

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KUMULUS OOSİT KOMPLEKSİNDE KÖK HÜCRE
POPULASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Nihan GÜNASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. T. Murad AKTAN

KONYA – 2011

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KUMULUS OOSİT KOMPLEKSİNDE KÖK HÜCRE
POPULASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Nihan GÜNASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. T. Murad AKTAN

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı'nın
2009/073 sayılı etik kurul kararı ile onaylanmıştır.

KONYA – 2011

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Nihan GÜNASLAN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Hasan CÜCE
Selçuk Üniversitesi

Danışman: Doç. Dr. T. Murad AKTAN
Selçuk Üniversitesi

Üye: Doç. Dr . Aynur Emine ÇİÇEKÇİBAŞI
Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Orhan ÇETİN
Enstitü Müdürü

i. ÖNSÖZ

Tüm yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Hasan Cüce'ye, Öğretim Üyesi hocalarım Prof. Dr. S. Serpil Kalkan, Prof. Dr. Selçuk Duman ve Prof. Dr. Aydan Canbilen'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

ii. İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. Dişi Genital Sistem	1
1.1.1. Ovaryum Anatomi ve Histolojisi	2
1.1.2. Ovaryum Embriyolojisi	3
1.2. Oosit Gelişimi	3
1.3. Ovulasyon	5
1.4. Oosit Maturasyonunun Klinik Değerlendirilmesi	6
1.4.1. Kumulus Hücreleri ve Oosit Maturasyonu	8
1.4.2. YÜT' de Sağlıklı Oositler	9
1.5. Hormonlar	10
1.5.1. Folikül Stimüle Hormon (FSH)	10
1.5.2. Lüteinize Hormon (LH)	11
1.5.3. Human Chorionic Hormon (hCG)	12
1.5.4. Kumulus Hücreleri ve Hormonlar	12
1.6. Kumulus Hücreleri ve Etkileri	12
1.7. Kumulus Hücreleri ve Hyaluronik Asit	14
1.7.1. Hyaluronan Reseptörleri	16
1.7.2. CD44 İçeren Hücreler	17
1.8. Oosit Gelişiminin Düzenlenmesi	17
1.8.1. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	18
1.8.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF I-II)	19
1.8.3. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	19
1.8.4. Büyüme Farklılaşma Büyüme Faktörü-9 (GDF-9)	20
1.9. Kök Hücre ve Tanımı	20
1.9.1. Yetişkin Tip Kök Hücreler	21
1.9.2. Hematopoetik Kök Hücreler (HKH)	22
1.9.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)	22
2. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3. BULGULAR	28
4. TARTIŞMA	31
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	36
6. ÖZET	38

7. SUMMARY	39
8. KAYNAKLAR	40
9. EKLER	48
EK. A: Etik Kurul Onay Formu	48
EK. B: Bilgilendirilmiş Onay Formu	49
10. ÖZGEÇMİŞ	51

iii. SİMGELER VE KISALTMALAR

YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri

HA: Hiyaluronik asit

hCG: Human chorionic gonadotropin

KOK: Kumulus oosit kompleksi

LH: Lüteinize hormon

IVM: İn vitro Maturasyon

IVF: İn vitro Fertilizasyon

MI: Intermediate oosit

MII: Matur oosit

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

FSH: Folikül Stimüle Hormon

IGF I-II: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

HAS 1-2-3: Hyalüronan Sentaz

TGF α - β : Transforme edici Büyüme Faktörü alfa-beta

aFGF: Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü

bFGF: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü

mRNA: Messenger Ribo Nükleik Asit

GDF-9: Büyüme Farklılaşma Büyüme Faktörü-9

HKH: Hematopoetik Kök Hücreler

MKH: Mezenkimal Kök Hücreler

E2: Östradiol

hMG: Human menopausal gonadotropin

ICSI-ET: İntra Cytoplasmic Sperm İnjection-Embriyo Transfer

VEGF: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

IL-6: İnterlökin 6

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

TB: Toluidine blue

OPU: Oocyte Pick-Up

HEPES: (4- (2- hydroxyethyl)-1 piperazineethane sulfonic acid)

HLA: Human Leukocyte Antigen

μ l: Mikro Litre

μ m: Mikro Metre

1. GİRİŞ

İnfertilite, çiftlerin belirgin bir sorun olmadan en az bir yıl süreyle düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen çocuk sahibi olamaması durumudur. Primer ve sekonder infertilite olarak ikiye ayrılır. Primer infertilite daha önce hiç gebelik oluşmamasını sağlarken, sekonder infertilite korunmasız ilişkiye rağmen yeni bir gebeliğin sağlamamasıdır.

İnfertilite tedavisinde yardımcı üreme teknikleri (YÜT) insan üreme hücrelerinin (oosit ve sperm) vücut dışında embriyo elde edilmesini sağlayan yöntemlerin tümüdür.

Üremeye yardımcı tedavide vücutta bulunan hormonlar yüksek dozda uygulanacak kontrollü ovaryan hiperstimulasyonu yapılır ve foliküller ultrasonografi eşliğinde toplanır. Foliküllerden elde edilen oositler laboratuvar ortamında eşten alınan uygun spermle fertilize edilir. Geliştirilen embriyolar işlem sonunda anne adayı uterusuna transfer edilir. 3 milyon çocuk 1978 yılından itibaren YÜT kullanılarak dünyaya gelmiştir (Cihangir 2009).

YÜT son 15 – 20 yılda rutin uygulama haline gelmiştir. Ancak her tıp dalında olduğu gibi daha isabetli sonuçlara açıktır. Hastanın tedavisi açısından temel ihtiyaç ve ilaç uygulama standartları belirlenmiş ancak optimal başarı için daha detay çalışmalara ihtiyaç vardır.

Gebelikle son bulan tüp bebek uygulaması için mevcut teknoloji sadece oositin hormonal manipülasyonu üzerinde odaklanmıştır. Ancak histolojik açıdan bakıldığında oositi tek başına ele almak mümkün değildir, oositlerin etraflarındaki kumulus hücreleri ile beraber koordineli gelişme gösterdiği klasik bir bilgidir. Bu yüzden kumulus hücrelerinin özelliği üzerinde çalışarak YÜT'e katkı sağlamayı hedefledik. Bu amaç içinde kumulus hücresinde kök hücre popülasyonunu araştırdık.

1.1. Dışı Genital Sistem

Dışı genital sistem ovaryumlar, genital boşaltma yolları ve dış genital organlardan meydana gelir. Menarş ve menopoz arasında yapı ve işlev bakımından değişiklikler gösterir. Nörohumoral mekanizma ile bu değişiklikler kontrol edilir.

Menarş bir genç kız ilk adet gördüğü zamandır (9–14 yaş arası). Menopoz ise değişiklerin 47–52 yaş arasında giderek düzensiz olup kaybolmasıdır.

Ovaryum pelvis boşluğunun yan duvarına dayalı sağ ve solda olmak üzere 2 tanedir. Biçim ve büyüklükleri birbirine benzer olup dişi cins hücrelerini üretir ve steroid hormonları salgılar. Steroidler görevi cins hücrelerinin olgunlaşması, sekonder cins organları ve meme bezlerinin gelişme ve büyümesini kontrol eder (Kalaycı 1986, Junqueira ve ark 1998).

1.1.1. Ovaryum Anatomi ve Histolojisi

Ovaryum, endokrin ve ekzokrin salgı yapan bir çift bezdir. Bu bezler hafif düz, ovoid şekilli yaklaşık 4 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığındadır. Pelvik kavitenin lateral duvarında uterusun her iki tarafında uzanırlar. Her biri bir kenara mezoovaryum ile tutunmuştur. Hilumda vasküler bağ dokusu (mezoovaryumun) ovarial stroma ile devam eder. (Leeson ve ark 1988).

Bir ovaryumun dışta yer alan korteks ve içte yer alan medulla bölümleri vardır ancak bu iki bölgenin sınırı tam olarak belli değildir. Yüzey epitelinin altında bulunan yoğun fibröz bağ doku yapısındaki tunika albuginea, tüm ovaryumu kapsül gibi sarar. Korteksin geri kalanı sarmal yapıda düzenlenmiş hücreden zengin bağ doku yapısındadır (Ovalle ve Nahirney 2009).

Korteks; dışta bulunan, içinde foliküllerin yer aldığı ve korteks stroması içine gömülü olduğu kısımdır. Ayrıca foliküller arasını dolduran bağ dokusu (stroma) bulunmaktadır. Puberteden sonra kalınlığı artar (Kalaycı 1986).

Bu bölgede matürayonun ve dejenerasyonun farklı evrelerinde, oosit-içeren, farklı boyutlardaki ovaryum follikülleri bulunur. Çocukluk çağındaki ovaryum korteksinde primordial folliküller çok sayıdadır; seksüel olgunluğa erişmiş kadınlardaki ovaryum korteksinde ise rüptüre folliküllerin yerini alan korpus luteumlar çoktur (Ovalle ve Nahirney 2009).

Medulla (Zona vezikuloza); içte bulunur, damardan zengin bağ dokusu yapıdadır. Hilus dışında her tarafta korteks ile sarılmıştır (Kalaycı 1986).

Sınırları belirgin olarak seçilemeyen medulla; çok sayıda kıvrımlı kan damarları, sinirler ve lenfatikler içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır (Ovalle ve Nahirney 2009).

1.1.2. Ovaryum Embriyolojisi

Kadın üreme sisteminin embriyolojik gelişimi karın arka duvarındaki intermediyer mezodermden kaynaklanan ürogenital kabartıdan köken alır. Gebeliğin 6.haftasında, primordial germ hücreleri geliştikleri vitellus kesesi endoderminden ürogenital kabartıya göç ederler.

Primordial germ hücreleri; vitellus kesesinin, arka kısmından ve barsak arka kısmı endoderminden kaynaklanmaktadır. Primordial germ hücreleri dişi gonada ulaştınca oogoniumlara farklılanırlar. Mitozla çoğalan oogoniumlar ovaryan farklılaşmayı başlatırlar. 16–20. gebelik haftalarında yaklaşık 6–7 milyon oogoniaya ulaşırlar. Bir küme içinde yer alan oogoniumların tümü tek bir üreme hücresinden gelişirken, folikül hücreleri olarak bilinen oogoniumların çevresindeki yassı epitel hücreleri overin yüzey epitelinden köken alırlar (Gougeon ve ark 1994, Sadler 2000).

Oogoniumlar oluşacak ovaryum korteksi içinde yer alırlar. Fetal hayatta mitoz bölünmeler 5. aya kadar devam eder. Bu zamanda her bir ovaryum 3 milyonun üzerinde oogonium içerir. Fetal hayatın 3. ayının başlangıcında bazı oogoniumlar birinci mayoz bölünmenin profazına girerler ve primer oositler haline dönüşürler. İnsan fetusunda bu işlem gebelik süresinin 7. ayının sonuna kadar tamamlanır. Bu dönem içinde birçok primer oosit atresia denilen gerileme gösterir. Dejenerasyon sonucu foliküller kaybolur (Sadler 2000).

1.2. Oosit Gelişimi

Primer oosit çevresindeki yassı epitelyum hücreleriyle birlikte primordial follikül adını alır. Bu foliküller immatür ovumu oluşturur. Oosit iri bir nükleolus ve geniş veziküler bir nükleusa sahip sferoidal bir hücredir. Sitoplazması opak ve granülerdir. İri bir golgi kompleksi, annulata lamella ile çok sayıda mitokondri ve küçük veziküllere sahiptir. Oositi çevreleyen foliküler hücrelerin tek tabakası bazal bir lamina ile ovarian stromadan ayrılır (Leeson ve ark 1988).

