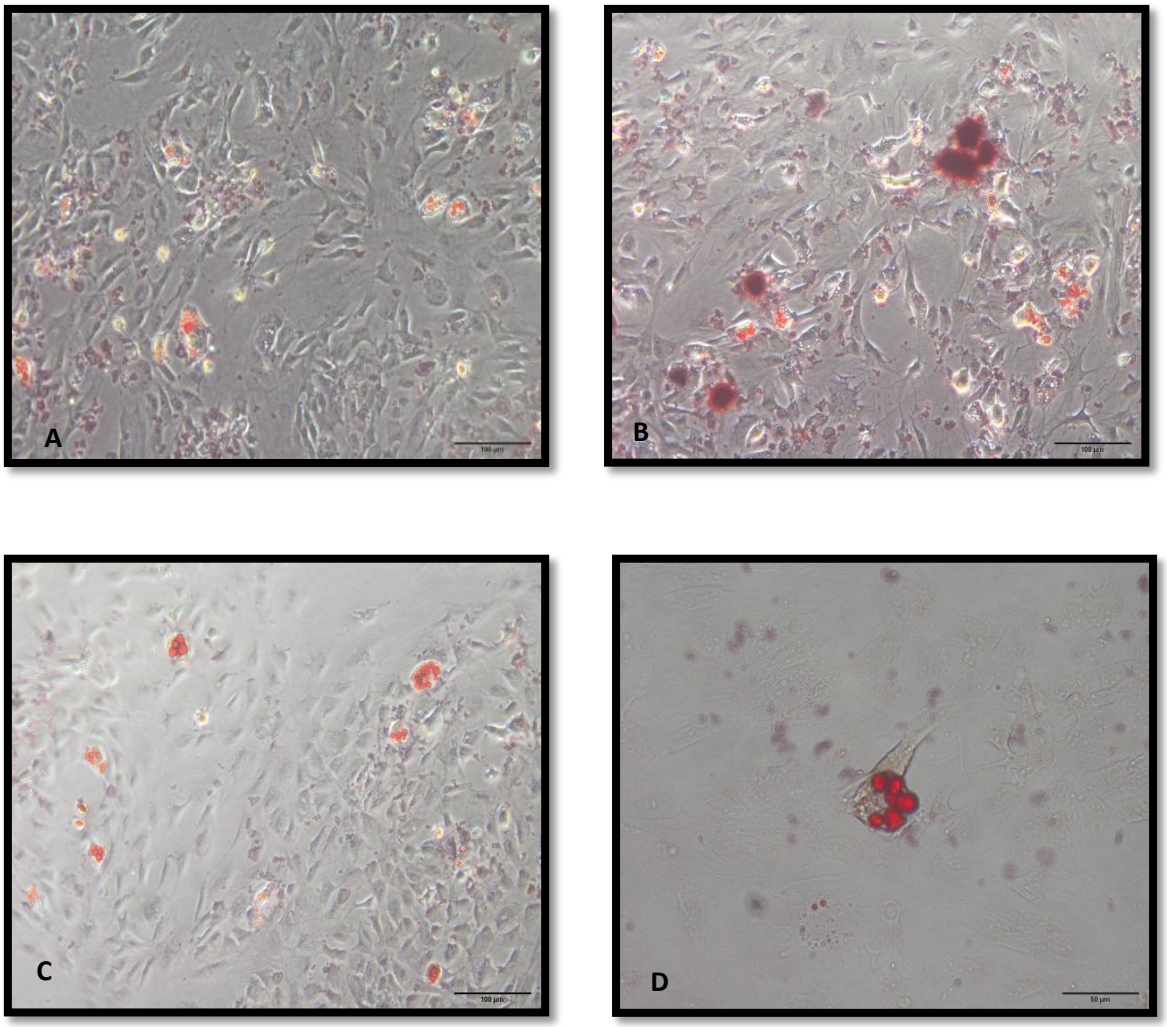
Çalışmamızda kullandığımız kök hücreler Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır. Hücrelerin farklılaştırılması SCR028 Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis kiti kullanılmıştır. Hücreler ostegenik uyarıcı ortamda farklılaşarak osteoklast hücrelerine dönüştürülmüştür. Hücrelerin görüntülenmesi Alizarin red boyası ile sağlanmış olup ışık mikroskobunda görüntülenmiştir.



Şekil 11 : Alizarin red S boyası ile boyanan Ca depozitleri. (A : X4, B:X10 büyütmede)

Adipogenezis;

Hücrelerin adipojenik farklılaştırılmasında SCR020 Mesenchymal Stem Cell Adipogenesiz kiti kullanılmıştır. Hücreler adipojenik uyarıcı ortamda farklılaşarak yağ dropletlerine dönüşmüştür. Hücrelerin görüntülenmesi Red-Oil boyasıyla sağlanmış olup ışık mikroskobunda görüntülenmiştir.



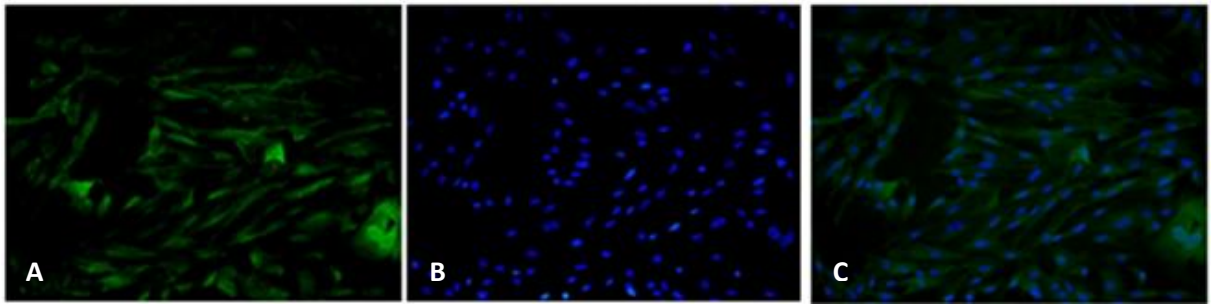
Şekil 12 : Red-oil boyasıyla boyanan yağ dropletleri (A: X20, B:X20, C:X20, D:X40)

4.1.1.Kök Hücrelerin Yüzey Markırlarıyla İşaretlenmesi

Deneyde kök hücrelerin işaretlenmesinde integrin β1, CD54, CD45 ve CD14 antikorları kullanılmıştır. İntegrin β1 ve CD54 kök hücreler için pozitif yüzey markırlarıdır. CD14 ve CD45 ise kök hücre için negatif yüzey markırlarıdır. Antikorlarla işaretlenen hücreler flouresan mikroskopta görüntülenmiş ve görüntüler kaydedilmiştir.

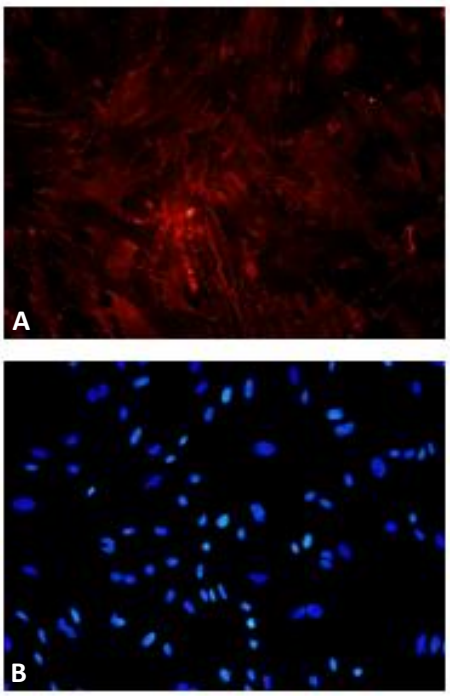
İntegrin β1pozitif boyaması;

FITC DAPİ MERGE



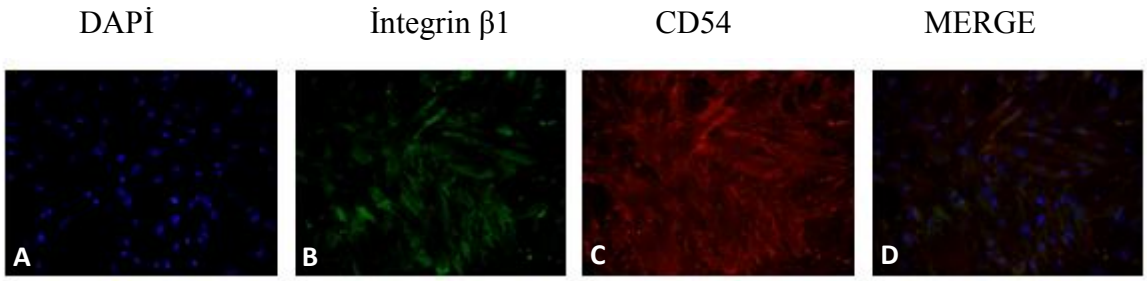
Şekil 13: İn-vitro ortamda mezenkimal kök hücrelerin İng β1 yüzey markırıyla pozitif işaretlenmesi. (Flouresans mikroskobu, X20) (A:FITCH ile işaretlenmiş hücre sitoplazması, B: DAPİ ile işaretlenmiş çekirdekler, C: Görüntülerin üst üste bindirilmesi)

CD 54 pozitif boyaması;



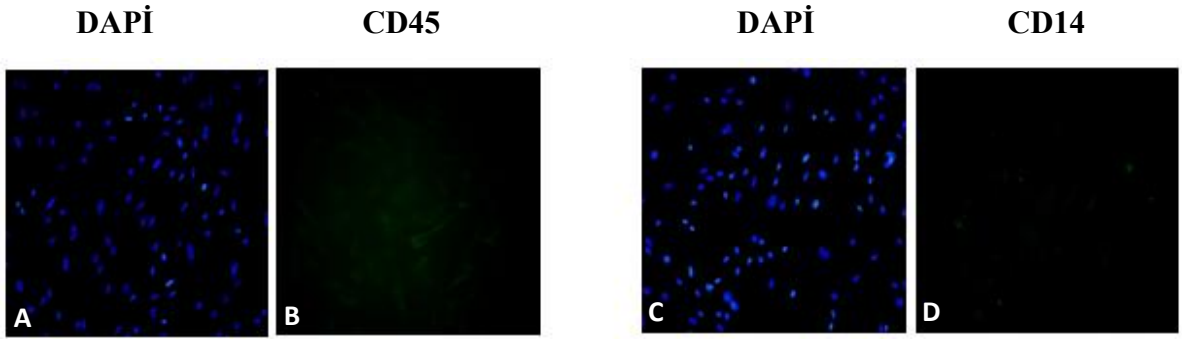
Şekil 14 :İn-vitro ortamda MKH'lerin CD54 yüzey markırıyla pozitif boyanması (Flouresans mikroskobu,) (A:CD54 işaretlemesi, B:Hücre çekirdekleri)

Double Pozitif Boyama;



Şekil 15 : İn-vitro ortamda MKH'lerin İng β1 ve CD54 yüzey markırlarıyla double pozitif boyanması (Flouresans mikroskobu, X10)(A:DAPİ ile işaretlenen hücre çekirdekleri, B: İng β1 ile pozitif boyama, C: CD54 ile pozitif boyama, D: İki boyamanın üst üste bindirilmiş görüntüsü)

Negatif Boyama;



Şekil 16 : İn-vitro ortamda MKH'lerin CD45 ve CD14 ile negatif boyanması. (flouresans mikroskobu, X10) (A,C: DAPİ ile işaretlenen hücre çekirdekleri, B,D : CD45 ve CD14 ile negatif boyanan hücreler)

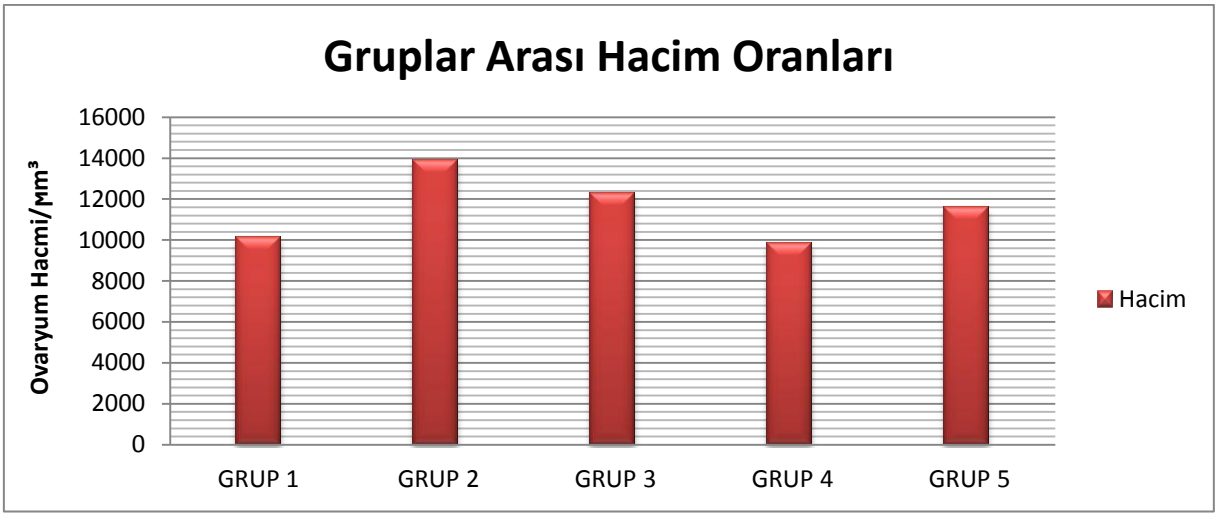
4.2. Morfometrik Değerlendirmeler

4.2.1. Ovaryum Hacim Hesabı

Ovaryum dokusunda 5μm'lik seri kesitler alındı.Mikroskopta en küçük büyütmede (X4) ovaryum kesit alanları UTHSCSA ImageTool Version 3.0 programı kullanılarak yüzey alanları hesaplandı. Elde edilen verilerle her gruptaki 7 deneğin ovaryum yüzey alanı ve hacmi hesaplandı. Torsiyon grubunun (G2) hacmi kontrol grubuna (G1) göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlendi. Torsiyon grubunun (G2) Kök hücre verilen gruba (G4) göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlendi. Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. (Tablo 4)

Tablo 4 : Gruplar arası hacim oranlarındaki istatistiksel farklar (p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.)

Gruplar	Değerler (p-value)	Sonuç
Grup 1 **Grup 2**	**0,041***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 1 **Grup 3**	0,310	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 1 **Grup 4**	0,937	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 1 **Grup 5**	0,485	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 2 **Grup 3**	0,485	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 2 **Grup 4**	**0,015***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 2 **Grup 5**	0,310	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 3 **Grup 4**	0,093	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 3 **Grup 5**	0,485	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 4 **Grup 5**	0,240	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**



Şekil 17 : Gruplar arasındaki ovaryum hacim oranları

4.2.2. Folikül Sayısının Değerlendirilmesi

Tüm foliküller için lüteratüre uyumlu olarak her deneğe ait seri kesitlerden sistematik bir biçimde seçilmiş 4 kesitte sayım yapıldı. Folikül sayıları önceden oluşturulmuş tabloya sayısal veriler olarak not edildi. Daha sonra bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

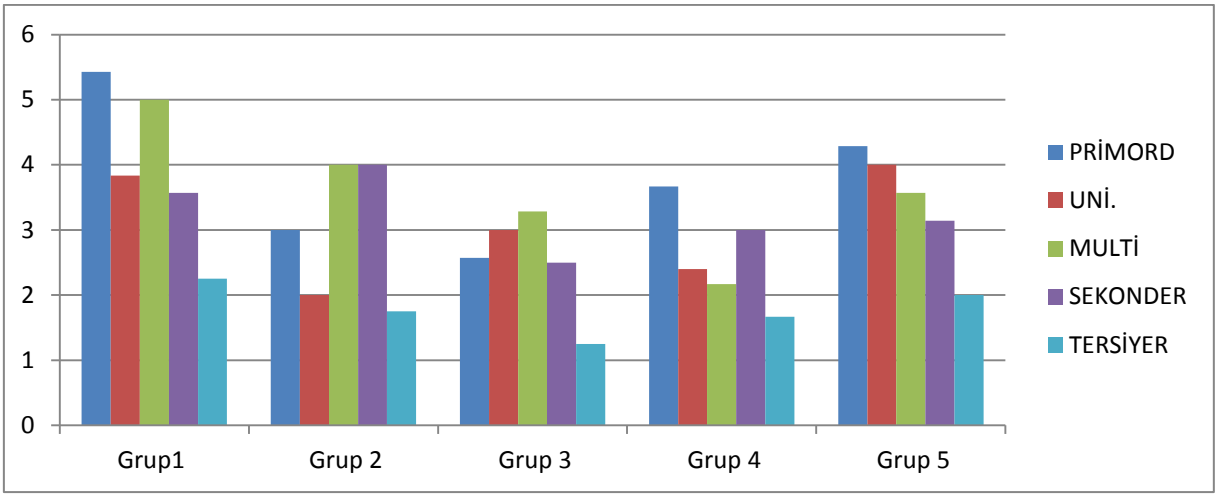
Foliküller primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer ayrıca CL da değerlendirmeye katıldı. Folikül sayılarının değerlendirilmesinde oosit havuzunda bulunan primordiyal folikülleri dikkate aldık.

Folikül sayımı, her bir folikül çeşidi için fiziksel disektör yöntemi kullanılarak her folikülün büyüklüğüne uygun seri kesitler sistematik olarak seçilen kesitlerde yapıldı.

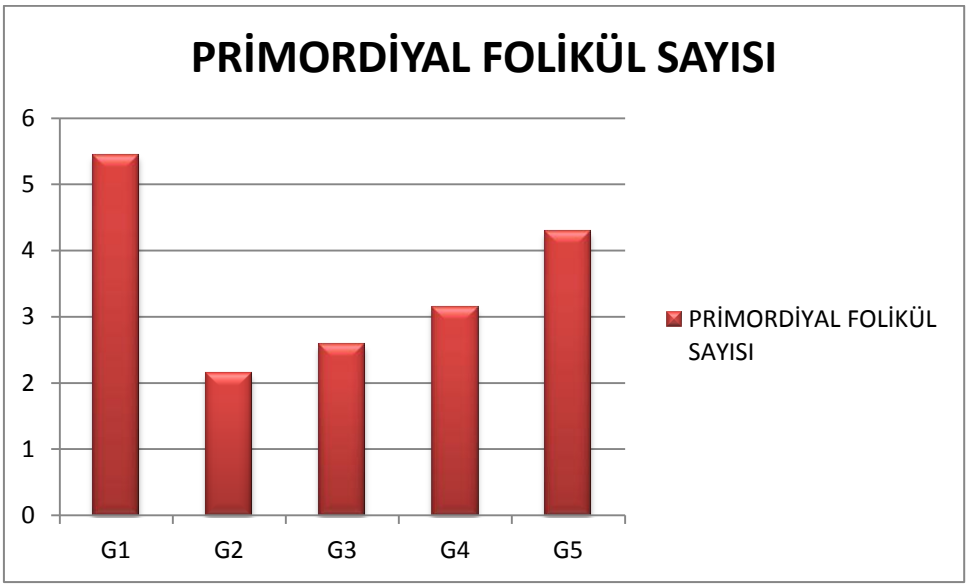
Deneklerin Total folikül sayılarına bakıldığında, Kontrol grubuyla (G1),T/D+MKH (G5) grubu Torsiyon (G2) , Torsiyon-Detorsiyon (G3) ve Kök hücre enjekte edilen (G4) grup arasında anlamlı derecede düşüş gözlenmiştir.

Tablo 5 : Gruplar arası folikül sayılarındaki istatistiksel farklar (p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.)

Grup Karşılaştırmalar	Değerler (p-value)	Sonuç
Grup 1 **Grup 2**	**0,021***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup1 **Grup 3**	**0,004***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup1 **Grup 4**	**0,004***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 1 **Grup 5**	0,140	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 2 **Grup 3**	0,608	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 2 **Grup 4**	0,573	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 2 **Grup 5**	0,349	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 3 **Grup 4**	0,938	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 3 **Grup 5**	0,121	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 4 **Grup 5**	0,110	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**



Şekil 18 : Gruplar arası folikül sayılarının ortalaması



Şekil 19 : Gruplar arası primordiyal folikül sayılarının ortalaması

4.3. Işık Mikroskobik Bulgular

4.3.1. Hematoksilen&Eozin Boyama Değerlendirmesi

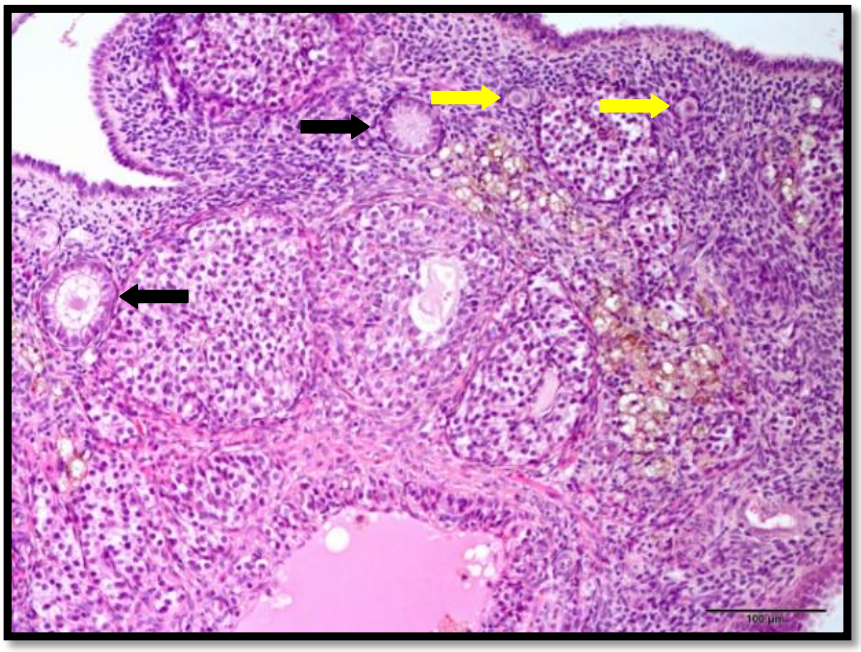
Kontrol grubunda ovaryum ince fibröz bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrelenmiştir. Dış kısmında germinal epitel kübik şekilli hücrelerden oluşmaktaydı. Germinal epitelin bazal membranı düzgün ve düzenli olarak gözlendi. Kapsülden parankima içine uzanan ince bağ dokusu bantları düzgün olarak izlendi. Kortekste ovaryum dokusu içerisinde primordial folliküller, çeşitli çaplarda primer, sekonder ve tersiyer foliküller ile birlikte farklı miktarda korpus luteum yer almaktaydı. Folliküllerde bulunan oosit ve ona ait zona pellusida düzenli ve normal görünümdeydi. Folliküllerin etrafında bulunan granüloza hücreleri poligonal, eozinofilik sitoplazmalı olup çekirdekleri kromatinden zengin ve yuvarlak biçimliydi. Vasküler yapılar normal bir görünüme sahipti. (Şekil 20,21,22)

Torsiyon grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, korteks bölgesinde atretik foliküller, medullar bölgede yoğun hemorajik alanlar ve yer yer hematomlar gözlenmiştir. Teka folikülü içerisinde özellikle epitelyum germinativuma yakın alanlarda lipid depozitleri gözlendi. Primordiyal folikül sayısının kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Şekil(23,24,25)

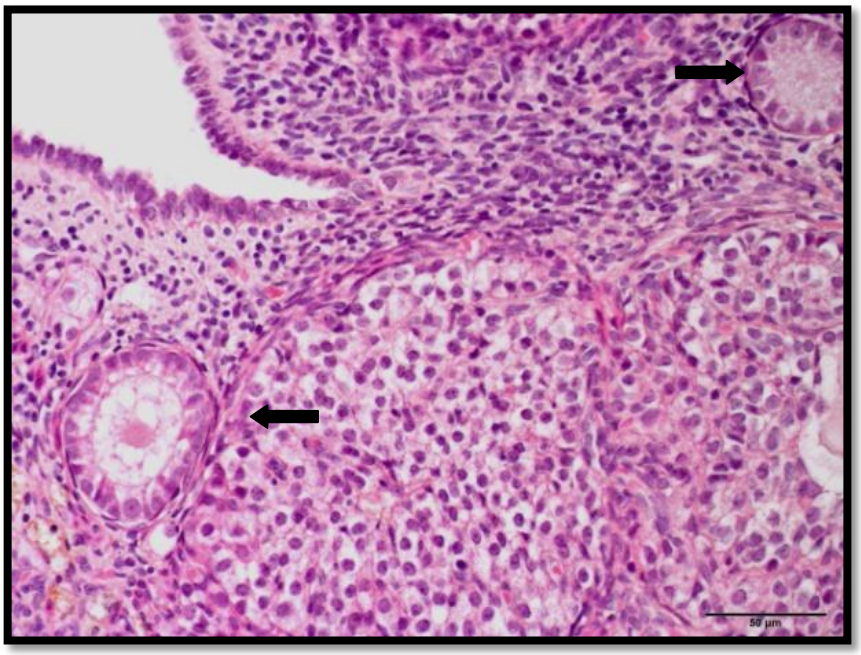
Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, epitelyum germinativumun altında konumlanan primordiyal folikül sayısında kontrol grubuna göre önemli derecede azalma olduğu tespit edilmiştir. Özellikle mediastinal alanda kontrol grubuna göre daha genişlemiş venöz damarlar gözlendi. Ayrıca foliküllerin granüloza hücrelerindeki dökülmelere bağlı olarak folikül içi hücre debrisleri gözlendi. (Şekil 26,27,28)

MKH grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde ovaryum dokusunun genel yapısını koruduğu gözlenmiştir. Epitelyum germinativumun düzenli yapıda olduğu, kortekts tabakasında değişik çaplarda primer ve sekonder foliküller gözlenmiştir. Epitelyum germinativumun altında düzenli yapıda primordiyal foliküller gözlenmiştir. (Şekil)

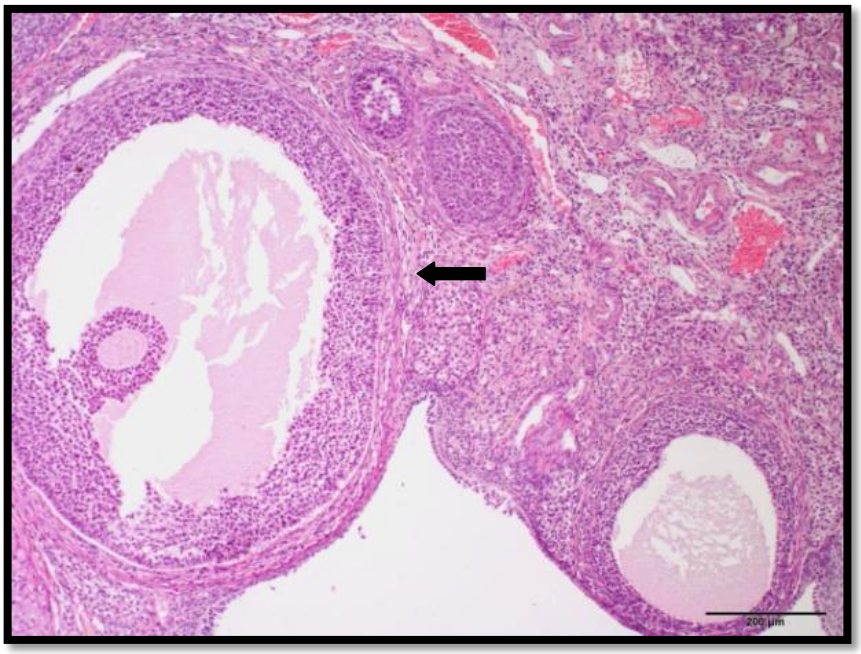
Torsiyon/Detorsiyon+MKH grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde ovaryumun korteks bölgesinde primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer folikül yapılarının düzenli olduğu gözlenmiştir.