Yassı foliküler hücreler ilk küboidal ve sonra kolumnar şekle dönüşür. Bu hücreler granuloza hücrelerinin meydana getirdiği stratum granulosum olup ovumun çevresinde çok katlı bir tabaka oluşturmak üzere aktif olarak bölünürler. Böylece tek tabakalı primordial folikül çok tabakalı primer foliküle dönüşmüş olur. Oositler kalın, amorf bir örtü olan zona pellusida ile çevrili olup bu katman en az üç farklı glikoprotein içerir. Folikül hücrelerin uzantıları ve oosit mikrovillusları, zona pellusida içine uzanırlar ve birbirleriyle aralık bağlantıları aracılığı ile iletişim kurarlar.

Foliküller granuloza hücrelerinin boyca ve sayıca artmasıyla büyüyüp kortikal bölgenin daha alt bölümlerine göç eder (Junqueira ve ark 1998).

Stratum granulosum 8–12 tabakalı olduğu zaman foliküler kitleden meydana gelen sıvı ile düzensiz küçük boşluklar doldurulur. Foliküler tabakanın iç tarafındaki bu boşluğa antrum boşluğu denir. Folikül de antral folikül ya da sekonder folikül olarak tanımlanır.

Folikül sıvısı bileşenlerini glikozaminglikanlar, steroid –bağlayıcı proteinler ve yüksek konsantrasyonda hormonlar (progesteron, andojen, östrojen)bulunur. Granuloza hücresi ile çevrelenmiş olan ovum, antral kavitenin bir kenarında ovulasyona hazır olacak şekilde sıkıştırılmıştır. Bu tümsek kumulus ooforus olarak tanımlanır (Leeson ve ark 1988).

Bir grup granuloza hücresi oositin çevresinde yoğunlaşır ve korona radiata oluşturur. Bu granuloza hücreleri ovaryumu terk ederken oosite eşlik eder. Korona radiata hücreleri ovumun hücre membranı ile temas halindedir ve zona pellusida boyunca uzanır. Ayrıca ovumun mikrovillusları zona pellusida içine doğru uzanır. Granuloza hücrelerinin oluşturduğu epitelyum hücreleri antrum boşluğunun çevresinde düzensiz tabakalar halinde uzanır. Granuloza hücreleri arasında yoğun boyanan küçük yığınlar görülür. Bu ekstrasellüler materyale Cell-Exner cisimleri denir. Bu cisimler periodik asit schiff pozitif boyası ile boyanır (Leeson ve ark 1988, Junqueira ve ark 1998).

Folikülün hemen yanında stromada yer alan epitelyum hücrelerinde bol mikrovillusun bulunduğu, aralarında glikoprotein ara maddenin de yer aldığı, fibroblastlar teka folikülü oluşturmak üzere farklılaşırlar. Bu katman daha sonra teka

interna ve teka eksterna olarak farklılaşır. Teka interna sekonder folikülü dıştan kuşatan hücre ve damardan zengin tabakadır. Bağ dokusundan geliştiği halde hücreleri epitelooid karakterdedir. Büyük genelde poligonal biçimli hücreleri, steroid hormon sentezleyen hücreye özgü organel yapısını kazanarak östrojen hormonu sentezler. Damardan zengin oluşu endokrin organ özelliğine uygundur. Teka interna ile folikül arasında folikül bazal membranı bulunur (Kalaycı 1986, Junqueira ve ark 1998).

Teka eksterna kollajen fiberlerden ve fusiform hücrelerden oluşmuş bir bağ dokusudur. Hormon salgılama fonksiyonuna sahip değildir. Periferde ovarian stroma ile birleşir (Leeson ve ark 1988).

Her aybaşı dönemi sırasında genellikle bir follikül diğerlerinden daha fazla büyür yani 10-14 gün içerisinde maturasyonunu tamamlar. Olgun folikül ya da graaf folikülü olarak adlandırılan folikül son derece büyük olup, ovaryum yüzeyinden dışarı doğru bir çentik yapar. Follikül sıvısı ile genişlemiş olan antrum, stratum granulosuma bağlıdır. Ovum boyut olarak maksimum olur. Kalın bir zona pellusida ve korona radiata ile sarılmıştır. Follikül maturasyonu sağlandığı zaman düzensiz küçük boşluklar folikül sıvısı ile dolar ve korona radiata hücreleri arasında görülmeye başlar. Bu foliküller kalın bir teka katmanına sahiptir. Bu katman gelişimi sağlar. Teka interna hücreleri östrojen gibi hormon prekürsörlerini üretir. Teka eksterna kollajen fiberlerden oluşmuş bir bağ dokusudur (Kalaycı 1986, Leeson ve ark 1988)

1.3. Ovulasyon

Follikül maturasyonu tamamlandığında sıvı salgısı artar ve folliküldeki genişlemeden dolayı önceki durumdan daha sulu bir hale gelir. Fertilize yeteneğine sahip oosit ve onun çevresinde bulunan kumulus hücrelerinin overden atılmasıdır (Cihangir 2009).

Ovulasyonda uyarıyı oluşturan, büyüyen follikül tarafından üretilen dolaşımdaki yüksek östrojen düzeylerine cevap olarak ön hipofizden salgılanan lüteninize hormon (LH) ani bir artıştır. Prostaglandinler, histamin, kollajenaz ve vazopressin salıverilir. Granüloza hücreleri hiyalüronik asit (HA) üretir ve gevşek bir

hal alırlar. Tunika albugineadaki kollajen yıkımı, iskemi ve folikül duvarının küçük bir kısmı hücrelerin ölmesi sebebiyle zayıflar (Voss ve Fortune 1991).

Fetal yaşamda profaz evrede olan oositler ovulasyondan hemen önce birinci bölünmeyi tamamlar. Kromozomlar eşit şekilde olup sekonder oositlerden bir tanesi birinci kutup cismi haline döner. Birinci kutup cismi nükleus az miktarda sitolazma içeren küçük bir hücredir ve atılır. Atıldıktan sonra oositin nükleusu ikinci mayoz bölünmeye başlar ve bölünme metafaz evresinde durur. Genellikle ovulasyon sonucunda bir ovum atılır. Bazı durumlarda iki ya da nadiren daha çok ovum ovulasyona uğrayabilir. Serbest hale gelen ovum genellikle fallop tüplerinin infundibulumuna doğru gider ve fertilizasyon kapasitesi 12 saat sürer. İnsanda ovulasyon ortalama 28 günde bir tekrar eder (Leeson ve ark 1988).

1.4. Oosit Maturasyonunun Klinik Değerlendirilmesi

Oosit maturasyonun değerlendirilmesinde human chorionic gonadotropin (hCG) verildiği zamanki folikül çapları, aspire edilen folikül sıvısının miktarı önemlidir.

Preovulatar süreçte oosit, follikül içerisinde etrafı kumulus ve granuloza hücreleriyle kaplı olarak bulunur. Kumulus oosit kompleksi (KOK) olarak adlandırılan bu yapıda, kumulus hücreleri ile oosit arasında ince bir hücreli ilişki söz konusudur. En iç katmanı oluşturan korona radiata hücreleri, zona pellusida üzerinden sitoplazmaya penetre olan uzantılar göndermekte ve bu gap junctionlar sayesinde oosit membranı ile ilişki kurmaktadır. Böylece kumulus hücreleri oosite metabolitleri transfer edebilmekte ve oosit inhibisyon ve aktivasyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Sirard ve Blondin 1996, Soom ve Kruif 1996).

Ovulasyondan yaklaşık 4 gün önce (doğal siklusta LH pikinden; indüklenen siklularda hCG enjeksiyonundan önce) estradiol seviyesi yükselir, korona kumulus hücreleri daha yoğun hale gelirler. Merkezde yerleşik çekirdek bir germinal vezikül şeklinde görünür. Çekirdek belirgin bir çekirdekçiğe sahiptir. LH piki ya da indüklenenlerde hCG' den sonra germinal vezikül perifere hareket eder. Germinal vezikül 22–25 gün sonra olur. Metafaz I (M I)den 4 saat sonra kromozomlar Mayoz I ipliğinin metafaz plağı boyunca dizilirler ve sonra kutuplara hareket ederler. 34 saat geçince çoğu oosit M II'ye ulaşır. I. Kutup hücresi atılır ve kromozom sayısı yarıya

indirilir. Ardından II. Mayoz ipliği oluşur. Kumulus ve korona hücrelerinin genişlemesi (ekspansiyonu) da çekirdek maturasyonunu izler. MI' den MII' ye geçerken kumulularda proteoglikan salgılar ve zona pellusidaki porları doldururlar (Gaud ve ark 1998).

IVM için, kumulus hücresi ile etkileşim halinde kültürde bekletilen oositlerin nükleer maturasyonunun, kumulus hücresinden temizlenenlere göre daha yüksek oranda geliştiğini bildirmiştir.

Kumulus ooforus hücreleri, sitoplazmik uzantılarıyla zona pellusidayı geçerek oosit plazmalemmasına ulaşırlar ve böylelikle oosit maturasyonunda gerekli substansların bir kısmını sağlarlar. Bu hücreler hem endokrin hem de parakrin özellik taşımaktadırlar (Russel ve Salustri 2006).

Oositlerin maturasyonu 1. polar cisimcik ve germinal vezikül varlığına göre maturasyonu değerlendirilir.

Matur Oosit (MII): 1. polar cisimcik mevcut, germinal vezikül mevcut değildir. Matur oositte oosit etrafında kumulus ve korona hücreleri ışık demeti şeklinde oldukça açılmıştır ki bu zona pellusidanın net olarak izlenmesine olanak verir.

Intermediate Oosit (MI): 1. polar cisimcik de germinal vezikül de mevcut değildir. Kumulus ve korona hücreleri dağılmış immatur oosite göre biraz daha açılmıştır. Kumulus hücreleri dağılmış iken korona hücrelerinde parsiyel dağılma mevcuttur.

Immatur Oosit (Profaz I): Germinal vezikül mevcut, 1. polar cisimcik mevcut değildir. Immatur oosite kumulus hücreleri oosit etrafında sık görülür. 4-10 saat inkübasyondan sonra tekrar değerlendirilirler.

Postmatur Oosit: 1. polar cisimciği içerir, ancak kumulus hücreleri seyrek şekilde dağınıklık gösterir, korona hücreleri ise yaygın ve azdır. Bu grup oositlerin inkübe edilmelerine gerek yoktur (Lindner ve ark 1988).

MI oositlerin invitro maturasyonları (IVM) 1-24 saat zaman alabilirler. Olgunluğunu tamamlamamış profaz I ve MI oositlerinin döllenebilme yeteneklerinin

bulunmaması fertilizasyon oranının düşük kalmasına neden olmaktadır. Bunların IVM'leri sağlanabilirse YÜT'ün başarısı artacaktır. İnsemine edilen oositin maturitesi arttıkça gebelik oranları da artmaktadır. Bugün in vitro fertilizasyonda (IVF) kullanılan oositler MII oositlerdir (Lopata 1988).

1.4.1. Kumulus Hücreleri ve Oosit Maturasyonu

Kumulus hücrelerin maturasyona etkisi araştırıldığında bir çalışmada kumulus hücreleri uzaklaştırılmış oositlerde ya maturasyon gerçekleşmemiştir ya da düşük düzeyde saptanmıştır. Çevresi kumulus hücreleri ile kaplı oositlerde ise IVM oranları yüksek bulunmuştur (Younis ve ark 1989).

Kumulus hücrelerinin fonksiyonu, oositle çevre arasındaki ilişkiyi sağlamaktır. Oosit maturasyonu için anahtar bir faktör olan LH, düzenleyici rolünü kumulus hücrelerini etkileyerek yapmaktadır. Benzer şekilde mayotik maturasyon ve kumulus ekspansiyonunda görev yapan epidermal büyüme faktörlerinin (EGF) olumlu etkisi kumulus hücrelerinin varlığında ortaya çıkmaktadır (Soom ve Kruif 1996).

Sığır oositlerinin sitoplazmik ve nükleer maturasyonunu, kumulus/granulosa hücrelerinin uyardığı ve yine bu hücrelerin fertilizasyon oranını ve sonraki gelişim potansiyelini artırdığı bilinmektedir (Buccione ve ark 1990, Greve ve ark 1993).

1.4.2. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Sağlıklı Oositler

YÜT'ün başarısı yeterli sayıda olgun oositin ve sağlıklı embriyonun elde edilmesine bağlı bulunmaktadır. Toplanan ovulasyon öncesi oositlerin mayotik statülerinin MII'de olması, normal fertilizasyon ve embriyonik gelişme şansını belirleyen en can alıcı nokta olmaktadır.

İn vitro gelişimini etkileyen faktörlere baktığımızda bir oositin gelişme yeteneğine sahip olması; mayotik programı yeniden başlatması ve tamamlaması, fertilizasyonu başarabilmesi ve embriyonik gelişimi sağlayabilmesi şeklinde açıklanmaktadır (Gliedt ve ark 1996).

Bu gelişim yeteneğine; kumulus morfolojisi, folikül büyüklüğü, folikül sağlığı, ovaryum stimülasyonu ve kültür öncesi manüplasyonlar olmak üzere 5 ana faktör etkili olabilmektedir.

Granüloza hücrelerinin (kumulus ooforus ve korona radiata) oositin IVM'ye pozitif etkileri vardır. Bu hücreler salgıladıkları gonadotropinlerle reseptörler aracılığıyla oositin ilk etkileşimini sağlamaktadırlar (Sirard ve Blondin 1996).

Sitoplazma olgunlaşması ve oosit aktivasyonu çekirdek maturasyonu ile paralel yürür. IVM için kültür sistemlerinin başarısının farklı parametrelere bağlı olduğu bilinmektedir. Oositlerin IVM'si kumulus korona oosit kompleksinin bütün elemanlarının katıldığı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin bir sonucudur (Cihangir 2009).

Kumuluslar özellikle çekirdek maturasyonu ve ileriki gelişme kapasitesi için gereklidir. Çünkü kumulusları temizlenen oositlerde IVM'nun düşük olması, gerekli substansların oosite taşınmasının yeterince sağlanamadığını akla getirmektedir.

Kumulus hücrelerinin etkisi ile oositte protein sentezi uyarılır, özellikle steroid salınımı artar. Spermle karşılaşınca M II'deki oositin sitoplazma olgunlaşması daha da indüklenir. Bu olaylar dizisi oosit aktivasyonu olarak tanımlanır (Leeson ve ark 1988).

1.5. Hormonlar

Ovaryum, salgıladığı östrojen ve progesteron hormonlarıyla, kadın genital sisteminin bütün organları üzerinde etkili olan, genital döngüyü düzenleyen bir organdır.

Ovaryumlarda erginlik evresinden başlayarak, bir grup primordiyal folikülde foliküler büyüme olarak adlandırılan süreç başlar. Bu süreç oositler, granüloza hücreleri ve folikülleri çevreleyen stromadaki fibroblast benzeri hücrelerdeki değişimleri kapsar. Büyüme sürecine geçen foliküllerin, çok sayıda primordiyal folikül arasından nasıl seçildiği tam olarak bilinmemektedir (Lindner ve ark 1988, Koyabashi ve ark 1991).

Genital döngüler süreciyle başlayan ovaryumdaki değişiklikler, tümüyle hipofiz ön lobundan salgılanan gonadotropik hormonlar, folikül stimüle hormona (FSH) ve LH'ya bağlıdır. Ovaryumların inaktif olmasının nedeni gonadotropin hormonlarıyla uyarılmamasından kaynaklanır. FSH; overlerde foliküllerin proliferasyonunu ve östrojen salınımını sağlar (Kayaalp 2000).

Bu durum çocukluk evresinde izlenebilir. Gonadotropinlerden FSH ve LH salgılanmaya başladığı yaş 9-10'dur. 11-16 yaşlarında genital döngü başlar ve en yüksek düzeye ulaşır. Bu değişimin olduğu dönemin adı pubertedir (Carson ve ark 1986).

1.5.1 Folikül Stimüle Hormon (FSH)

Oositin gelişmesi gonadotropinlere bağımlı olup artan östrojen yapımı ile uyum içindedir. Preantral foliküllerin granüloza hücreleri, steroidleri sentezleyebilir fakat östrojeni daha fazla yapabilmektedir. FSH hem granüloza hücrelerindeki östrojen yapımını başlatır hem de granüloza hücrelerinin büyümesini stimüle eder (Young ve ark 1992).

FSH granuloza hücrelerinin proliferasyonunda ve differasyonunda etkili olmaktadır. Primer, sekonder, antral foliküllerde bulunan granuloza hücrelerinde ve primordial foliküllerde bulunan oositlerde FSH reseptörlerinin ve FSH reseptör geninin var olduğu ve küçük foliküllerin gelişimi için bazal seviyede FSH'nın ve östradiolün gerekli olduğu tespit edilmiştir (Hurk ve ark 1997).

Ovaryumların salgıladığı hormonların (östrojen ve progesteron) kendisi üzerine de etkileri bulunmaktadır. Ovaryumda östrojen ve progesteron reseptörlerinin dağılımını belirlemek için immünohistokimyasal yöntemlerden yararlanılmaktadır. Yapılan çalışmalar da östrojen ve progesteron reseptörlerinin, buldukları folikülün granüloza hücrelerinde gözlendiği bilinmektedir (Iwai ve ark 1990).

Preantral granüloza hücrelerinde FSH reseptörlerinden dolayı folikül kendi östrojenik mikroçevresini oluşturur (McNatty ve ark 1979). Bundan dolayı östrojen yapımı FSH reseptör içeriği ile de sınırlandırılır. FSH, östrojen ile birlikte hareket ederek granüloza hücrelerinde sinerjik mitotik etki yaparak proliferasyonu uyarır.

Östrojen ve FSH reseptörlerinin hızlı olarak uyarılmasını sağlamaktadır (McNatty ve ark 1980).

Kumulus hücreleri preovulator dönemde gonadotropin sonrasında karakteristik değişiklikler gösterir. Bu zaman içerisinde HA ve mukopolisakkarit sentezinde laktat ve progesteron üretiminde, oksijen tüketiminde biyokimyasal değişiklikler oluşur. FSH'ın bu dönemde HA sentezini ve musinlemesini kumulus hücre kompleksinde arttırarak kumulus ooforus maturasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir.

Granüloza hücrelerinde preovulatuvar dönemde FSH ve LH reseptör sayısı artarak folikül gelişimi uyarılır. Bu etki ilk önce granüloza hücrelerinde yapılan östrojen ile kuvvetlenir (Beck 1989).

1.5.2. Lüteinize Hormon (LH)

LH; olgulaşan folikülün patlamasını ve ovumun dışarı atılmasını sağlar. Ayrıca corpus luteumdan progesteron salınımını stimüle eder. Plazma ve antral sıvıda LH'ın erken yükselmesi durumunda granülozadaki mitotik aktivite azalmakta, dejeneratif değişiklikler başlamakta ve folikül içindeki androjen düzeyleri artmaktadır (Atabekoğlu 1998).

LH kendi reseptörleri üzerine etki ederek dominant foliküldeki granülozanın progesteron üretimiyle sonuçlanan luteinizasyonu hızlandırmaktadır. LH'ın ani artışı, oositteki mayozun yeniden başlamasını, granüloza hücrelerinin luteinizasyonunu, kumulus büyümesini ve folikül rüptürü için gerekli olan prostaglandinlerin sentezini sağlar. LH'ın ani artışı ile foliküldeki progesteron düzeyleri, ovulasyon zamanına kadar artmaya devam etmektedir. LH pik düzeyine ulaştığında östradiol seviyeleri düşmektedir.

Teka hücrelerinde LH etkisi ile yapılan androjenler (testosteron ve androstenedion) granüloza hücrelerine taşınır ve FSH'ın aromataz enzimlere etkisi ile burada östrojenlere dönüşür (Dujikers ve ark 1997).

1.5.3. Human Chorionic Gonadotropin (hCG)

hCG; IVF döngülerinde LH artışını taklit etmek için verilir. LH'ı taklit ettiğinin düşünülmesindeki sebep LH gibi son folliküler maturasyonu sağlamasıdır (Enien ve ark 1995).

Östrojen maturasyon süreci içerisinde granuloza hücrelerinin FSH ve LH'ya olan duyarlılıklarını artırır. Sonuçta granuloza hücrelerinde bazı farklılaşmalar başlar (Enien ve ark 1995).

1.5.4. Kumulus Hücreleri ve Hormonlar

Bütün memelilerde LH artışının oosit maturasyonu ve ovulasyonu başlattığı bilinmektedir. Bu etkiden sonra oosit kumulus hücrelerini oosit maturasyonu için uyarır. Maturasyon, fertilizasyon ve blastosist aşamasına gelebilme kabiliyeti olabilmesi için oositin çevresi çok katlı sıkışık kumulus hücreleriyle kaplanmış, sitoplazmasının bir örnek kumlu görünümü olması gerektiği tespit edilmiştir. Oositin çevresindeki sağlıklı somatik hücre popülasyonunun besin geçişinin kolaylaştırılmasında ve oosite gelen uyarımların iletilmesinde zorunlu olduğu kaydedilmiştir (Greve ve ark 1991, Greve ark 1993, Sirard ve Blondin 1996).

1.6. Kumulus Hücreleri ve Etkileri

Ovulasyon öncesi gonadotropinlerin (testislerden sperm, overlerden yumurta üretmek için bu sistemleri uyarma kapasitesine sahip hormonlardır) kan seviyesinin yükselmesine cevap olarak, kumulus hücreleri HA üretimine başlar ve oositte mayoz bölünmeye devam eder. Ovulasyon öncesinde kumulus hücreleri ovulasyon zamanı iletişimi sağlar, ovulasyondan sonra spermatozoanın oosit ile birlikte olmasını sağlar ve ovulasyon öncesinde oosit maturasyonunu destekler (Cihangir 2009).

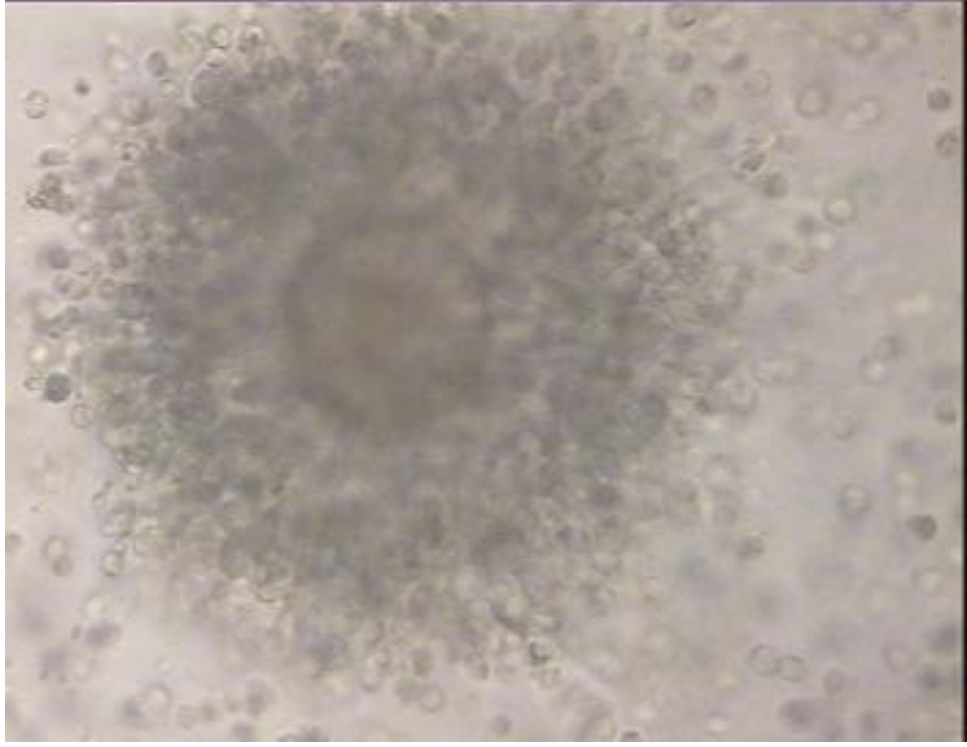
Viskoelastik ekstraselüler matriks üretimi ovulasyonun en önemli basamağı olan kumulus hücreleri tarafından üretilir. Protein sentezinin uyarılması ve özellikle steroid salınımının artması kumulus hücrelerinin sayesinde olur. MII'deki oositin sitoplazma olgunlaşmasının indüklenmesi spermiumla karşılaşma zamanında olur (Cıncık ve ark 2001).