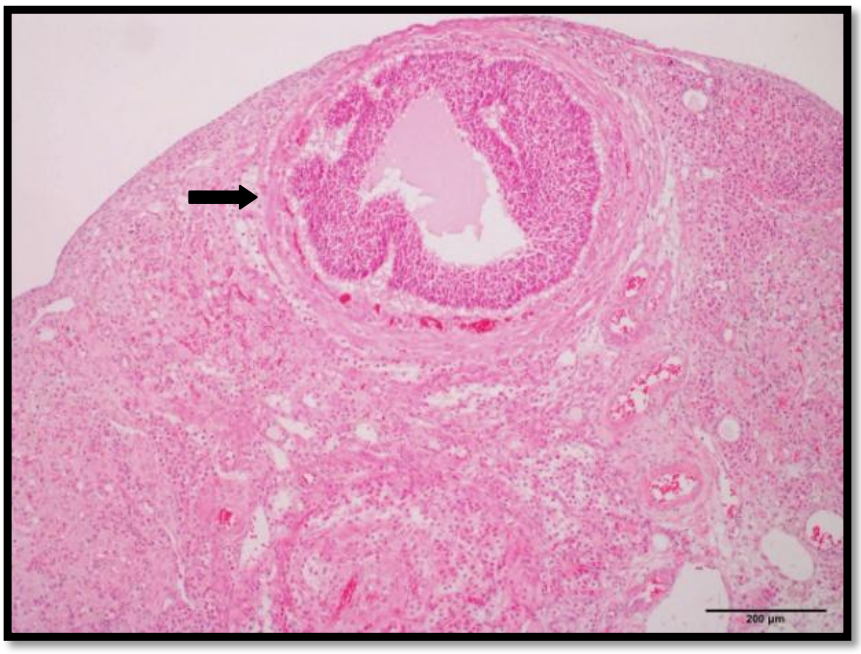
Şekil 20 : Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde normal morfolojide gözlenen primordiyal foliküller (→), primer foliküller (➡) ile gösterilmiştir. (H&E, X20)



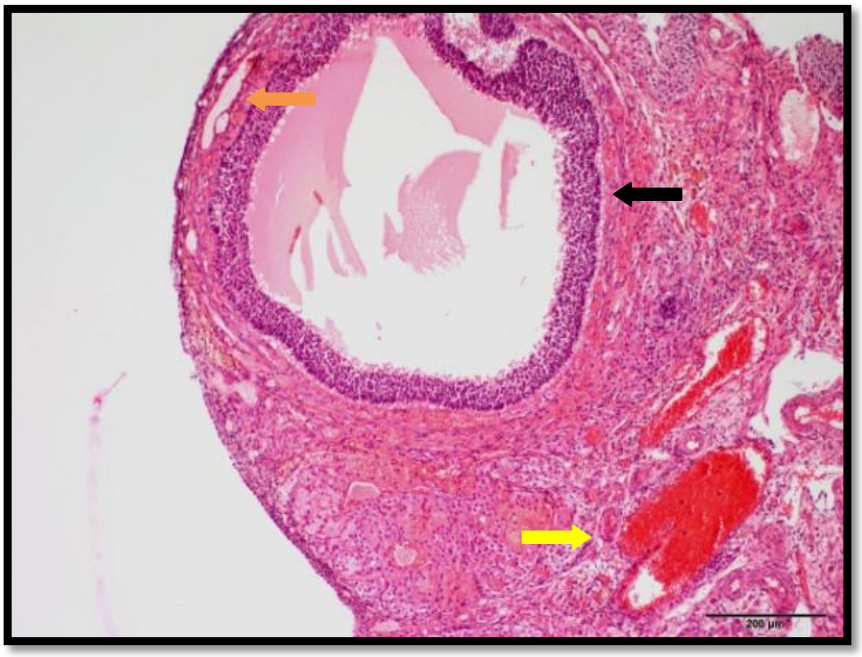
Şekil 21 : Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde normal morfolojide gözlenen primer foliküller (➡) ile gösterilmiştir.(H&E, X40)



Şekil 22 : Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde normal morfolojide gözlenen tersiyer folikül (⟵) ile gösterilmiştir.(H&E, X40)



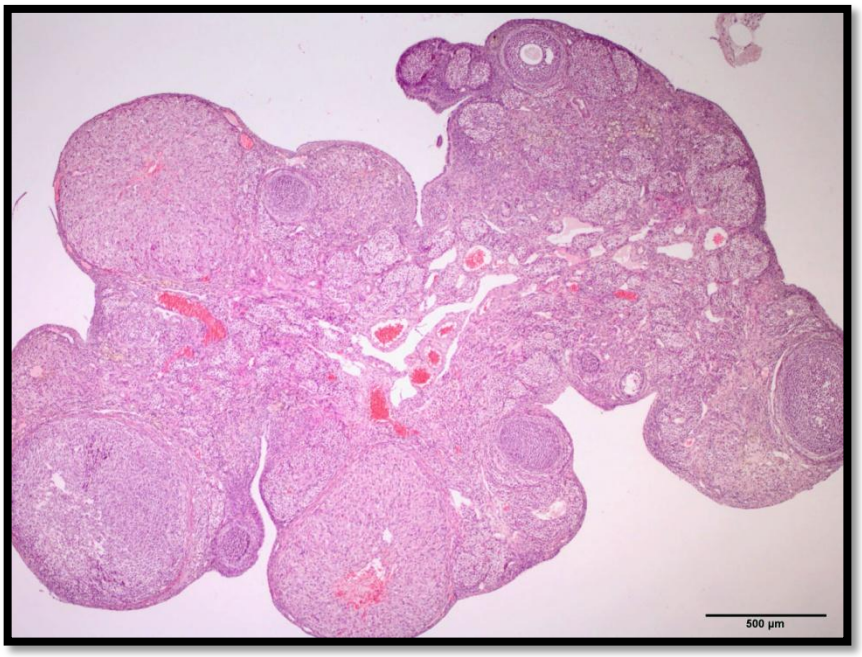
Şekil 23 : Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde gözlenen dejenere-atretik olmuş bir folikül (⟶) ile gösterilmiştir. (H&E, X10)



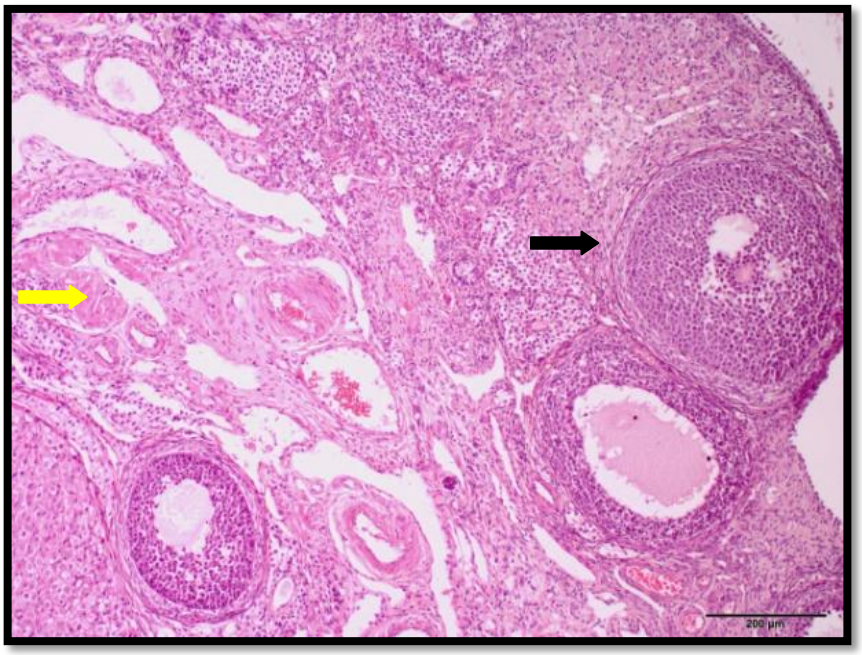
Şekil 24 : Torsiyon grubuna ait ovaryum kesitleri. Dejenere folikül (⬅), hemorajik alanlar (➡) , lipid depozitleri (⬅) ile gösterilmiştir. (H&E, X10)



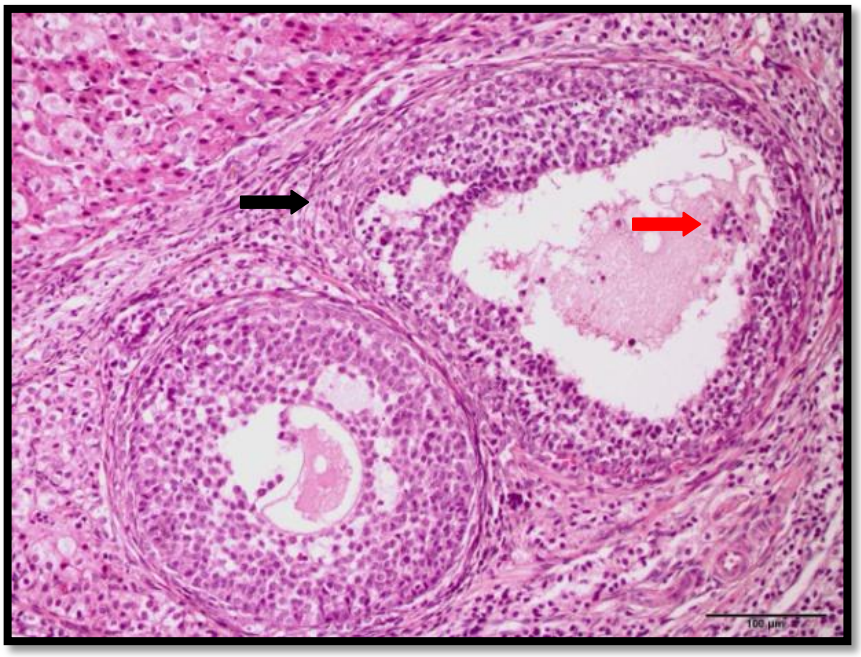
Şekil 25 : Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. Teka folikülü içerisinde epitelyum germinativuma yakın alanlardaki lipid depozitleri (⬅) ile gösterilmiştir. (H&E, X20)



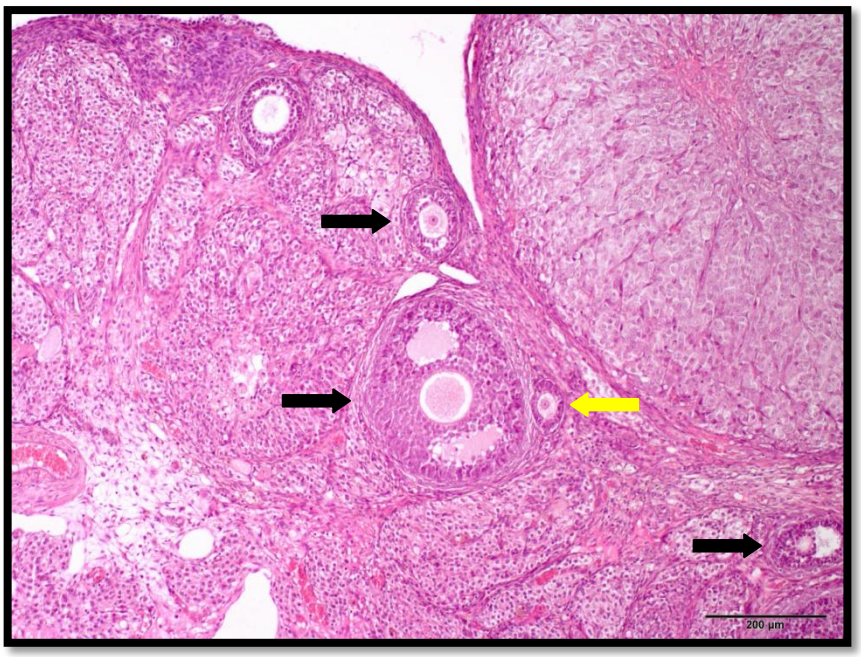
Şekil 26 : Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. (H&E, X4)



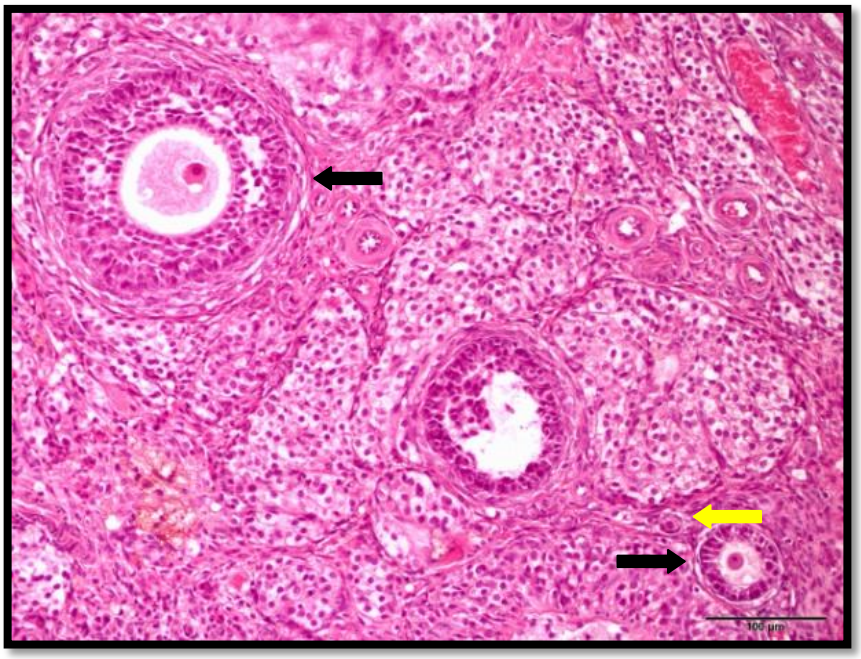
Şekil 27 : Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. Atretik folikül yapısı (➡), hemorojik alanlar (➡) ile gösterilmiştir.(H&E, X10)



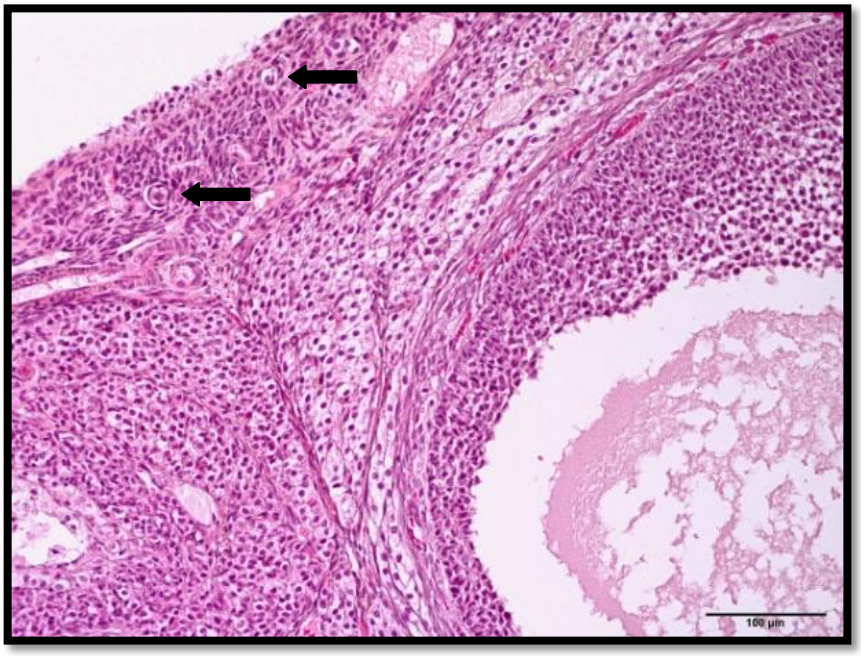
Şekil 28 : Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. Atretik folikül yapısı (➡) , folikül içi hücre debrisleri (➡) ile gösterilmiştir. (H&E, X20)



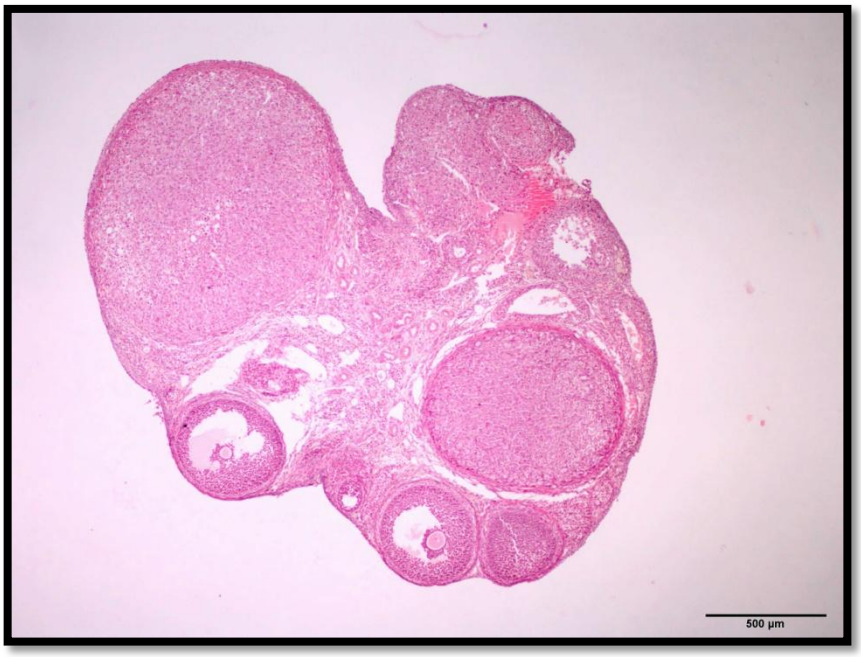
Şekil 29 : MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Ovaryumun korteks bölgesindeki sekonder foliküller (➡) , primer folikül ise (⬅) ile gösterilmiştir.(H&E, X10)



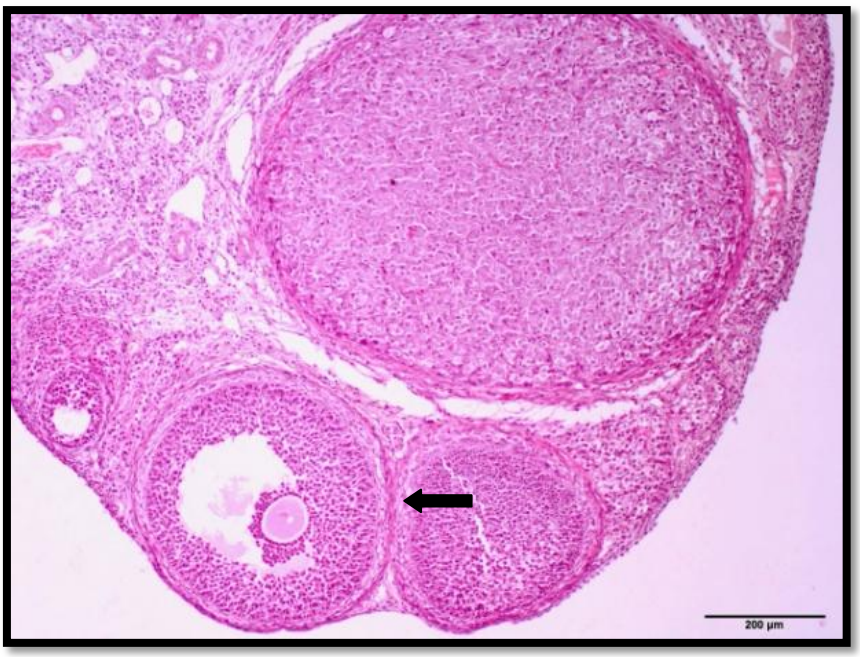
Şekil 30 : MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Ovaryumdaki primer foliküller (⟹) , primordiyal folikül ise (⟸) ile gösterilmiştir.(H&E, X20)



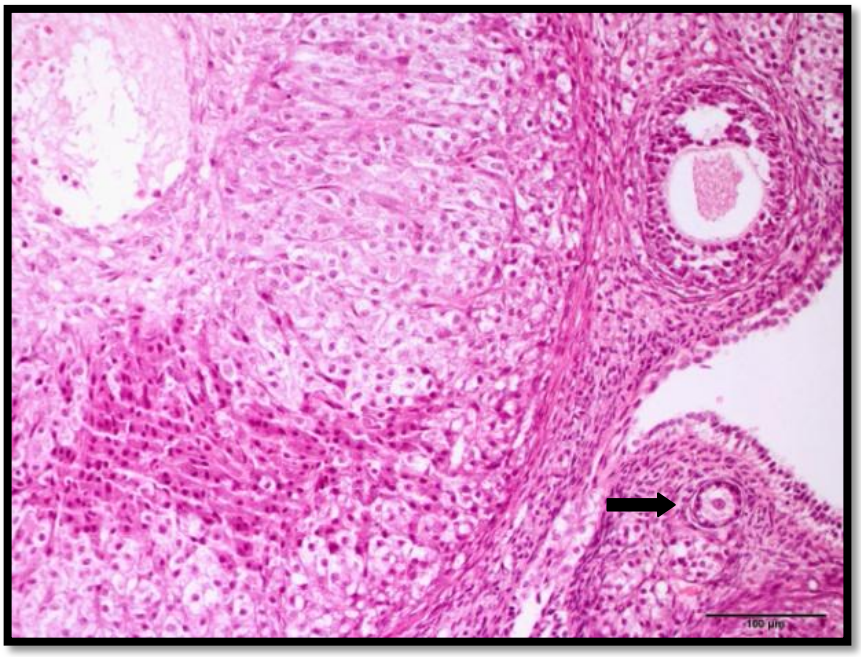
Şekil 31 : MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Ovaryumdaki primordiyal foliküller (⟸) ile gösterilmiştir.(H&E, X20)



Şekil 32 : T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Genel görünüm. (H&E, X4)

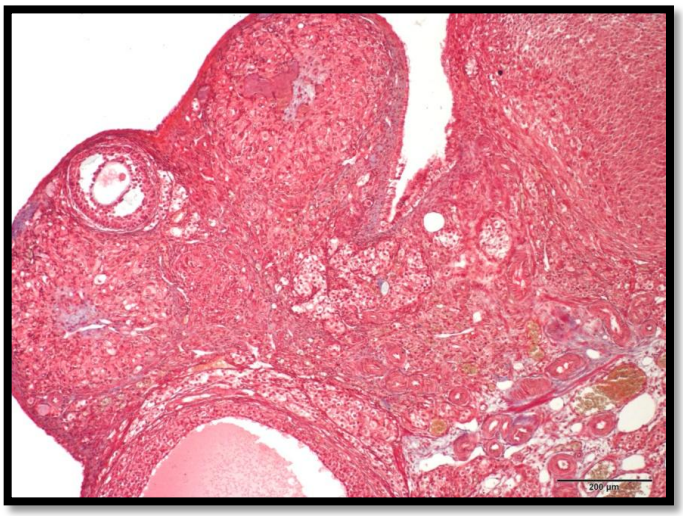


Şekil 33 : T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Ovaryum dokusunda bulunan tersiyer folikül (⟵) ile gösterilmiştir. (H&E, X10)

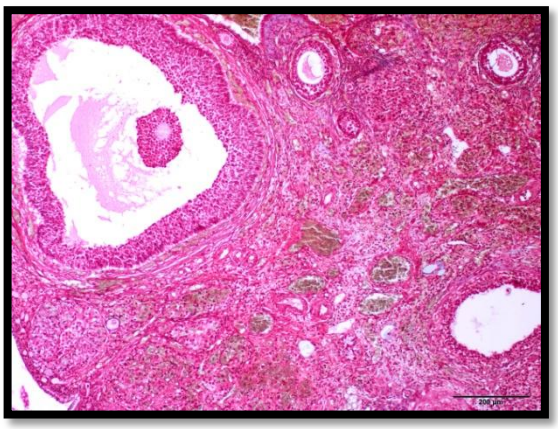


Şekil 34 : T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Ovaryum dokusunda bulunan primer folikül (➡) ile gösterilmiştir. (H&E, X20)

4.3.2. Masson Trikrom Boya Değerlendirmesi



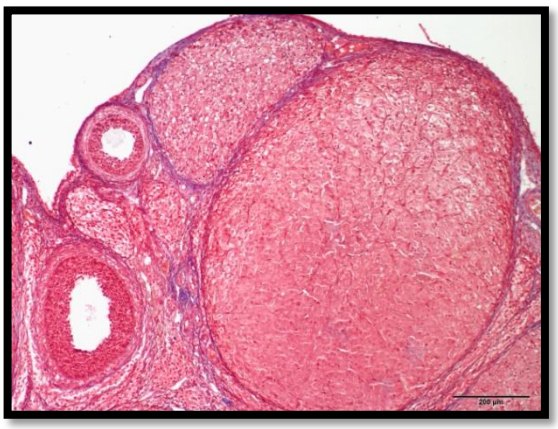
Şekil 35 : Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. (Masson Trikrom, X10)



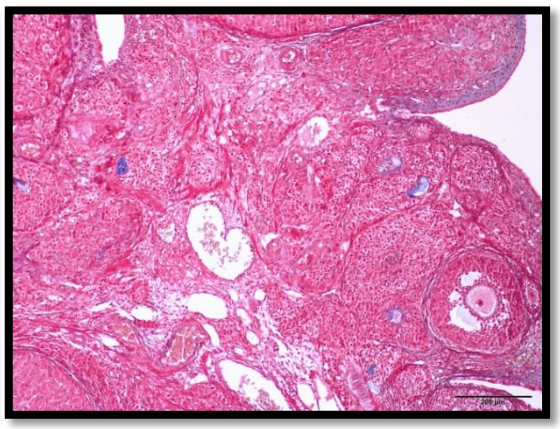
Şekil 36 : Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti.(X10)



Şekil 37: T/D grubuna ait ovaryum kesiti.(X10)



Şekil 38: MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(X10)



Şekil 39: T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti.(X10)

Masson Trikrom boyamasında gruplar arası farklılık gözlenmemiştir.