Kumulus hücrelerinin yüzey artırıcı mikrovillus ve sitoplazmik çıkıntılarının zona pellusida üzerinde oosit sitoplazma zarının mikrovillusları ile gap-junction ve desmozom tipi bağlantılarla oosite küçük moleküllerin (proteoglikanların) ve kendi salgıladıkları az miktardaki gonadotropinlerin transportunu sağlar. Ayrıca reseptör artışını indüklemek suretiyle östrojen, progesteron ve kısmende androjen salgısında artışa yol açar. Bunun yanı sıra insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) salgılayarak oosit olgunlaşmasına katkıda bulunurlar (Mlynarcikova ve ark 2008).

Kumulus hücreleri kültür mediumu içeriğinin pH'sını stabilize ederler, istenmeyen maddeleri (oksidatif ajanlar, hypoksantin gibi) ortadan kaldırırlar. Aynı zamanda embriyo gelişimini destekleyen bazı maddeler salgırlar. Kumulus hücrelerinin ürettiği steroid ve proteinlerin embriyoların erken gelişim döneminde olumlu etkisi vardır (Fabbri ve ark 2000).

Kumulus hücre matriksinin ovulasyon ve fertilizasyon başarısı için vazgeçilmez olduğu bilinmektedir. Kumulus matriks gelişiminin, oosit büyüme potansiyeli ile bağlantılı olduğu, genler aracılığı ile oosit ve kumulus hücrelerinin etkileştiği gösterilmiştir (Russel ve Robker 2007).

Kumulus ooforus ve korona radiata (granüloza hücreleri) oositin IVM'da pozitif etkiler olup KOK hücrelerinin oosit maturasyonunda direkt etkili olduğu ve ayrıca KOK matriksini intraselüler sinyalleşmede önemli rolleri olduğu vurgulanmıştır (Resim 1.1.). Bu hücreler salgıladıkları gonodotropinlerle oositin ilk gelişimini reseptörler aracılığı ile sağladığı düşünülmektedir (Hampl ve Eppig 1995).



Resim 1.1. KOK' un invert mikroskop görüntüsü X20

Kumulus hücre varlığının oosit üzerindeki gelişimini birçok yönden etkilemekte olup değişik aktivator ve inhibitörler devreye girmektedir. Bu nedenle KOK yapısının identifikasyonu önemlidir (Hernandez-Gonzalez ve ark 2006).

1.7. Kumulus Hücreleri ve Hyaluronik Asit

Kumulus hücre matriksi hücreler arası etkileşim sonucu yapısında tekrarlayan disakkaritlerden oluşan glukronik asit ve N-asetilglukozamini içeren glukozaminoglikan formdaki HA içerir. Bir kısım gonadotropinler (LH, FSH) üretimini ve depolanmasını uyarır (Russell ve Robker 2007).

HA hücre dışı matriksinin ana bileşenlerinden glukozaminoglikanların bir alt sınıfı olup, insan vücudunda hem yapısal olarak yer almakta, hem de fizyolojik olarak birçok fonksiyona katılmaktadır. Hücre dışı matriksi üç ana sınıf biyomolekül içermektedir. Bunlar; yapısal proteinler (örn. kollajen, elastin vs.), özelleşmiş proteinler (örn. fibronektin, laminin vs.) ve proteoglikanlardır (Aytekin ve Çaylak 2009).

HA sentezi ve ekstraselüler matriks proteinlerinin üretimi kumulus genişlemesi ile olur. HA sülfatlanmış bir glikozamin olup oositin çevresini saran ve korona radiatayı oluşturan özel görevli granüloza hücrelerinde bulunur ve üzerine oturduğu kumulus ooforus hücrelerin birbirine yapışmasını sağlar. Yapılan deneylerde FSH'nın kumulus hücrelerini indüklediği belirlenmiştir. Özellikle kumulus hücrelerinin genişmesini sağlayan ajanların oosit tarafından salgılanan maddeler tarafından yönetildiği ortaya konmuştur (Demir 1995, Salustri ve ark 1992).

Kumulus hücrelerinin HA'yı inhibe edebilmesi için folikül sıvısı sülfatlı glikozaminoglikanları içerir. Bu sülfatlı aminlerin fonksiyonu ovariyal siklusun ortasında gonadotropinin pik yaptığı dönemde folikül antrumunda bulunan FSH'a bağlı kumulus hücre genişmesini inhibe etmek ve ayrılmasını engellemek olduğu, ovulasyondan sonra fertilizasyona kadar korona radiata hücrelerinin korunmasıyla oositin sağlıklı kalmasını sağladığı düşünülmektedir (Sato ve ark 1990, Sadler 2000).

HA sentezi hyalüronan sentaz (HAS) olarak adlandırılan üç adet hücre zarı enzimleri tarafından katalize edilir; HAS1, HAS2 ve HAS3. HAS1 ve HAS2 enzimlerinin sentez ettiği hyalüronan yüksek molekül ağırlığına sahip iken, HAS3 enziminin sentez ettiği hyalüronan ise düşük molekül ağırlığına sahiptir. HAS ekspresyonu ise hücre çeşidine bağlı olarak değişmektedir (Itano ve ark 1999).

KOK matriks oluşumu kumulus hücresinden HA sentezini gerektirir. LH etkisiyle oosit tarafından salgılanan büyüme faktörleri, kumulus hücresindeki matriks üreten genleri harekete geçirir. HA üreten HAS2 bu yol ile aktive olur. Aktivasyonu oositin büyüme kapasitesiyle ilişkilidir (Russel ve Salustri 2006).

HA çoğu dokuda önemli bir ekstraselüler matriks komponentidir. Doku yenilenmesinde, inflamasyonda, ateroskleroz ve kanser gibi hastalıklarda varlığı gösterilmiştir (Toole 2004).

Hücre dışı matriksindeki miktarının hasarlı dokuların tamirinde iş yapabilmesiyle doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir (Grskovic ve ark 2006, Fam ve ark 2007).

Hyalüronan molekülünün en önemli fizyolojik fonksiyonlarından birkaçı; su homeostazisi, damarlanma (anjyogenezis) ve hücre göçünün düzenlenmesidir (Fraser ve ark 1997).

Ayrıca hyalüronan dokular etrafında oluşan tümör invazyonunda da önemli bileşenler arasında yer almaktadır (Auvinen ve ark 1997, Auvinen ve ark 2000).

1.7.1. Hyaluronan Reseptörleri

Hyaluronan hücreler arasında yoğun halde bulunmakla birlikte, hücre proliferasyonunu tetikleyip hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. Bağlandığı reseptörlerden bilinenleri CD44 ve lenfatik damar endotelyal hyaluronan reseptör-1'dir (Brecht ve ark 1986, Laurent ve Fraser 1992, Bono ve ark 2004).

Güncel çalışmalar HA'nın tümör hücrelerinin CD44 reseptörleri ile etkileştiğini, ErbB2 reseptörünü aktive ettiğini, bunun sonucunda P13K yolunu aktive ettiğini göstermektedir. P13K yolu hücre büyümesi ve yaşaması için etkili sinyaldir (Ghatak ve ark 2005, Misra ve ark 2005).

Bu yol CD44 için aktiftir. CD44 sentezi HA sentezi ile paralel olup, in vitro ortamdaki kumulus hücre kültürlerinde HA'nın apoptotik indeksi azalttığı gözlemlenmiştir. Normal primer hücrelerin aksine, tümör kökenli hücrelerde HA'ya yüksek afiniteli CD44 üretimi gösterilmiştir (Kaneko ve ark 2000, Saito ve ark 2000).

CD44 bağımlı oluşumların mekanizmalarının açıklanması, molekülün çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılabilmesini sağlayabilecek olması açısından önemlidir (Nazikoğlu ve Çakar 2006).

CD44, bir hücre zarı adezyon molekülüdür. Tek zincirli bir molekül olup, bir hücre dışı distal parça, kökü oluşturan proksimal parça, zar içi geçiş parçası ve sitoplazmik kuyruktan oluşur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar CD44'ün bilinen klasik hücre zarı üzerindeki konumu dışında formlarda da bulunduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda CD44'ün organizmada üç fazda bulunduğu ön görülmektedir: Bunlar hücre zarı reseptörü

olarak, matriksin bir bileşeni olarak ve vücut sıvılarında çözünebilir protein olarak (Ponta ve ark 2003).

Kısacası; HA'nın folikülde esas görevi ekstrasellüler matriksin hücreler arası boşluklarını doldurmaktır. Viskoelastik özellik gösteren kumulat matriksi KOK'un elastik olmasına olanak sağlar ve ovulasyon esnasında yırtılan folikülün kolay geçişi sağlanmış olur (Lammich ve ark 2002).

1.7.2. CD44 İçeren Hücreler

Monositlerde, granüositlerde (B-hücrelerinde ve olgun T-hücrelerinde), eritrositlerde, bulunmaktadır. Epitelyal hücreler, fibroblastlar, iskelet kası, santral sinir sistemi beyaz cevheri ve birçok tümör hücresinde de varlığı gösterilmiştir (Lammich ve ark 2002).

1.8. Oosit Gelişiminin Düzenlenmesi

Oosit gelişiminin düzenlenmesi ve kontrolü hem lokal (parakrin) hem de over dışı (endokrin) faktörleri kapsayan kompleks bir süreçtir. Oosit gelişiminin düzenlenmesinde, hormonların yanı sıra (LH, FSH), büyüme faktörleri, sitokinler, inhibin/aktivin gibi faktörler de kritik önem taşır (Erickson 1994, Salha ve ark 1998).

Reproduktif sistemde, hormonlar ve büyüme faktörleri yakın ilişki içerisinde. Büyüme faktörleri overlerde somatik hücreler tarafından, embriyonun değişik bölünme aşamalarında embriyo tarafından ve dişi üreme kanallarına ait hücreler tarafından sentezlenebilmektedirler (Matsui ve ark 1991, Dong ve ark 1996, De La Fuente ve ark 1999).

Organizmada, tek bir yumurta hücresinden embriyo oluşumu ve puberte dahil gelişimin pek çok evresinde sürekli bir büyüme faktörü salımı mevcuttur. Bu faktörlere, hücre proliferasyonu, rejenerasyon ve farklılaşma gibi temel olaylarda ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre siklusunun M fazında, büyüme faktörleri ve sitokinler etki göstermektedir (King ve Cidlowski 1995).