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

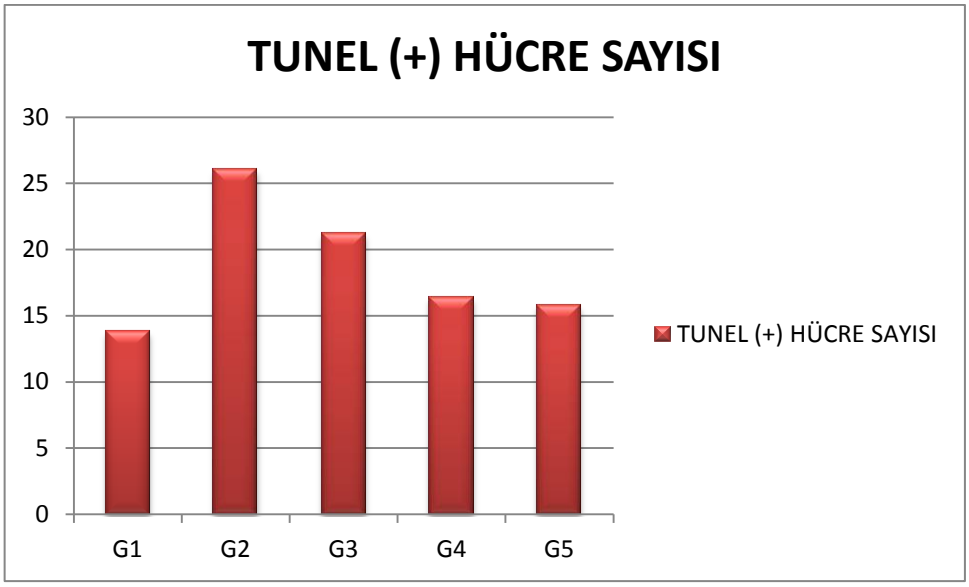
4.4.1. TUNEL Boyama Değerlendirmesi

Ovaryum kesitlerinde apoptotik hücreleri göstermek için TUNEL boyaması yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre TUNEL (+) hücre sayı ortalamaları; Kontrol grubunda 13,08±2,38 (4000 μm^2 alanda), Torsiyon grubunda 26±2,44 (4000 μm^2 alanda), Torsiyon-Detorsiyon grubunda 21,2±2,94 (4000 μm^2 alanda), MKH grubunda 16,4±1,67 (4000 μm^2 alanda) ve Torsiyon-Detorsiyon + MKH grubunda 15,28±2,28 (4000 μm^2 alanda) olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Torsiyon ve Torsiyon/Detorsiyon grubunda TUNEL (+) hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlendi (p=0,008). Torsiyon/Detorsiyon, MKH ve T/D+MKH grupları ile Torsiyon grubu karşılaştırıldığında, TUNEL (+) hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı saptandı (p=0,008, p=0,032). MKH ve T/D+MKH grupları ile T/D grubu karşılaştırıldığında TUNEL (+) hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı saptandı. (p=0,016, p=0.032). MKH grubu ile T/D+MKH grubu kıyaslandığında ise aralarında anlamlı bir fark olmadığı gözlendi. (p=0,0690) Gruplar arası farklılıklar olarak Mann-Whitney U Testi kullanılarak değerlendirildi. (Tablo 6).

Tablo 6 : TUNEL pozitif boyanan hücre verilerinin gruplar arası istatistiksel farklılıkları (p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.)

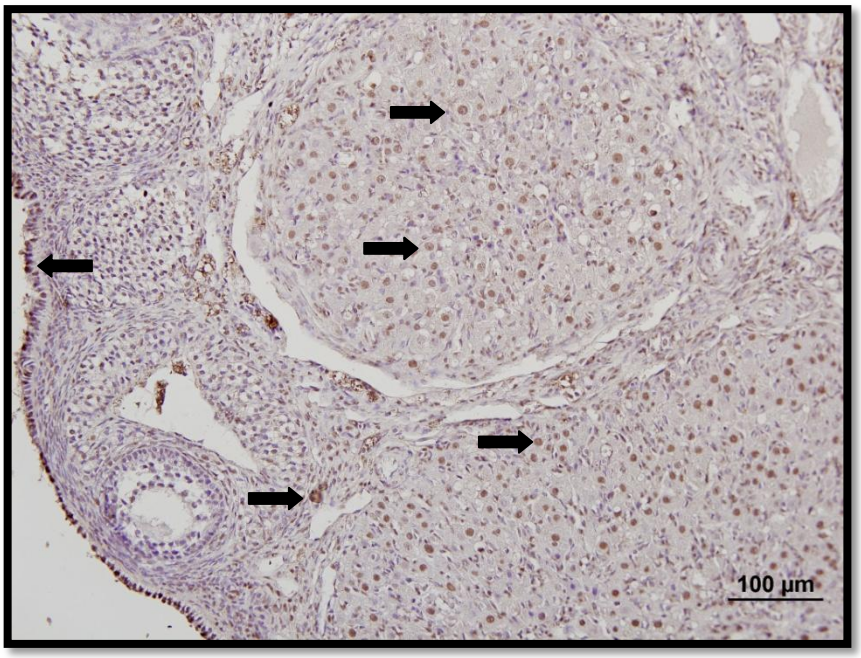
Grup Karşılaştırmalar	Değerler (p-value)	Sonuç
Grup 1 **Grup 2**	**0,008***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 1 **Grup 3**	**0,008***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 1 **Grup 4**	0,095	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 1 **Grup 5**	0,310	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 2 **Grup 3**	**0,032***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 2 **Grup 4**	**0,008***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 2 **Grup 5**	**0,008***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 3 **Grup 4**	**0,016***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 3 **Grup 5**	0,032	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır
Grup 4 **Grup 5**	**0,690***	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**



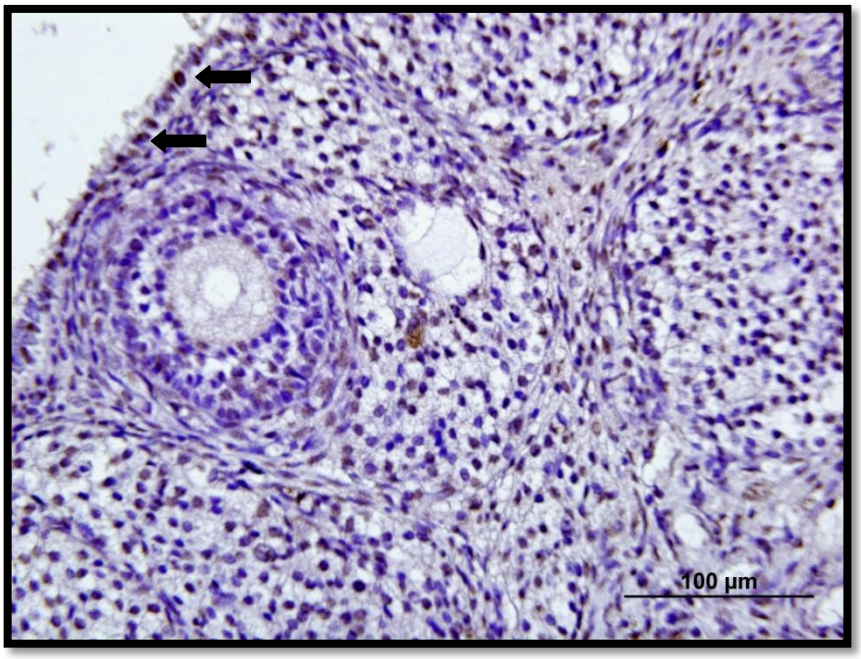
Şekil 40 : TUNEL pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması



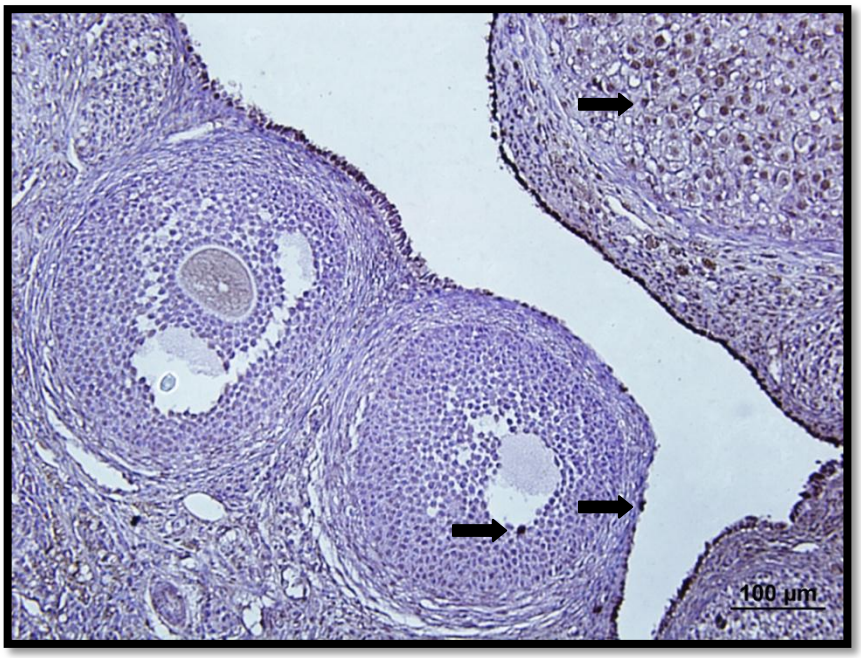
Şekil 41: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Tunel (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Tunel X20)



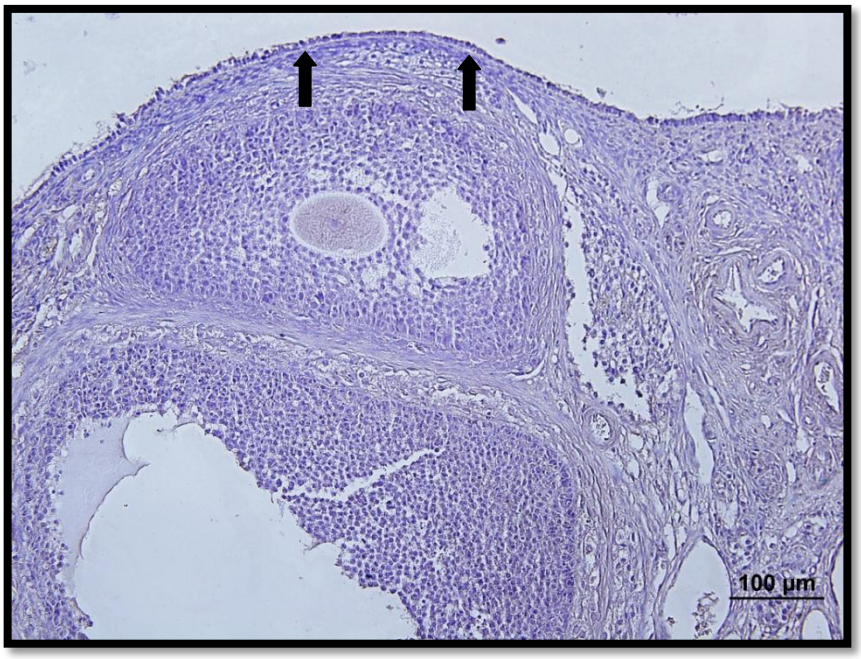
Şekil 42: Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. Tunel (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Tunel X20)



Şekil 43: Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. Tunel (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Tunel X20)



Şekil 44: MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Tunel (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Tunel X20)

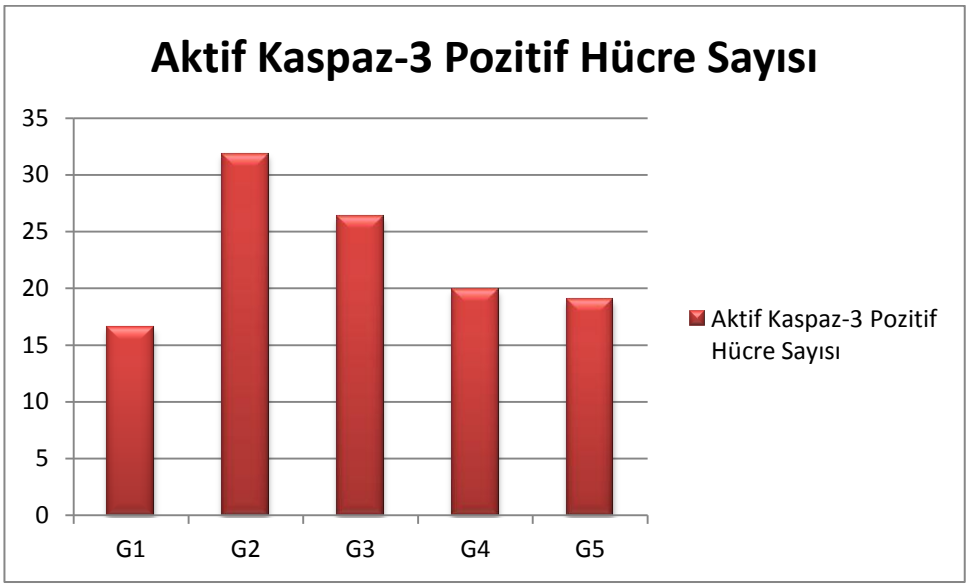


Şekil 45: T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Tunel (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Tunel X20)

4.4.2. Aktif Kaspaz-3 Değerlendirmesi

Apoptotik hücreleri göstermek için yapılan TUNEL boyamaya ek olarak yapılan Aktif Kaspaz 3 boyama sonuçlarına göre elde edilen Aktif Kaspaz 3 (+) hücre sayı ortalamaları; Kontrol grubunda 16,57±4,23 (4000 μm^2 alanda), Torsiyon grubunda 31,85±9,45 (4000 μm^2 alanda), Torsiyon-Detorsiyon grubunda 26,28±3,38 (4000 μm^2 alanda), MKH grubunda grubunda 19,85±2,03 (4000 μm^2 alanda) ve Torsiyon-Detorsiyon+MKH grubunda ise 19±1,63 (4000 μm^2 alanda) olarak bulundu.

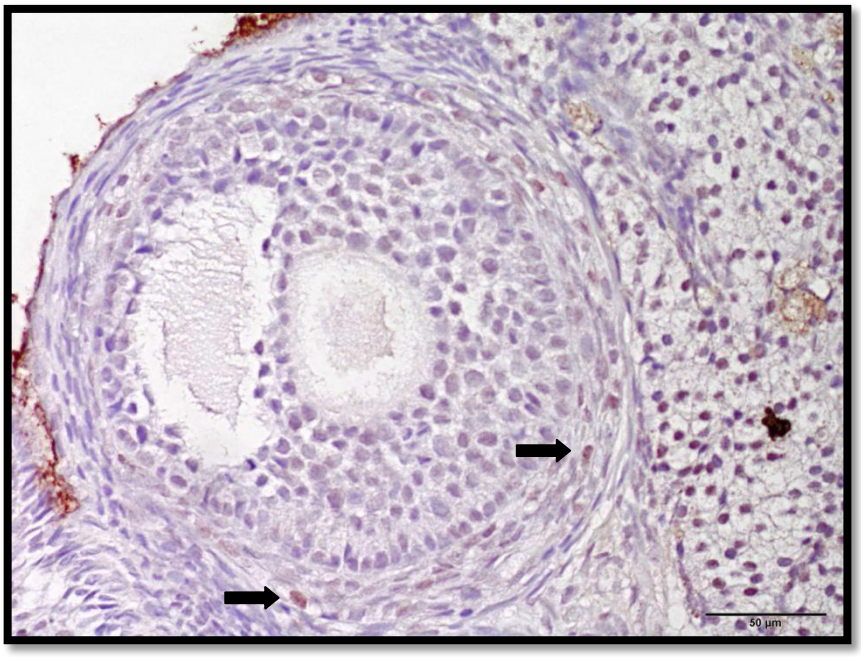
İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Torsiyon ve Torsiyon/Detorsiyon grubunda Aktif kaspaz-3 (+) hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlendi (p=0,002, p=0,004). Torsiyon/Detorsiyon, MKH ve T/D+MKH grupları ile Torsiyon grubu karşılaştırıldığında, Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı saptandı (p=0,008, p=0,032). MKH ve T/D+MKH grupları ile T/D grubu karşılaştırıldığında Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı saptandı. (p=0,016, p=0.032). MKH grubu ile T/D+MKH grubu kıyaslandığında ise aralarında anlamlı bir fark olmadığı gözlendi. (p=0,0690)Gruplar arası farklılıklar Mann-Whitney U Testi kullanılarak değerlendirildi. (Tablo 7)



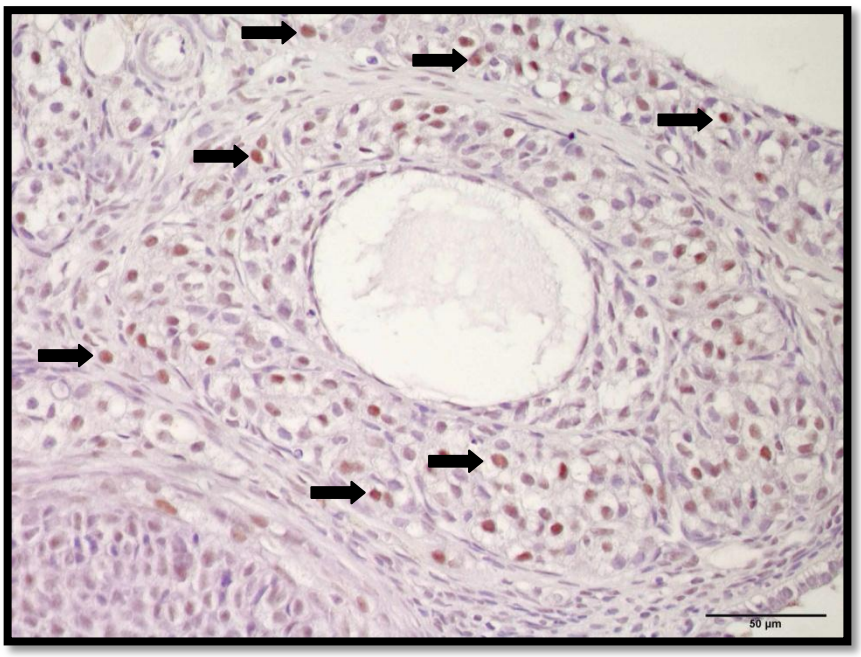
Şekil 46: Aktif Kaspaz-3 pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması

Tablo 7 : Aktif Kaspaz-3 pozitif boyanan hücre verilerinin gruplar arası istatistiksel farklılıkları (p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.)

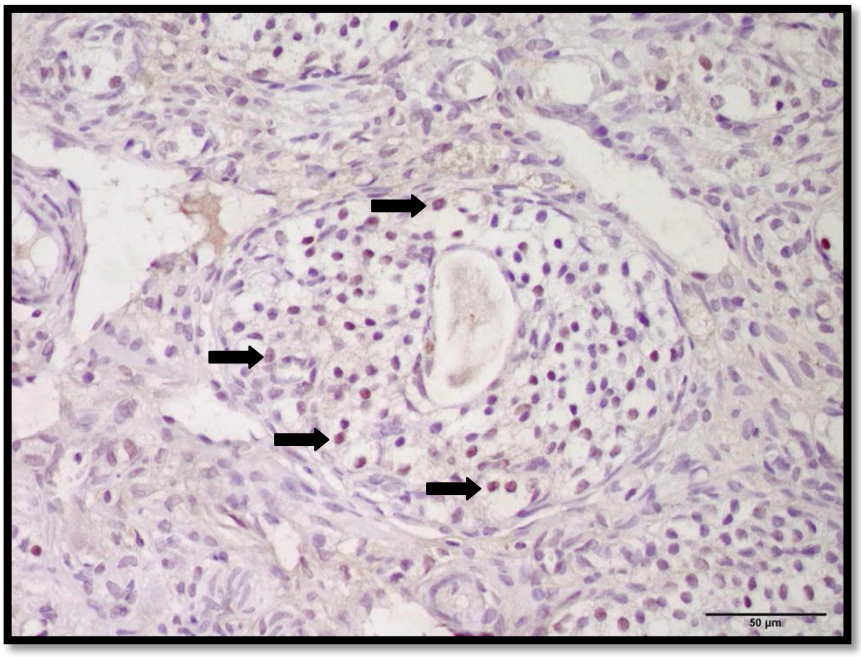
Grup Karşılaştırmalar	Değerler (p-value)	Sonuç
Grup 1 **Grup 2**	0,004*	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 1 **Grup 3**	0,017**	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 1 **Grup 4**	0,383	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 1 **Grup 5**	0,902	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 2 **Grup 3**	0,535	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**
Grup 2 **Grup 4**	0,001*	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 2 **Grup 5**	0,001*	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 3 **Grup 4**	0,004*	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.**
Grup 3 **Grup 5**	0,001*	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır
Grup 4 **Grup 5**	0,209	>0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.**



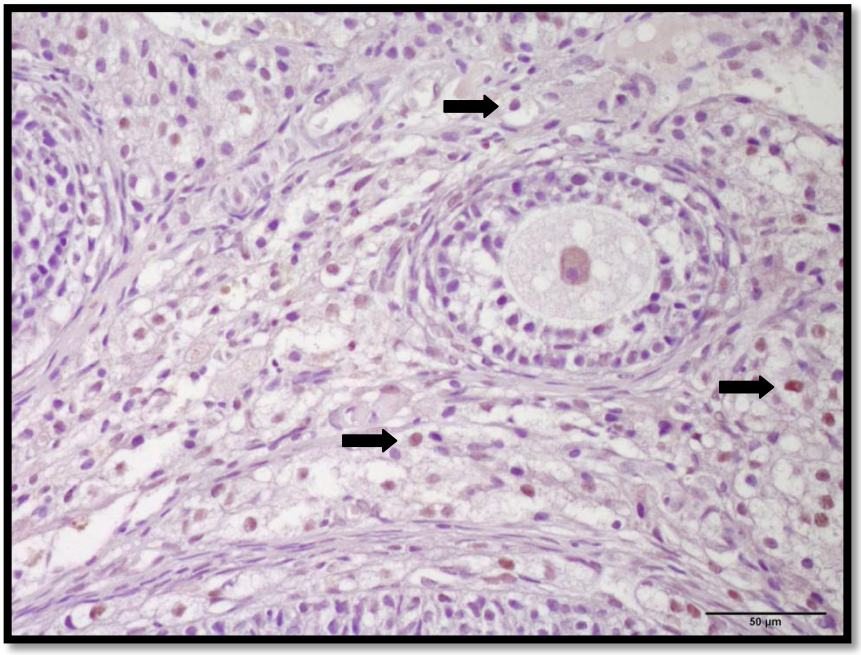
Şekil 47: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. **Aktif kaspaz-3 (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X40)**



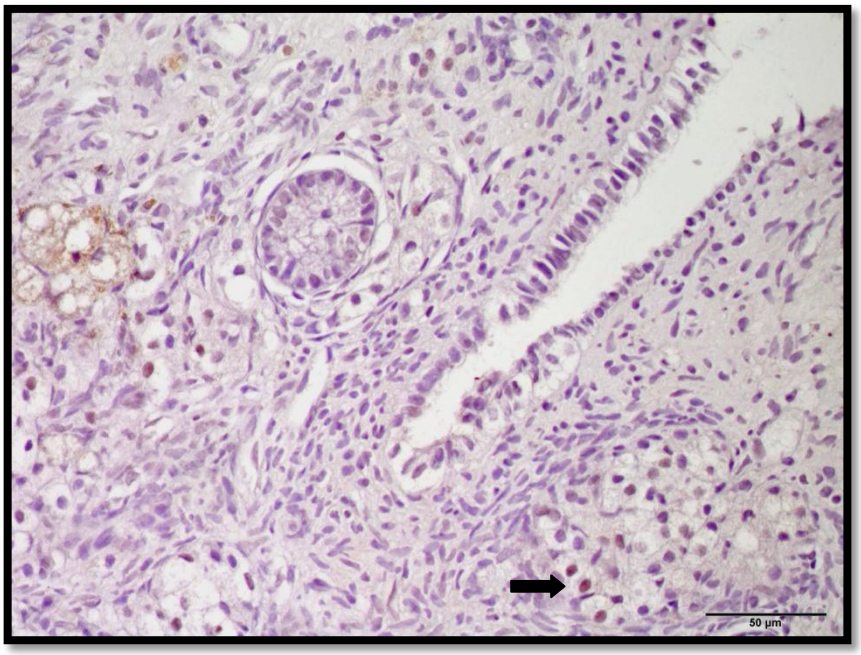
Şekil 48: Torsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X40)



Şekil 49: Torsiyon-Detorsiyon grubuna ait ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X40)



Şekil 50: MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X40)



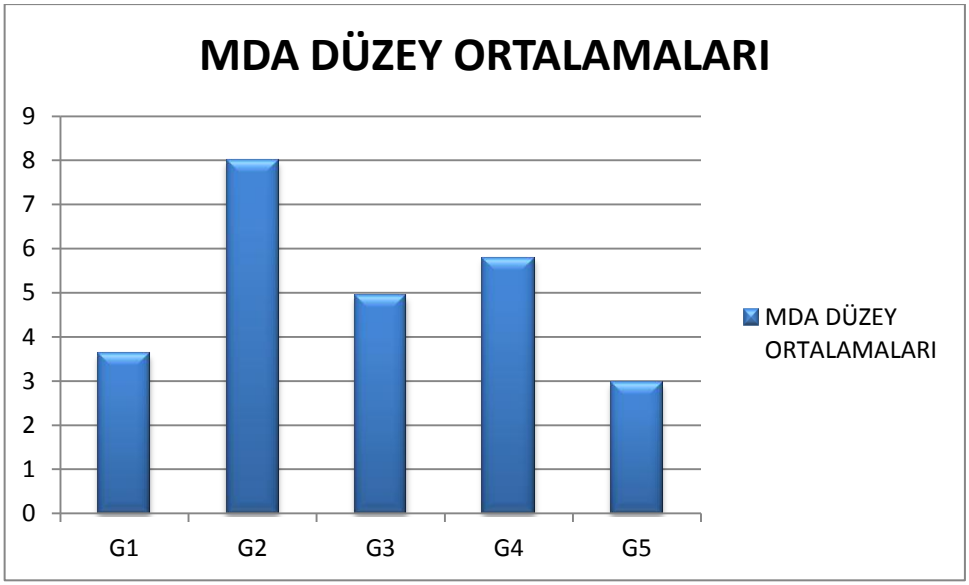
Şekil 51: T/D+MKH grubuna ait ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 (+) hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X40)

4.5. Biyokimyasal Değerlendirme

4.5.1. MDA Düzey Değerlendirmesi

Gruplar arasındaki hasarı belirlemek için serbest radikallerden olan MDA düzeyi ölçümleri de yapıldı. Gruplar arası ortalamalar; Kontrol grubu 3,632±1,1305 µM/g.doku, Torsiyon grubu 8,0046±2,0414 µM/g.doku, Torsiyon/Detorsiyon grubu 4,9413±2,5003 µM/g.doku , MKH grubu 5,7938±3,0262µM/g.doku, T/D+MKH grubunda ise 2,9571±2,5901 olarak bulundu.