Hücreler belli faktörler tarafından gönderilen spesifik sinyaller sonucu bölünür. Büyüme faktörleri hücre bölünmesi üzerinde pozitif etki gösterirken, bazı sitokinlerin hücre bölünmesini engelleyici etkileri bilinmektedir. Belli bir hücrenin

yüzeyinde mevcut olan reseptörler, bu hücrenin hangi faktörlere cevap vereceğini belirlerler (Güneş 1999).

İn vitro koşullarda yapılan çalışmalarda granuloza hücrelerince IGF-1 salındığı bunun da granuloza hücre mitoz aktivasyonunda etkili olduğu tespit edilmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda, büyüme faktörlerinin in vitro maturasyonunda oosit maturasyonunun desteklendiği bildirilmiştir (Buccione ve ark 1990).

Oosit ve kumulus hücreleri arasında büyüme faktörleri ve gen aktivasyonu etkileşiminin oosit fertilize olduktan sonra da devam ettiği düşünülmektedir (Li ve ark 2008).

1.8.1. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

EGF; mitojenik bir potansiyele sahiptir. Hücrelerin çoğunda proliferasyonu uyarır. EGF, proteolitik bir bölünme ürünü olan tirozin kinaz aktivitesi gösteren, bir hücre-yüzey reseptörü ile işlev görmektedir. Bu reseptör aynı zamanda transforming büyüme faktörü alfanın (TGF- α) mitojenik etkisinde de görev yapar (Reizel ve ark 2010).

İn vitro gelişen oositlerin sitoplazmik maturasyonu için pozitif bir sinyalin gerekli olduğu düşünülmüş ve bunun için EGF kullanımı denenmiştir. EGF'nin folikül ve kumulus hücreleriyle çevrelenmiş fare oositlerinde, germinal vezikül dağılması sürecini stimüle ettiği gösterilmiştir (Bulgurcuoğlu ve ark 2003).

Yapılan bir araştırmada, oosit kumulus hücreleri ile birlikte ve kumulus hücreleri olmadan in vitro kültüre edilmiş ve bunlardan kumulus hücresi ile birlikte kültüre edilen oositlerde I. kutup cisimciğinin oluştuğu gözlenmiştir. Bu durumun kumulus hücrelerindeki aktif EGF salgılanışı ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür. Ayrıca granuloza ve kumulus hücrelerinin, EGF ile birlikte diğer büyüme faktörlerini salgıladığı ve bunların da oosit gelişimi için gerekli sinyaller olduğu da bilinmektedir (Das ve ark 1991).

1.8.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF-I, II)

Küçük bir peptid olan insülin, mitojenik etkiye sahip olmakla birlikte, primer olarak glukoz transportunu yürütmektedir. İnsan ve hayvan çalışmalarında IGF ailesinin üyelerinin, oositte, embriyonun erken aşamalarında, dişi üreme kanalındaki sıvıda, epitel hücrelerinde ve endometriyumda eksprese olduğu gösterilmiştir. Temel olarak çeşitli hücre tiplerinde, hücreSEL mayoz ve farklılaşmayla ilgisi bulunmuştur (Hemmings ve ark 1992).

IGF-I'in granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve oositlerin maturasyonuna etki ettiğini belirtmişler ve IGF-I varlığında matur hale getirilen oositlerin bölünme oranlarında ve blastosiste gelişimlerinde önemli bir artış olduğunu saptamışlardır (Pawshe ve ark 1998).

IGF I, II'de FSH etkisi ile kuvvetlenmektedirler. IGF'ler granüloza hücrelerinde gonadotropinlerin etkilerini artırır. IGF'lerin biyolojik aktivitelerinde bağlayıcı proteinlerinde rolü önem taşımaktadır. IGF I'in sistemik dolaşımdan ,IGF II'nin ise lokal olarak granüloza hücrelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Artan IGF I'in etkisi ile; FSH etkisiyle birlikte progesteron ve östrojen sentezi artar, LH reseptörleri artar. Yeterli LH reseptörü oluşunca, LH direkt olarak granüloza hücrelerine etki ederek luteinizasyona ve progesteron yapımına yol açar. İnhibinin LH aktivitesini kuvvetlendirmesi sonucu androjen ve östrojen sentezi artış gösterir (Bulgurcuoğlu ve ark 2003).

1.8.3. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

FGF'lerin orijinal karakterini taşıyan 2 türü önemlidir. FGF1 (asidik FGF, aFGF) ve FGF2 (bazik FGF, bFGF). bFGF ile birlikte, büyüme farklılaşma faktörü (GDF), insan oositlerinin maturasyonu ve embriyonik gelişimden sorumludur. bFGF memeli overyen fonksiyonunun parakrin bir regülatörü olarak gösterilir (Knee ve ark 1994).

İnsan oositlerinde bFGF, mRNA'sının mevcut olduğu granüloza ve kumulus hücrelerinde saptanmıştır. Bununla birlikte erken folikül döneminde oosit tarafından üretilmekte ve esasında primordial folikül gelişimini düzenlemektedir (Nilsson ve ark 2001).

1.8.4. Büyüme Farklılaşma Büyüme Faktörü–9 (GDF–9)

GDF-9, TGF- β ailesinin üyesi olup, over folikül gelişimi için önemli faktörler arasındadır. Farelerde yapılan çalışmalarda tek tabakalı primer foliküllerdeki oositin ovulasyon sırasında GDF-9 mRNA'nın sentezlendiği gösterilmiştir. GDF-9 yetmezliğinde, foliküler gelişimin ileriki aşamalarında belirgin şekilde durdurduğu ve infertiliteye neden olduğu saptanmıştır. GDF-9, in vivo somatik hücre fonksiyonları için ihtiyaç duyulan ilk oosit kaynaklı faktör olarak gösterilmiştir (Pellicer ve ark 2000).

Oosit ya da embriyo kaynaklı büyüme faktörleri, folikül gelişiminin ilk aşamalarından başlayarak oosit matürasyonu, fertilizasyon, erken embriyonal bölünmelerin takip ettiği gelişim ve implantasyon aşamalarında büyüme ve farklılaşmayı direkt ya da indirekt olarak etkiler (McPherron ve Lee 1993).

İn vitro kültürlerde insan embriyolarının gelişimi ve ömrü kültür ortamındaki yetersizliklere bağlı olarak in vivo embriyo gelişimi ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde düşük bulunmuştur (McGrath ve ark 1995).

Günümüzde oosit ve embriyo gelişimi veya matürasyonu için pek çok in vitro maturasyon ve ko-kültür sistemleri geliştirilmiştir. Granüloza, tuba epitelyum hücreleri ve endometriyum stroma hücreleriyle yapılan embriyo gelişimi ile ilgili olarak olumlu sonuçlar alınmıştır.

Birçok in vivo ve in vitro çalışmalar sonucunda oosit ve embriyo gelişimi üzerinde büyüme faktörlerinin etkili olduğu desteklenmiştir (Bulgurcuoğlu ve ark 2003).

1.9. Kök Hücre ve Tanımı

Kök hücre; kendisini yenileyebilme ve farklılaşma yeteneğindeki hücre olarak tanımlanmaktadır. Sahip olduğu bu özellikler nedeniyle de olgun hücrelerde rastlanmayan asimetrik bölünme göstermektedir.

Kök hücrelerin farklılaşma ve güçlü çoğalma yetenekleri kullanılarak; son yirmi beş yıl içinde hücre ve gelişim biyolojisinde, hücresel tedavi alanında ve

genetik hastalık modelleri oluşturmasında büyük başarılar ve önemli bilgiler elde edilmiştir (Demir 2009).

Memeli canlılarının gelişiminde döllenen yumurta hücresi erişkin bir vücutta yer alan 200'den fazla farklı hücre tipine dönüşmektedir. Üstün farklılaşma ve çoğalma yetenekleri sayesinde bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahip bu hücrelerin tek örneği zigot olup totipotent hücre adını alır. Erken embriyonal dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotent kabul edilirler.

Morula aşamasından sonra ilk farklılaşma gerçekleşir. Dışta yer alan ve ileride plasenta katmanını oluşturan trofoblast hücreleri oluşurken iç bölgedeki hücreler farklılaşmakta ve iç hücre yığını oluşturmaktadır. İç hücre kitlesinden elde edilen hücreler endoderm-ektoderm ve mezoderm gibi birçok farklı hücre tipine dönüşme yeteneğindedirler ve bu hücreler pluripotent kök hücreler adını alır (Vats ve ark 2002, O'Shea 2004, Ulloa-Montoya ve ark 2005, Wobus ve Boheler 2005).

Embriyonik kök hücreler pluripotent bir yapıya sahiptirler. Yani endoderm, mezoderm ve ektoderm olarak embriyoyu meydana getiren yaprakları oluşturabilirler.

Gelişimin ilerleyen döneminde buldukları alan ile sınırlı ya da özel bir uyarı ile ancak farklılaşma yetenekli hücreler olan erişkin tipi kök hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler multipotent hücreler olarak kabul edilirler (Henningson ve ark 2003).

1.9.1. Yetişkin Tip Kök Hücreler

Kendini organizmanın yaşamı boyunca yenileyebilen; yetişkin dokulardaki öncül hücrelere değişebilen multipotent hücrelerdir. Sayıları sınırlıdır ve bir şekilde hasarlanan hücrelerin yerinin doldurulmasında görev alarak, dengenin korunmasını sağlamaktadırlar. Tüm vücutta yayılmış olarak bulduklarından elde etmek kolay olmamaktadır (Attar 2004).

1.9.2. Hematopoetik Kök Hücreler (HKH)

HKH; hematopoezin devamlılığı için kendilerini yenileme, miyeloid ve lenfoid kompartmanların progenitörlerini oluşturma yeteneğine sahip, tüm kan hücrelerinin köken aldığı, embriyonal karakterde öncül hücrelerdir.

HKH'lerin vücut dışında stroma veya stromadan yoksun ortamda kısa süreli kültürleri yapılabilmektedir. Kültür sırasında HKH'lerin mitotik aktivitelerini korumalarına rağmen kendini yenileme yeteneğinde azalmaların olduğu belirtilmiştir. İnsan HKH'leri immünolojik ayırıştırma sırasında CD34 ve CD38 yüzey antijenlerinin bulunup bulunmamasına göre ayrılmaktadır (Ulloa- Montoya ve ark 2005).

1.9.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

MKH ilk olarak 1966 yılında Friedenstein ve arkadaşlarının kemik iliği örneklerinin in vitro ortamda fetal sığır serumu katkılı medium ile yapılan kültüründe kültür kabına yapışan hücrelerin, yapışmayan hücrelerden ayrılması ile tanımlanmıştır. Kültür kabına yapışma ve koloni oluşturma kabiliyetinde olan mezenkimal kök hücreler kültür ortamında çoğalma yeteneği yüksek, mezenkimal ve diğer embriyonik tabakalara ait özel hücrelere dönüşme kabiliyetinde olan hücrelerdir. Bu çalışmalar insan MKH'nin tümünün osteojenik özellik gösterdiği, diğer özelliklerinin ise kültür sırasında kaybolduğu bildirilmiştir (Attar 2004).

MKH kemik iliğinin dışında, yağ dokuda, periosteumda, sinovyal zarda, kasta, deride, kıl kökünde, periodontal ligamentlerde, dişte, kılcal damar duvarında, plasentada, göbek kordon kanında ve kanda bulunmaktadır. Dokularda bulunan MKH'lerin görevi tam anlamıyla açıklanamasa da dokuların homeostazında görev aldığı düşünülmektedir (Ulloa-Montoya ve ark 2005).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmamızda, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne Şubat 2009- Şubat 2010 tarihleri arasında infertilite nedeniyle başvuran ve onay veren toplam 30 vaka 2009/073 no.lu etik kurul kararınca seçildi.