Tüm gruplarda yapılan MDA düzeyi ölçümü sonucunda kontrol ve torsiyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlendi ($p<0,05$). Torsiyon grubu ile MKH grubu arasında anlamlı bir fark gözlendi. ($p<0,05$) Torsiyon grubu ile Torsiyon/Detorsiyon grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Değerlendirme kriteri olarak Mann-Whitney U Testi kullanıldı (Şekil 52).



Şekil 52: Gruplar arası MDA seviyesi farklılıkları

5. TARTIŞMA

Over torsiyonu acil müdahele gerektiren cerrahi bir patolojidir ve çocukluk çağındaki tüm akut karın olgularının %2.7sini oluşturur. Semptomların nonspesifik olmasından dolayı genellikle tanı ve tedavide gecikme olmaktadır. Gecikmiş vakalarda overlerde geri dönüşümsüz hasarlar oluşmaktadır. Bu da kadınlarda infertiliteye neden olmaktadır.

Torsiyonun, serbest radikal oluşumuna ve oksidasyona bağlı çeşitli doku hasarlarına neden olduğu çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (135).

Kök hücreler vücudumuzda bütün doku ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler sınırsız bölünebilme ve kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Kök hücreler, diğer vücut hücrelerimiz gibi özel bir işleve sahip olmadığı için gerekli koşullar sağlandığında istenilen hücre tipine dönüşebilmektedir.

Kök hücrelerin (KH) farklılaşması ve immün baskılayıcı potansiyelleri kadar hasarlı bölgeye yönelme ve yerleşme kapasiteleri vardır. MKH'ler, hasar gören dokulara dönüşebilme kapasiteleri yanında, sınırlı sayıda canlı kalmış hücrelerin fonksiyonlarını da düzenleyip, ömrünü uzatabilir, yeni damar oluşumunu sağlayarak dolaşımını düzenleyebilir, doku rejenerasyonuna katkıda bulunabilir ve hasarlı dokuda inflamasyonu baskılayarak skar dokusu oluşumunu engelleyebilirler.

Rejeneratif tıpta doku/organ onarımı, hücre tedavisi, biyomateryal (skaffold) teknolojisi veya biyomateryal ve kök hücrelerin birlikte kullanıldığı yollarla sağlanmaya çalışılır. Kök hücreler, otolog (alıcının kendi dokusu) veya allojenik (kendi türünden) olabilir ve sistemik (kan yoluyla) veya lokal (direkt dokuya) olarak uygulanabilirler (17, 21,95, 124).

Mezenkimal kök hücreler genetik ve metabolik hastalık için umut verici sonuçlar ortaya koymuş olup, bir doku kaybına neden olan over torsiyonu için henüz çalışılmamıştır.

Biz de çalışmamızda sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş over torsiyonunda mezenkimal kök hücre(MKH) uygulamasının doku onarımındaki katkısının ovaryum üzerindeki etkisini ışık mikroskobik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal teknikler kullanarak inceledik.

İskemi ve reperfüzyon sonucu dokuda meydana gelen hasar, bu hasarda serbest oksijen radikallerinin rolü ve antioksidanların bu hasarı gidermede etkileri konusunda son yıllarda çok sayıda araştırma yapılmıştır. İskemi süresi arttıkça doku hasarının büyüklüğü de artmaktadır. Dokulara göre farklılık göstermekle beraber iskeminin belirli bir süresine kadar doku, geri dönüşebilen doku hasarı fazına, iskemi süresi arttıkça doku geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girmektedir. Bu aşamadaki doku yeniden perfüzyon sağlansa bile doku hasarı geri dönmemektedir (135).

Osmanağaoğlu ve arkadaşları ile Kart ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada over torsiyon süresi 2 saat olarak belirlenmiş ve deney sonucunda 2 saatlik iskemi durumunun overlerde hasar oluşturduğu gözlenmiştir (136, 137). Biz de mortalitenin yüksek olmadığı 2 saatlik torsiyon modelini deneyimiz için uygun gördük ve deney sonunda overlerde hasarı histolojik olarak gözlemledik.

Sürmen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ovaryum hacim oranları açısından, torsiyon grubunun hacminin kontrol grubuna göre arttığı gözlemlemişlerdir (138). Bizde çalışmamızda bu sonuca paralel olarak ovaryum hacim oranlarında torsiyon grubunun kontrol grubuna göre arttığını gözlemledik. Bu hacim artışının sebebi torsiyon grubunda iskemiye bağlı hemositaz ve hemorajinin artmış olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Torsiyon-detorsiyon grubunda hacim oranının kontrol ve torsiyon grubuna göre artmış olması beklenirken, yaptığımız çalışmada torsiyon-detorsiyon grubunda hacim oranları açısından kontrol ve torsiyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bunun nedeni olarak detorsiyon süresinin uzun olması ve buna bağlı olarak dokunun spontan iyileşmesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Graff follikülünde hücre ölümü ilk olarak tavşan overlerinde tanımlamıştır. İnsanlarda fetal hayatta primordial folliküller oluşurken doğum öncesi bunların üçte ikisi kontrollü hücre ölümü olan apoptotik hücre ölümü ile yok olmaktadır. Apoptozisin günümüzde artık oogeneziste, folikülogeneziste, oosit kaybı ve oosit seçiminde ve atrezide rol aldığı bilinmektedir. Folliküler hücrelerdeki yaşamsal ve apoptotik moleküller bir denge içinde bulunmaktadırlar ve hücrenin akıbetini belirlemektedirler (139).

Özbal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2 saatlik testis torsiyon modelinde TUNEL pozitif ve aktif kazpaz-3 pozitif hücrelerin torsiyon ve torsiyon detorsiyon grubunun kontrol grubuna göre arttığını gözlemlemişler (134). Biz de yaptığımız çalışmada bu sonuca paralel bulgular elde ettik. Gruplardan elde edilen verilerin sonuçlarına göre, torsiyon grubu ve torsiyon-detorsiyon grubunun birim alandaki apoptotik hücre sayısında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemledik. Kontrol grubu ile MKH ve T/D+MKH grubu arasında TUNEL (+) ve aktif kaspaz-3 (+) hücre sayısı değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Ovaryumlarda oosit havuzunu belirlemek için primordiyal foliküllerin sayımı yapıldı. Elde edilen verilerin sonuçlarına göre torsiyon grubunun ve torsiyon/detorsiyon grubunun kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptandı

Yaptığımız çalışmada gruplar arası ovaryumlar histolojik olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunda ovaryum morfolojisinin normal bir görünümde olduğu, gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin sağlam göründüğü tespit edildi.

Kaku ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada steroidojenik akut düzenleyici bir protein olan StAR'ın eksikliğinin ovaryum histolojisi üzerine etkisine baktıklarında ovaryum korteksinde teka ve stroma hücrelerinde lipit depozitleri gözlemlemişlerdir (140). Biz de çalışmamızda teka folikülü içerisinde lipid depozitlerini içeren hücre kümelerini gözledik. ayrıca bizim çalışmızda ilaveten Torsiyon grubunda teka ve granüloza hücreleri sınırında ayrılmalar gözlendi.

Çalışmamızda MDA seviyeleri torsiyon grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu bulgular daha önceki çalışmalar ile benzerdi ayrıca T/D+MKH grubu kontrol grubuna (70), MKH grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında kont grubuna benzer mda seviyesi beklerken anlamlı bir artış olduğu gözlemledik.

6. SONUÇ

Ovaryum torsiyonu özellikle çocukluk çağında görülen bir problem olması nedeniyle önlerinde uzun bir yaşam olan bu çocuklar için çok önemlidir. Kök hücre tedavilerinin önem kazandığı son yıllarda yapılan bu çalışmaların sayısı giderek artmaktadır.

Bizim çalışmamızın bulguları, kök hücre enjeksiyonunun ovaryum fonksiyonel yapısının korunması için umut verici sonuçlar ortaya koymuştur. Çalışmamızla elde edilen deneyimler, gelecek vaad eden pek çok araştırmaya olanak sağlayabilir. Ancak çalışmamızın ileriki dönemlerde daha detaylı ve geniş kapsamlı safhaları gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Maral i, Sözen U, Balık E, Miral H, and et al. Torsiyone över tümörleri. Anatolian J Gynecol Obstet 1994; I: 36-40 .
2. Koonings PP, Davvid AG. Adnekxial torsion in postmenapausai women. Obstet Gynecol 1989; 73: 11-2 .
3. Hibbard, L. T. Adnexal torsio. Am J Obstet Gynecol 1985; 152: 456-461 .
4. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. Br J Cancer Suppl 1987; 8: 66-73 .
5. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. Am J Med Sci 1994; 307: 284-292 .
6. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concept. Arch Biochem Biophys 1986 ;246: 501-514 .
7. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury . N Engl J Med 1985; 312: 159-163 .
8. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant . Annu Rev Pharmacol Toxicol 1983; 23: 239-257 .
9. Bayer AI, Wiskind AK. Adnexal torsion: can the adnexa be saved?. Am J Obstet Gynecol 1994.171: 1506-1510; discussion 1510-1501 .
10. Taş, A. Fare Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü, Farklılaşması ve Karakterizasyonu Kök Hücre Teknolojisi. Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bilim Uzmanlığı (Yüksek Lisans Tezi), 2005 .
11. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells 2001; 19 (3):180-92 .
12. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991;9(5):641-650 .
13. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci U S A 2000. 28; 97(7):3213-8 .
14. Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR and et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 2001; 98:2396-2402 .
15. Dawn M, Paolo DC, Georg BJr, Atala A . Amniotic fluid and placental stem cells," Methods in Enzymology 2006 ; Vol. 419, pp. 426-438 .

16. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 200;36:568-584 .

17. Hipp J, and Atala A. Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine. Stem Cell Reviews and Reports 2008; Vol. 4(1): 3-11 .

18. Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E and et al .Immunologic Properties of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells. Am J Obstet Gynecol 2004; 190(1):239-45 .

19. Kaviani A, Guleserian K, Perry TE, Jennings RW, and et al . Fetal tissue engineering from amniotic fluid. J Am Coll Surg 2003 Apr; 196(4):592-7 .

20. Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A, Jennings RW, et al . The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. Journal of Pediatric Surgery 2001 ; Vol 36, No 11, pp 1662-1665 .

21. Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak DJ. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. J Cell Mol Med 2007 Sep-Oct;11(5):935-44 .

22. Sessarego N, Parodi A, Podestà M, Benvenuto F, and et al . Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. Haematologica 2008 March 1; vol. 93 no. 3 339-346 .

23. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, and et al . Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006. Feb; 24(2):315-21 .

24. Pangas SA, Matzuk MM. Genetic models for transforming growth factor betasuperfamily signaling in ovarian follicle development. Mol Cell Endocrinol 2004; 225:83-91 .

25. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. Endocrinology 1991;129, 2799–2801 .

26. Otala M, Erkkila K, Tuuri T, Sjoberg J, and et al . Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. Mol Hum Reprod 2002; 8: 228-236 .

27. Hsu SY, Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. Physiol Rev. 2000;80:593-614 .

28. Robles R, Tao XJ, Trbovich AM, Maravel DV, and et al. Localization, regulation and possible consequences of apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1) expression in granulosa cells of the Mouse ovary. Endocrinology. 1999;140:2641-2644 .

29. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1.Cilt. Ankara, Güneş Kitabevi Lmt, 2001; S:337- 345 .

30. Sadler T W. Medikal Embriyoloji (Türkçe Çeviri) 7. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık ,1996; S:328-340 .

31. Moore KL, Persaud T V N. İnsan Embriyolojisi (Türkçe Çeviri) 6. Baskı.İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002; S:325-345

32. Strandring S. Gray's Anatomy. Churchill Livingstone ,2004 ;S:1321-1326 .

33. Gardner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Saunders 2001; S:461-72.

34. Ross M H, Kaye G I, Pawlina W. Histology a Text and Atlas. Lippincott Williams&Wilkins 2003; S:830-837 .

35. Erdoğan D, Hatipoğlu M T, Görgün M, Ilgaz C. Özel Histoloji. Hatipoğlu 2007;S:175-181.

36. Junqueıra, Carneıro J. Temel Histoloji (Türkçe Çeviri). Nobel 2006 ;S:449-458 .

37. Kierszenbaum A L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Türkçe Çeviri). Palme Yayıncılık 2006; S:565-576 .

38. Guyton A C, Hall J E. Text Book of Medical Physiology, İnternational Edition. W.B. Saunders 2006; S: 906-1026.

39. Ganong W F. Tıbbi Fizyoloji . , 20.baskı .Nobel Tıp Kitabevleri 2002 S:419-433 .

40. Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, and et al. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. Endocrinology 2002;143(12):4775-87 .

41. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, and et al. Ovarian Follicle Macrophages: Is Folllicular Atresia in the Immature Rat a Macrophage-Mediated Event? Biol Reprod 1998; 58: 52-9 .

42. McGee EA. , Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 2000; 21(2): 200-14 .

43. Allen E. The oestrous cycle in the Mouse. Amer J Anat 1922; 30: 297-371

44. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, aand et al. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J Mice: I. Cycle frequency, Length and vaginal cytology. Biol Reprod 1982; 27:327-39 .

45. Safranski TJ, Lamberson WR, Keisler DH. Correlations among three measures of puberty in mice and relationships with estradiol concentration and ovulation. Biol Reprod 1993; 48:669-73 .

46. Snell GD. Reproduction. In: Snell GD(Ed)Biology of Mouse. Second edition. USA. Dover Publications; 1956: 55-89 .

47. Petroianu A, Vasconcellos LS, Alberti LR, Nunes MB. The influence of venous drainage on autologous ovarian transplantation. J Surg Res 2005; 124:175-9 .

48. Champlin AK., Dorr DL, Gates AH. Determining the stage of the estrous cycle in the Mouse by the appearance of the vagina. Biol Reprod 1973; 8:491-4 .

49. Rao RP, Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. Ind Health 2002; 40:237-44 .

50. Campbell CS, Ryan KD, Schwartz NB. Estrous cycles in the Mouse: relative influence of continuous light and the precence of male. Biol. Reprod 1976; 14: 292-9 .

51. Spornitz UM., Socin CD. , Dravid AA. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. Anat Rec 1999; 254:116- 26 .

52. Mandl AM. Cyclical changes in the vaginal smear of adult ovariectomized rats. J Exper Biol 1951; 28:585-92 .

53. Stock, RJ. Clinicopathologic changes resulting from adnexal torsion . J Reprod Med 1987 ; 32: 201-207 .

54. Zweizig S, Perron J, Grubb D, Mishell DR Jr . Conservative management of adnexal torsion. Am J Obstet Gynecol 1993; 168: 1791-1795 .

55. Mage G, Canis M, Manhes H, Pouly JL and et al. Laparoscopic management of adnexal torsion. A review of 35 cases , J Reprod Med 989; 34: 520-524 .

56. Oelsner G, Bider D, Goldenberg M, Admon D and et al. Long-term follow-up of the twisted ischemic adnexa managed by detorsion . Fertil Steril1993; 60: 976-979 .

57. Wagaman R, and Williams RS. Conservative therapy for adnexal torsion. A case report. J Reprod Med 1990; 35: 833-834 .

58. Yazici G, Erdem O, Cimen B, Arslan M, and et al. Genistein attenuates postischemic ovarian injury in a rat adnexal torsion-detorsion model . Fertil Steril2007; 87: 391-396.

59. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc 1988; 63: 381-389 .

60. Halliwell B,Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol1990 ; 186: 1-85 .

61. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 2001;31: 1287-1312 .

62. Lee CI, Liu X, Zweier JL . Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. J Biol Chem2000 ; 275: 9369-9376 .

63. Chung, Baek BS, Song SH, Kim MS. Xanthine dehydrogenase xanthine oxidase and oxidative stress. Age 1997; 20: 127-140 .

64. Battelli MG, Abbondanza A, Stirpe F. Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes - conversion from D to O form and leakage from cells. Chem Biol Interact 1992; 83: 73-84 .

65. Parks D, Skinner KA, Skinner HB, sidhartha T. Multiple organ dysfunction syndrome: role of xanthine oxidase and nitric oxide. Pathophysiology1998; 5: 49-66 .

66. Vina J, Estrela JM, Guerri C, Romero FJ. Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes Biochem J 1980; 188: 549-552 .

67. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Colell A, García-Ruiz C. Oxidative stress and alcoholic liver disease, Alcohol Health Res World1997; 21: 321-324 .

68. Hascalik S, Celik O, Turkoz Y, Hascalik M, and et al. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects from ischemia-reperfusion damage of the ovaries. Gynecol Obstet Invest 2004; 57: 218-223 .

69. Turkoz Y, Celik O, Hascalik S, Cigremis Y,and et al . Melatonin reduces torsion-detorsion injury in rat ovary:biochemical and histopathologic evaluation. J Pineal Res 2004 ; 37: 137-141 .

70. Celik O, Turkoz Y, Hascalik S, Hascalik M, and et al. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemiareperfusion injury in rat ovary, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; 117: 183-188 .

71. Uguralp S, Mizrak B, Bay Karabulut A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. Eur J Pediatr Surg2005; 15: 114-119

72. Machlin LJ, Bendich A. Free-Radical Tissue-Damage - Protective Role of Antioxidant Nutrients . Faseb Journal 1987;1: 441-445 .

73. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. Biochem J 1984; 222: 1-15 .

74. Usta U, Inan M, Erbas H, Aydogdu N, and et al. Tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: effects of L-carnitine and N-acetyl cysteine .Pediatr Surg Int 2008; 24: 567-573 .

75. Rhoden EL, Lucas ML, Pereira-Lima L, Rhoden CR, and et al. Effects of L-arginine on the kidney levels of malondialdehyde in rats submitted to renal ischaemia-reperfusion. BJU Int 2001; 88: 273-277 .

76. Yurtcu M, Abasiyanik A, Avunduk MC, Muhtaroğlu S. Effects of melatonin on spermatogenesis and testicular ischemiareperfusion injury after unilateral testicular torsion-detorsion. J Pediatr Surg2008; 43: 1873- 1878 .

77. Pompella A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation, Int J Vitam Nutr Res 1997; 67: 289-297 .

78. Somuncu S, Cakmak M, Dikmen G, Akman H, and et al . Ischemia-reperfusion injury of rabbit ovary and protective effect of trapidil: an experimental study . Pediatr Surg Int 2008; 24: 315-318 .

79. Ozerol E, Bilgic S, Iraz M, Cigli A, and et al . The protective effect of erdosteine on short-term global brain ischemia/reperfusion injury in rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry; 2008 1;33(1):20-4 .

80. Fuchs E, Chen T**.**A matter of life and death: self-renewal in stem cells. EMBO Rep. 2013 Jan;14(1):39-48.

81. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. Vet Surg. 2005 Sep-Oct;34(5):415-23 .

82. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005; Vol.100, No.1, 12-27 .

83. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. Science 2000; 287:1442-1446 .

84. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, and et al . Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 2821145-1147 .

85. Fauza DO. Amniotic fluid and placental stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2004 Dec;18(6):877-91 .

86. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, and et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. Stem Cells. 2005 Nov-Dec;23(10): 1549-59.

87. Gilbert DM. The future of human embryonic stem cell research: addressing ethical conflict with responsible scientific research. Med Sci Monit. 2004. May;10(5):RA99-103 .

88. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. J Postgrad Med. 2007 Apr-Jun;53(2):121-7 .

89. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Trend Mol Med 1976; 4:267-274 .

90. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells:their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.Stem Cells. 2007 Nov;25(11):2739-49 .

91. Minguell JJ, Erices A, Conget P.Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med (Maywood).2011 Jun;226(6):507-20 .

92. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. Folia Histochem Cytobiol. 2006; 44(4):215-30 .

93. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, and et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143-147 .

94. Vaananen K. Mesenchymal stem cells. Annals of Medicine 2005; 37: 469-479 .

95. Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. Injury. 2005 Nov;36 Suppl 3:S8-S12 .

96. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum. Reprod. (2004) 19, 1450-1457 .

97. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, and et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. Cell Res. 2006 Apr;16(4):329-36 .

98. Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, and et al. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. Am J Obstet Gynecol 2004; 190:239-245 .

99. Kim J, Lee Y Kim H, Hwang KJ, and et al . Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. Cell Prolif. 2007,40, 75-90 .

100. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, and et al . Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. Am J Obstet Gynecol. 2006 Mar;194(3):664-73 .

101. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Apr;36(4):568-84 .

102. Zhang Y, Li CD, Jiang XX, Li HL, and et al . Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow. Chin Med J (Engl). 2004 Jun;117(6):882-7 .

103. In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, and et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. Haematologica. 2003 Aug;88(8):845-52 .

104. Hu Y Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, and et al . Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. Journal of Laboratory and Clinical Medicine.2003 :141: Issue 5, 342-349 .

105. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 2003;21:105e10 .

106. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, and et al . Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells. 2007 Feb;25(2):319-31.

107. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, and et al . Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood. 2003 Aug 15;102(4):1548-9 .

108. Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Freilinger A, and et al . Human amniotic fluid stem cells: a new perspective Amino Acids (2007) Aug 21 35(2):291-3.

109. Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Valli A, and et al . Stem cells in amniotic fluid as new tools to study human genetic diseases. Stem Cell Rev. 2007 Dec;3(4):256-64.

110. Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, Cheng FC, and et al . Clonal amniotic fluid-derived stem cells Express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. Biol. Reprod. (2006) ;74: 545-551 .

111. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, and et al . Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol. 2007 Jan;25(1): 100-6.

112. Kunisaki SM, Armant M, Kao GS, Stevenson K, and et al . Tissue engineering from human mesencymal amnocytes: a prelude to clinical trials. J Pediatr Surg. 2007;42:974-980 .

113. Delo DM, De Coppi P, Bartsch G Jr, Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. Methods Enzymol. 2006;419:426-38 .

114. Prusa A.R and Hengstschläger M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. Med Sei Monit 2002 ;8:253-257 .

115. Prusa A.R, Marton E, Rosner M, Bettelheim D, and et al . Neurogenic cells in human amniotic fluid. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2004; 191, 309-14 .

116. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum. 2005 Aug;52(8):2521-9.

117. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells Eur J Immunol. 2006 Oct;36(10):2566-73 .

118. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, and et al . Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells. 2004;22(7): 1338-45 .

119. Caplan AI. Adult Mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. Journal of cellular physiology. 2007; 213:341-347.

120. Desmond A, McCarthy. Cytometric analysis of cell phenotype and function. 2001;1-13.

121. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, and et al . Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. Cell Tissue Res. 2005 May;320(2):269-76.

122. Eslaminejad, M.B, Poopak Eftekhari Yazdi, Mesenchymal Stem Cells: In Vitro Differentiation among Bone and Cartilage Cell Lineages. Yakhteh Medical Journal. Autumn 2007, Vol 9, No 3.

123. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16 .

124. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. Nature. 2001 Nov 1;414(6859):118-21 .

125. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 Jun;42(7): 1539-46 .

126. Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, and et al . Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. Blood 2005 106:756-763 .

127. Koc ON, Gerson SL, Cooper B, Dyhouse S, and et al . Rapid Hematopoietic Recovery After Coinfusion of Autologous-Blood Stem Cells and Culture-Expanded Marrow Mesenchymal Stem Cells in Advanced Breast Cancer Patients Receiving High-Dose Chemotherapy. Journal of Clinical Oncology 2000; Vol 18, No 2: 307-316 .

128. Le Blanc, C. Gotherstrom, O. Ringden, M. Hassan, R , and et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta, Transplantation 79 (2005); pp. 1607-1614.

129. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, and et al . Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. Nat Med. 1999. Mar;5(3):309-13.

130. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, and et al . Mesenchymal stem cells. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPSIH) Bone Marrow Transplantation (2002) 30, 215-222 .

131. Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA, Krasheninnikov ME, and et al . First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. Bull Exp Biol Med. 2005 Jan;139(1):141-4 .

132. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, and et al . Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. Chin Med J. 2004 117(10):1443-1448 .

133. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg M, and et al . Systemic Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to the Infarcted Myocardium Feasibility, Cell Migration, and Body Distribution. Circulation 2003;108;863-868 .

134. Ozbal S, Ergur BU, Erbil G, Tekmen I, and et al .The effects of α-lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in Rats. ScientificWorldJournal. 2012;2012:489248 .

135. Cotran R.S, Kumar V, and Robins S.L. Cellular injury and adaptasion In: robins pathologic basis of desease. WB Saundes Company 1989; p38.

136. Osmanağaoğlu MA, Kesim M, Yuluğ E, Menteşe A , and et al .Ovarian-Protective Effects of Clotrimazole on Ovarian Ischemia/Reperfusion Injury in a Rat Ovarian-Torsion Model. Gynecol Obstet Invest. 2012;74(2):125-30 .

137. Kart C, Aran T, Guven S, Karahan SC, and et al. Acute increase in plasma D-dimer level in ovarian torsion: an experimental study. Hum Reprod. 2011 Mar;26(3):564

138. Surmen A. Sıçan Over İskemi-Reperfüzyon Modelinde Rosuvastatin'in Over Üzerine Tedavi Edici Etkisinin Histopatolojik ve Histomorfometrik Olarak değerlendirilmesi. Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi (Uzmanlık tezi), 2011 .

139. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms, Human Reproduction Update 2005;11(2):62–178.

140. Kaku U, Kameyama K, Izawa M, Yamada M et al. Ovarian histological findings in

adult patient with the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) deficiency reveal the impairment of steroidogenesis by lipoid deposition. Endocr J. 2008 Dec;55(6):1043-9.

141. www.nuveforum.net/attachments/6921d1220349965-resim14-jpeg (Şubat 2009).

8.EKLER

Ek-1, Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234
http://deu.edu.tr/deneyetik/

Toplantı No : **10/17/2012**
Toplantı Tarihi : **12 Ekim 2012**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

67/2012 Protokol No'lu; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK'ın yürütücüsü olduğu **"Over torsiyon-detorsiyonun'da mezenkimal kök hücrenin etkisi "** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye

Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye (Topl.katılamadı)

Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye (Topl.katılamadı)

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye (Topl.katılamadı)

Prof.Dr.Şermin GENÇ
Üye (Topl.katılamadı)

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye(Araştırıcı)

Vtr.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye (Topl.katılamadı)

Zehra KINAM
Üye

Ek 2, Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

NEVİN ERSOY

TC Kimlik No / Pasaport No:	24958913922
Doğum Yılı:	1987
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İZMİR
Telefon :	-
Faks :	-
e-posta :	nevinersoy@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2010
TR	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Histoloji ve Embriyoloji	Yüksek Lisans	2014

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Ovaryum, iskemi-reperfüzyon, kök hücre

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		**Tamamlanan**	**Devam Eden**
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	**Alındığı Kuruluş**	**Yılı**
☐	VII.ÖÇM SEMPOZYUMU EN BAŞARILI POSTER İKİNCİLİĞİ	DEU TIP FAKÜLTESİ	2013

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

H A Bagriyanik, N Ersoy, C Cetinkaya, E Ikizoglu, D Kutri, T Ozcana, L G Kamanga, M Kiray (2014) "The effects of resveratrol on chronic constriction injury of sciatic nerve in rats." Neuroscience Letters.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