Çalışmaya alınmama kriterleri:

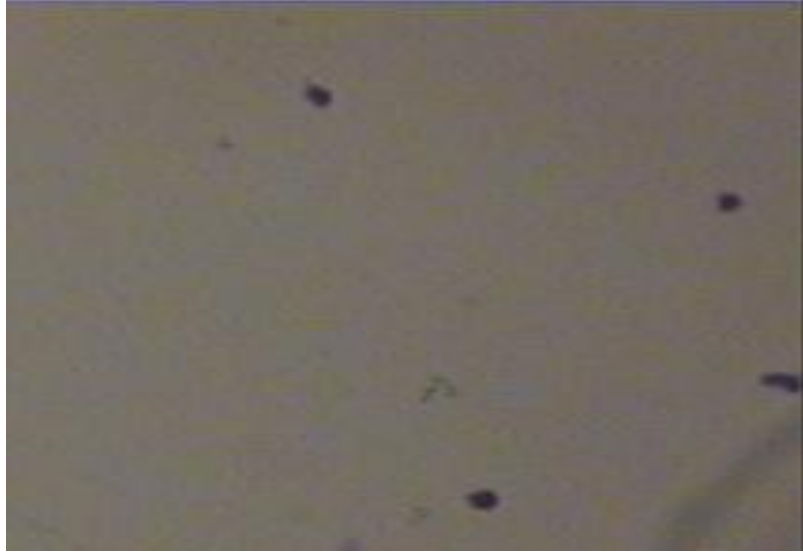
- Hastanın gönüllü olmaması,
- Folikül aspirasyonu sonucunda oositlerin etrafında kumulusun küçük olması,
- İzolasyon işleminde hedeflenen sayıya ulaşamaması,
- Yeterince matür oosit elde edilemeyenler,

Çalışmamıza alınan hastaların hepsine uzun protokol uygulandı. Kısaca agonist tedavisi sonrası recFSH ve /veya human menopausal gonadotropin (hMG) kullanılarak kontrollü ovaryan hiperstimulasyonu kadın doğum kliniği tarafından uygulandı. Foliküler matürasyon monitörize edilerek yeterli boyuta ulaştığı zaman hCG uygulaması ile ovulasyon tetiklendi. Takip eden folikül aspirasyonu ile KOK elde edildi.

Rutin intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) yöntemi ile matür oositlerin fertilizasyonu sağlanmıştır. Semen örnekleri mastürbasyon yöntemiyle, genelde 2-4 günlük cinsel perhiz sonrasında, folikül aspirasyonunun yapılacağı gün merkezimizde toplanmıştır.

Mikroenjeksiyon işlemi öncesinde oositlerin etrafındaki korona-kumulus hücrelerinin temizlenmesi (denudation) gerekir. Bu amaçla hyaluronidaz solüsyonu ve cam Pasteur pipetler kullanılır. Kullanılan hyaluronidaz (Hyase-10X) kumulus ve korona hücrelerini oositin etrafından enzimatik yolla uzaklaştırır. 30 sn'den uzun olmayacak şekilde işleme tabii tutulurlar ve sonrasında yıkama mediumu içeren temiz dropletlere alınırlar. Polar cisimciğin varlığı veya yokluğu ya da germinal vezikül varlığı açısından değerlendirilir.

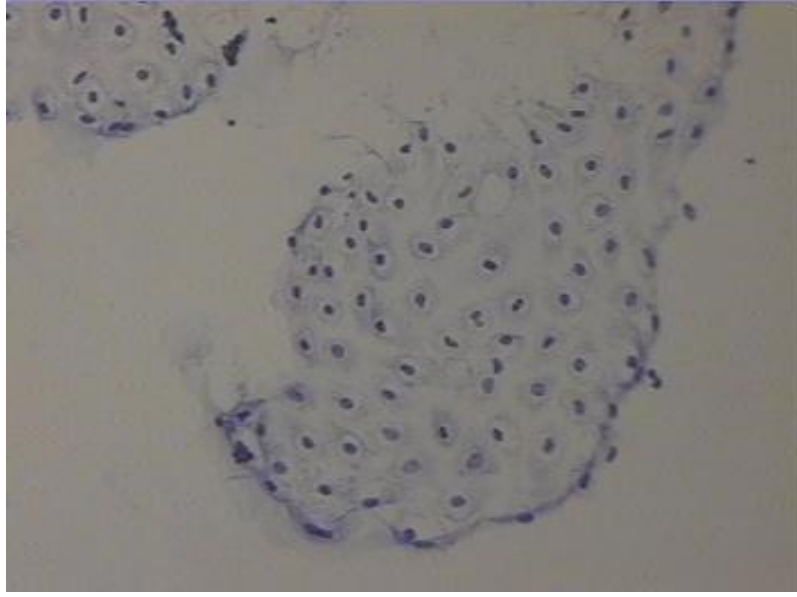
KOK hücreleri içerisinde hiyaz enzimi ve hepes mediumu (Life Global) içeren dropletlerden geçirilerek denuding yapıldı. Tıbbi atık hükmündeki kumulus hücreleri dropletlerden toplandı, 10dk 2000 santrifüjde pellet haline getirildi. Pellet üzerine 500µl alınarak denuding yapıldı. Sayım yapma işleminde örnekten lam üzerine 5µl, alınarak binoküler mikroskop altında (Nikon) objektifte sayımı yapıldı, toluidin boyası (TB) ile boyanıp ve tam saha hücre sayımı yapıldı (Resim 2.1.).



Resim 2.1. TB ile sayımı yapılan kumulus hücrelerinin örneği X 20

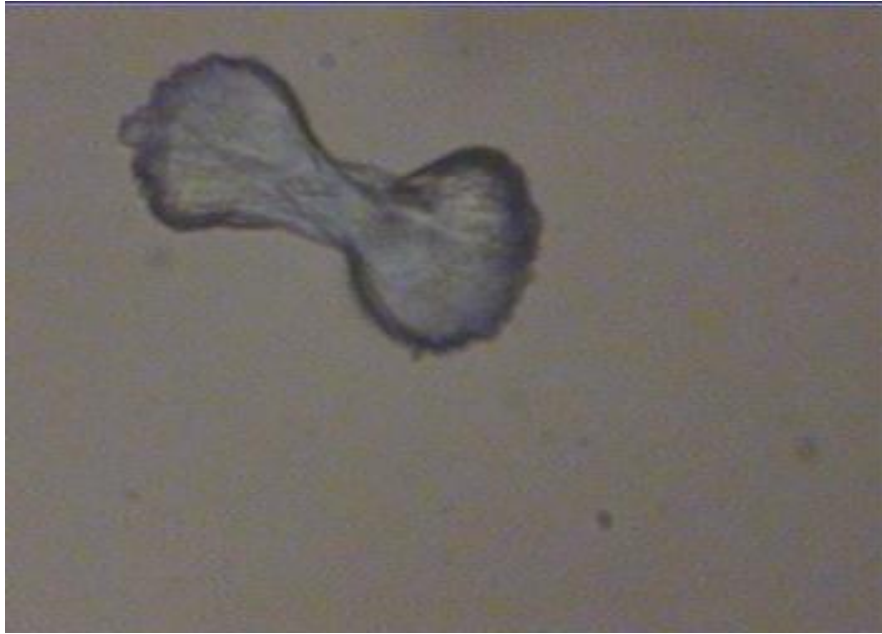
Bu şekilde 5 adet lam lamel örnek hazırlandı. Tüm örneklerin kumulus dağılımının olduğu vakalar çalışmaya alındı. Tüm lamlarda hücrelerin tek tek dağılık olduğu belirlenen vakalar çalışmaya dahil edildi. Çalışmadan dışlanan toluidine blue (TB) boyanmış bir örnek gösterilmektedir (Resim 2.2.)

Daha önce yaptığımız ön çalışma bulgularına göre ekilecek hücre sayısı 1000 olarak belirlendi. Taban alanı $19,625\text{cm}^2$ olan kültür kabına 2cc vasat eşliğinde hücre ekimi yapıldı. Kültür ortamı şartları inkübatör (Nuare %5, 37C°) olarak belirlendi. İnkübasyon 9 gün sürdü, ilk medium değişimi 4. ve ikinci medium değişimi de 7. gün olarak belirlendi ve 9. günde TB boyası ile boyandı ve değerlendirildi.



Resim 2.2. Enzim mekanik hücre ayrışması yapılmadan TB boyası ile hücre kitle görüntüsü X40

Takip sırasında 4. gün invert mikroskopta bakılmış kumulus hücrelerinde mitoz görüntüleri (Resim 2.3.).



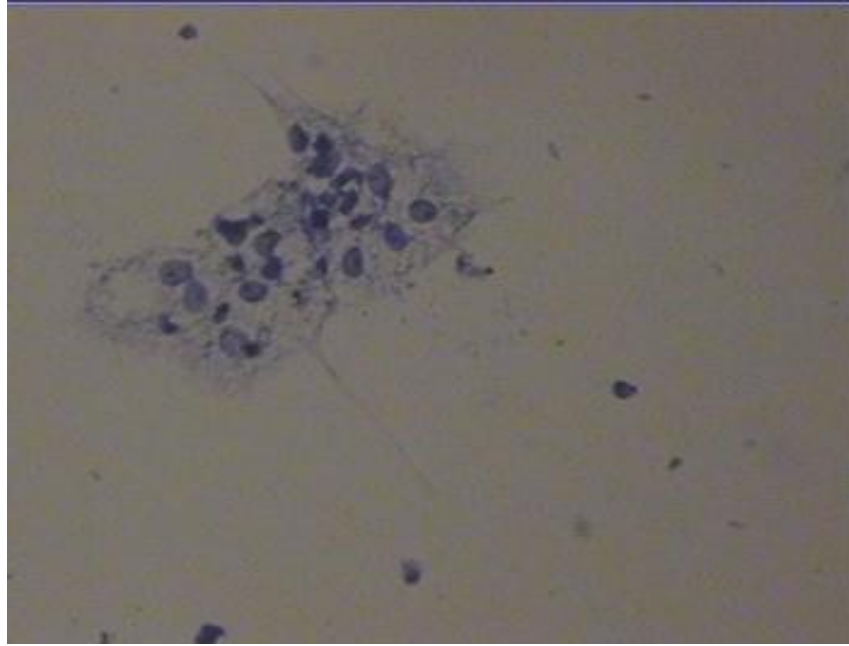
Resim 2.3. Kumulus hücrelerinde TB ile mitoz görüntüsü X40

Boyama işlemi %5'lik hazırlanmış TB ile 3dk süresince boyandıktan sonra distile su (Eczacıbaşı) ile yıkandı. Kuruması için etüvde (Elektro-Mag, 37C°) bekletildi. Kuruduktan sonra parafin oil ile (Life Global) kültür kabının üzeri

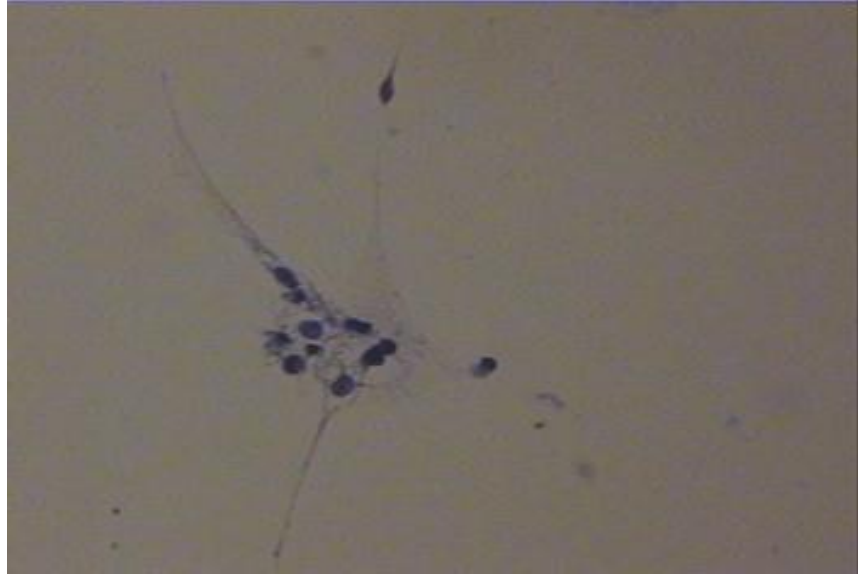
tamamen kapanacak şekilde kapatıldı. Parafin oil ile kapatmamızın amacı görüntü özelliğinin korunması ve kontamine olmasını önlemek içindir. Tüm saha değerlendirmesi yapılarak toplam koloni özelliği ve sayısı belirlendi. Koloniler invert mikroskopta (Nikon, Eclipse TE300) objektifte bakılarak sayıldı. Tablo yapılarak koloniler sınıflandırıldı (Tablo 2.1.)

Tablo 2.1. Mikroskopta koloniler sayılarak A(+10) ,B (6-10), C(3-6) şeklinde sınıflandırma yapıldı.

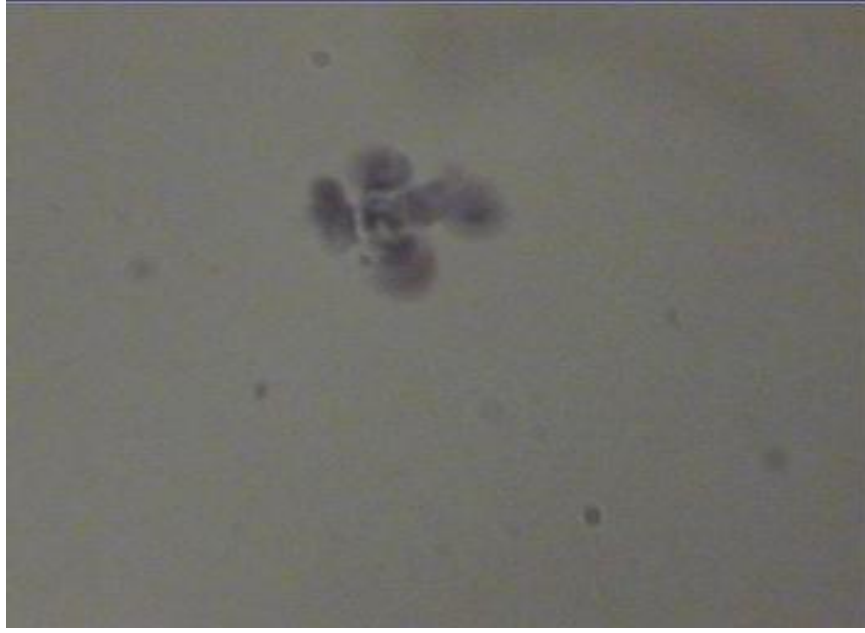
A	+10 fazla hücre sayısına sahip koloni (Resim 2.4.)
B	6-10 hücre sayısına sahip koloni (Resim 2.5.)
C	3-6 hücre sayısına sahip koloni sayısı (Resim 2.6.)



Resim 2.4. 9. gün sonunda TB ile kumulus hücrelerinin oluşturduğu A sınıfı koloni tipi X40



Resim 2.5. 9. gün sonunda TB ile kumulus hücrelerinin oluşturduğu B sınıfı koloni tipi X40



Resim 2.6. 9. gün sonunda TB ile kumulus hücrelerinin oluşturduğu C sınıfı koloni tipi X40

3. BULGULAR

Yaptığımız çalışmada kumulus hücrelerinin kolonojenik özelliği çalışılmıştır. Kriter olarak koloni oluşumunu esas alarak sonuçlar dökümanete edildi.

Kumulus hücrelerinin genel olarak kültürün 9. gününde 3-4'lü, 4-7'li veya daha fazla sayıda küçük koloniler oluşturduğu gözlemlendi.

Kumulus hücrelerinin tek tek kalmış, mitotik aktivite göstermeyen durumlarında küçük çaplı, sitoplazması az, çekirdeğin belirgin morfolojide olduğu gözlemlenmiştir. Koloni oluşturmuş hücrelerde ise sitoplazma daha belirgindir, kitle olarak da daha büyüktür. Bir diğer gözlemimiz de koloninin ortasının küçük hücrelerden, periferinin ise daha büyük hücrelerden oluştuğudur. Sonuçlar tabloda verilmiştir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Koloni Sayısının Yaş, E2 ve Gebelik Durumu ile İlişkisi.

NO	A (+10)	B (6-10)	C (3-6)	Toplam Koloni	YAŞ	E2 (Östradiol)	GEBELİK DURUMU
1			1	1	24	2367	GEBE
2			2	2	24	2367	GEBE
3	1	1		2	31	907	GEBE
4	1	1	2	4	31	907	GEBE
5				0	27	4115	NEGATİF
6	1			1	27	4115	NEGATİF
7		1		1	24	2367	GEBE
8				0	20	1500	GEBE
9		2	1	3	20	1500	GEBE
10		1	4	5	28	3700	GEBE
11	1			1	28	3700	GEBE
12			1	1	20	4115	NEGATİF
13		1	2	3	20	1263	GEBE
14			2	2	33	1400	GEBE
15				0	33	1400	GEBE
16	3	2		5	31	3000	NEGATİF
17	2	3		5	34	1792	NEGATİF
18	2	1		3	35	2818	NEGATİF
19	1	2		3	26	1500	NEGATİF
20		2	2	4	26	1500	NEGATİF
21		3	3	6	28	4115	NEGATİF
22		2	3	5	31	907	GEBE
23	2		4	6	31	907	GEBE
24			1	1	33	851	NEGATİF
25			4	4	31	3000	GEBE
26		2	4	6	25	3890	NEGATİF
27	2	3		5	25	4300	NEGATİF
28		3	4	7	25	4300	NEGATİF
29			5	5	29	1299	GEBE
30			3	3	29	1299	GEBE
(Range)					küçük=20 büyük=35	Az=901 Fazla=4300	

Çalışmada toplam 30 vakada 1000'er hücre ekilimi sonucunda toplam 94 adet koloni oluşumu tespit edildi. Ortalama olarak çalışmada 1000 hücrede-değişik özellikte hücre başına 3.13 koloni oluşumu tespit edildi.

Koloni oluşumu ile hastanın yaşı, E2'si ve gebelik durumu arasında bir bağlantı kurulamadı.

4. TARTIŞMA

Çalışmamız sonunda oosit çevreleyen kumulus hücrelerine ait kolojenik özellikte hücre popülasyonunun varlığı ortaya konulmuştur. 11.11.2010 tarihi itibarıyla pubmed taramasında kumulus hücre popülasyonunda kök hücre varlığına dair makale tespit edilememiştir. Dolayısıyla ilk defa bu popülasyonun varlığı fonksiyonel marker olan koloni oluşumunun gösterilmesiyle ortaya konulmuştur.

Kök hücre tanımlamasının yerine koloni oluşturma kapasitesinin öne çıkarılması daha bilimsel bir ifadedir. Koloni oluşturabilmek kök hücrenin zaten en temel özelliğidir. Bu konu da çalışmamızda Barrandon ve Green'in (1987) deri hücreleri ile ilgili çalışması esas alınmıştır. Literatürde daha önce kumulus hücrelerinin koloni oluşturma özellikleri rapor edilmemiş olduğundan ekim sayısı, ekim yüzey alanı, ekim medium miktarı hakkında uzun bir ön çalışma aşaması gerçekleştirdik. Bu ön çalışma da örneğin 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 1500 hücre ekimleri taban alanı $9,6\text{cm}^2$ ve $19,625\text{cm}^2$ kültür kaplarında denendi. Ayrıca bu parametrelerin 'lag phase' süresini belli etmek için 3. , 5. , 7. , (Resim 4.1.) 9. , 11. , 13. , 15. , günlerinde değerlendirildi. Tez süresinin durumu da göz önüne alınarak lag phasenin 7-9 gün tuttuğu, koloni oluşumu için 1000 hücre seçilmesi gerektiği ve bununla 2cc medyum kullanılarak yapılması kanaatine varıldı ve çalışmamız buna göre devam etti. Barrandon ve Green'in (1987) çalışmasında önerildiği gibi 3 koloni sınıflaması yapıldı ancak mitotik aktivite kumulus hücrelerinde daha düşük olduğundan A,B ve C sınıflamasında toplam hücre sayısını düşük tutmak zorunda kaldık. Barrandon ve Green'in (1987) çalıştığı keratosit hücre popülasyonunun ömrü 150 yıldır. Bizim çalıştığımız kumulus hücre popülasyonu zaten lag phase da (kadın menstrual siklusu düşünüldüğünde) ortadan kalkma özelliğindedir. Ayrıca Brandon ve Green'in (1987) çalıştığı hücreler dairesel koloni oluşturma özelliğindeyken bizim çalıştığımız hücreler yıldızsı ve karışık şekilli geometrik özellik arz ettiği için yüzey alanı ölçümleri yapılmadı.

Yukarıdaki özellikler göz önüne alındığında kolonilerimiz hem küçüktü hem de değişik şekil arz ediyordu. Buna göre A, B ve C sınıflamasına göre sırasıyla 16,30 ve 48 olarak toplam 94 koloni elde edildi.

Buna göre A(+10) sınıfındaki kolonilere holoklon, (en çok üreme kapasitesine sahiptir. Standart koşullar altında bir holoklonun hücrelerinden oluşan kolonilerin %5'inden azı gelişmeyi durdurur ve son olarak farklılaşır.)

B(6-10) sınıfındaki kolonilere meroklon, (değişik büyüme potansiyeline sahip karışık hücrelerden oluşur ve holoklon ile paraklon arasında geçiş evresidir.)

C(3-6) sınıfındaki kolonilere de paraklon (özellikle replikatif yaşam süresi kısa olan hücreler yani 15 hücre jenerasyonundan az olan hücreleri içerir, bu hücreler bu evreden sonra tek tip olarak gelişimini durdurur ve farklılaşır.) (Barrandon ve Green 1986).



Resim 4.1. 7. günde TB ile boyanmış nadir de olsa mitotik figürler gösteren kumulus hücreleri X20

Yaptığımız çalışmada toluidin boyasını kullandık. Aslında bu çalışma da rodamin boyasının kullanılması gerekliydi. Rodamin boyasının toksik olması nedeniyle ve çalışmamızı YÜT laboratuvarında tamamladığımız için tercih edilmedi.

Çalışmada kumulus hücrelerin boyanması sürecinde 3-4 kültür kabında ekimi tamamlanan örnekleri dakika ve boyanın konsantrasyonu bakımından deneyerek %5'lik hazırlanmış TB 3dk boyamanın en iyi sonucu verdiğini gözlemledik. Denemelerimizde ilk olarak 1,5 dakika ve %10'luk TB ile boyadık. Burada hücrelerin yoğun boya görüntüsü ile karşılaştık. Sonra konsantrasyonu azaltıp %5 oranında hazırlayıp 1,5 dakika boyadık ve burada da görüntülerin boyayı alamadığını

gözlemledik. Başka bir denememizde de konsantrasyonu sabit tutup süreyi 3 dakikaya artırarak kumulus hücrelerinin daha iyi boyandığını gördük.

Besleyici ya da yardımcı hücrelerin kültür mediumundaki toksinleri uzaklaştırarak ve büyüme faktörlerini salgılayarak embriyo gelişimini uyardığı bilinmektedir (Quinn ve Margalit 1996).

Folikül aspirasyonu yöntemiyle elde edilen kumulus hücrelerinin interlökin (IL-6), IGF I-II, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) üretimleri in vivo ortamda immunassay yöntemi ile test edilmiş, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin kültürdeki kumulus hücrelerinin apoptozisinin başladığı 10. güne dek tespit edilebildiği bildirilmiştir. Tüm bu gözlemler artmış hücrel aktivite sonucudur. Bu çalışmalar bize kumulus hücreleri arası bağlantıları daha iyi anlama olanağı tanımıştır. Hücre-hücre adezyonunu sağlayan, esansiyel besleyici maddelerin embriyoya transferini kolaylaştıran ve uterin implantasyon için çekici bir yüzey oluşturan bağlantılar gözlenmiştir (Parikh ve ark 2006).

Oosit gelişimi temel olarak büyüme, kapasitasyon ve olgunlaşma olarak üç ana kısımdan oluşur. İlk bölümde oositin çapı 30 μm 'den 120 μm 'ye ulaşır. İkinci aşamada fertilizasyon prosedürünün oluşabilmesi ve daha sonraki embriyonal gelişimi için gerekli faktörlerin oosit içinde biriktirildiği dönemdir. Son aşama ise kromozomal olgunlaşması yani M II dönemine ulaşım gerçekleşir. Bu gelişim sırasında kumulus hücreleri gerekli materyallerin ve faktörlerin sentezlenme görevini üstlenmesi ve dış ortamdan oosite bu maddelerin aktarılmasını sağlaması ile çok önemli rol oynar (Hyttel ve ark 1997).

Kumulus hücreleri ortamda bulunan glukozu, piruvatı veya laktatı metabolize edebilmeleri, oosit olgunlaşması için gerekli çeşitli proteinleri sentezlemeleri ve ortama gerekli faktörleri vermeleri nedeni ile oositlerin olgunlaşmalarında oldukça önemli rol oynarlar. Bu özellikleri de yapılarında yüksek miktarlarda bulunan laktat dehidrogenaz ve benzeri enzimlerin sayesinde gerçekleşmektedir (Cetica ve ark 1999).

Çalışmada kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması ile oositlerinin olgunlaşma dönemlerinde şekillenen aksaklıklar daha sonraki fertilizasyonları ve expanded blastosiste gelişim yeteneklerini azaltmaktadırlar (Birler 1997).

İn vitro embriyo üretim protokolünde yüksek düzeyde başarı sağlamak için gelişim yeteneğine sahip kumulus oosit kompleksleri ile yetersiz gelişim yeteneğine sahip olanları ayırt etmek gerekmektedir. Kısmi ve total kumulus hücre kayıplarının gelişim yeteneğini azalttığı ve çok katlı hücre katmanı bulunan iyi görünümlü KOK'nin yüksek düzeyde gelişim kapasitesi gösteremeyebilecekleri bildirilmiştir (Wit ve ark 2000).

Yapılan çalışmalarda kumulus hücrelerinin özellikle çekirdek maturasyonu ve ileriki gelişme kapasitesi için gerekli olduğu görüldü. Kumulusları temizlenen oositlerde IVM'nun düşük olması gerekli substansların oosite taşınmasının yeterince sağlanamadığını düşündürmektedir (Cincik ve ark 2001).

Memeli kumulus hücreleri oosit büyümesi ve maturasyonu sürecinde önemli rol alır. Ovarian folikül içinde ve ovulasyon zamanında kumulus hücrelerinin oositi beslediği bilinmektedir. Kumulus hücresi ile oosit arasındaki yakın ilişkinin varlığı kumulus hücresinin projeksiyonları ve iç bağlantıların dinamik teması şeklinde olduğu düşünülmektedir. Oosit maturasyonundan sonra oosit ile bağlantılar kesilmesine rağmen kumulus hücreleri arası ilişkiler sabit kalır (Suzuki ve ark 2000).

Oositler üzerine olan etkileri tartışılmakla birlikte yüksek hyaluronidaz konsantrasyonları oositlerin partenogenetik aktivasyonunu uyarmaktadır (Van de Velde ve ark 1997).

Dünya genelinde var olan insan embriyonik kök hücre dizilerine yenilerinin eklenmesi, gelecekte hücrelerin potansiyel hücre terapi aracı olarak kullanılmasına yönelik yapılan *in vitro* ve *in vivo* araştırmalara hız kazandıracaktır. Ayrıca, terapotik klonlamanın teoride alıcı ile verici arasındaki HLA (Human Leukocyte Antigen) uyumsuzluğuna bir çare olabileceği gösterilse de bu sistemin başarı oranının çok düşük, teknik ve biyolojik doğrulamanın eksikliğiyle birlikte etik konuların da halen tartışılıyor olması yaklaşımın yakın gelecekte bir alternatif olamayacağına işaret etmektedir (Fındıklı ve ark 2006).

Bizde yaptığımız çalışmada OPU (Oocyte Pick-Up) esnasında ayıklanıp atılacak olan kumulus, granülosa hücrelerinde kök hücre varlığını tespit ettik. Kök hücrenin bulunmasının yararı ise ileride daha iyi yorumlanıp uygulanmasına sebep olabilir. Yapılan bu çalışmanın hastaya hiçbir riski olmamıştır.

Yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında son 15–20 yılda gelişip klinik seviyede yerini almıştır. Tıp uygulamaları açısından henüz yeni ve gelişme çağındadır. Hastanın tedavisi açısından temel ihtiyaç ve ilaç uygulama standartları belirlenmiş ancak optimal başarı için daha detay çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaçlardan birisi de dişi gamet hücresi oositin gelişimini, kalitesini birebir etkileyen kumulus hücreleridir. Amaç olarak gösterdiğimiz kumulus hücrelerinde kök hücre özellikli hücrelerin araştırılması sonuçları itibariyle kök hücre varlığı saptanmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnfertilite, çiftlerin en az bir yıl süreyle hiçbir kontrasepsiyon yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen çocuk sahibi olamaması durumudur. Üreme çağındaki çiftlerin % 10–15'i infertildir.

İnfertilite tedavisindeki bilimsel ve teknolojik gelişmeler başarı oranlarının giderek artmasını sağlamıştır. YÜT insan üreme hücrelerinin (oosit ve sperm) vücut dışında fertilizasyonu ile embriyo elde edilmesini sağlayan yöntemlerin tümünü kapsar. Çiftlerin çocuk sahibi olabilme rüyalarını gerçekleştirmede gelişen bu teknolojiler önemli rol oynamaktadır.

Çalışma intra sitoplazmik sperm injeksiyonu-embriyo transfer (ICSI-ET) sikluslarında geliştirilen embriyoların kalitesini, implantasyon ve gebelik oranlarını arttırmaya yönelik planlanan çalışmadır.

Yaptığımız çalışmada dişi gamet hücresi etrafındaki kumulus hücreleri hyalüronidaz enzimi ile muamele edilip hyaluranandan arındırıldı. Kumulus hücreleri lam üzerinde tek tek sayılıncaya kadar ependorf tüpte homojenize edildi. Mikroskopta sayıldı ve çıkan sonuç 1000 hücre hedefleyerek kültür kabına ekim yapıldı ve 2 cc one step medium eklendi. 9 gün boyunca etüvde bekletildi. 4. ve 7. günlerde etüvden çıkarılarak mediumlar tazelendi. 9.gün ise kültür kabı %5'lik hazırlanmış toluidine blue 3dk süresince boyandıktan sonra distile su ile yıkandı. Kuruduktan sonra parafin oille kültür kabının üzeri tamamen kapanacak şekilde kapatıldı. Mikroskobik koloniler invert mikroskopta bakılarak sayım yapıldı.

Kolonilere invert mikroskopta baktığımız da 3 tip koloni gözlemlendi. A (+10) yapısındaki koloniler 10 ve daha fazla hücre (genellikle küçük) içerdiği ve bunların koloni çevresinde yoğunlaştığı görüldü. Holoklon yapısında koloni oluşturduğu ve en çok üreme kapasitesine sahip hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. B (6–10) tipindeki koloniler meroklon yapısındaki olup farklı büyüme özelliğine sahip, karışık hücrelerden ibaretti. (Meroklon; paraklon ve holoklon arasında geçiş koloni yapısındadır). C (3–6) koloni tipi paraklon yapısında olup; replikatif yaşamı kısa hücre özelliğine sahip olduğu görüldü.

Literatürde çalışmamız daha önce araştırılmamış bir konu olup dişi gamet hücresi oositin gelişimini, kalitesini birebir etkileyen kumulus hücreleridir. Kumulus hücreleri hücre davranışı olarak koloni oluşturma fonksiyonel marker olarak bilinmektedir. Pubmed taramasına göre kumulus hücreleri için belirlenmiş bir kök hücre popülasyonu bulunmamaktadır.

Buna dayanarak kumulus hücrelerinde kök hücre davranışı ortaya çıkmış ve koloni oluşturma özelliği göstermiştir. Kök hücre popülasyonunun kumulus hücresinde görülmesi ile diğer hücre tiplerinde araştırılması için yol gösterici olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda ileride YÜT'de fertiliteye yardımcı olacağı düşünülebilir.

6. ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kumulus Oosit Kompleksinde Kök Hücre Populasyonunun Araştırılması

“Nihan GÜNASLAN”

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA–2010

Kök hücre farklılaşma ve çoğalabilme yeteneği sayesinde son yıllarda hücre ve gelişim biyolojisinde ve genetik hastalıkların tedavisinde büyük başarılar ve önemli bilgiler elde edilmiştir. Günümüzde temel ve klinik bilgiler düzeyinde yapılan kumulus hücreleri ve kök hücreler çalışması bulunmamaktadır. Literatürde kumulus hücreleri için belirlenmiş bir kök hücre markeri yoktur. Dişi gamet hücresi olan oositin tek başına değil, etrafındaki kumulus hücreleri ile birlikte gelişme gösterdiği bilinmektedir. Kumulus hücresi oositin gelişimini ve kalitesini etkileyen bir hücredir.

Çalışma 30 vaka üzerinde gerçekleştirildi. Mikroenjeksiyon işlemi öncesinde oositlerin etrafındaki korona kumulus hücreleri hyalürinidaz enzimiyle oositin etrafından temizlendi. Lam üzerinde tek tek sayımı yapıldıktan sonra 1000 hücre hedeflenerek kültür kabına 2cc vasat eşliğinde ekimi yapıp inkübatörde bekletildi. 4. ve 7. günlerde mediumları tazelendi. 9. günde ise toluidine blue boyası ile boyanıp parafin oil ile kapatıldı. Kültür kabı invert mikroskop altında değerlendirilip koloniler sayıldı. Ekimin 9. gününde 3-4'lü, 4-7'li veya daha fazla sayıda küçük koloniler oluşturduğu gözlemlendi.

Çıkan sonuçlar elde edilen koloni sayısına göre A (+10), B (6-10), C (3-6) şeklinde sınıflandırıldı. Sırasıyla 16, 30 ve 48 koloni elde edildi. Hastanın E2'si, yaşı ve gebelik durumu ile elde edilen koloniler arasında bir bağlantı kurulamadı.

Bu çalışmanın konusuyla ilgili daha fazla vaka ve ekim süresinin uzatılması ile gözlem yapıp değerlendirilmesi uygun olacaktır. Bu sonuçlar doğrultusunda ileride yardımcı üreme tekniklerinde fertiliteye yardımcı olacağı düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Kumulus hücresi, kök hücre, koloni, kumulus oosit kompleksi

7. SUMMARY

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Searching Stem Cell Population in Cumulus Oocyte Complex

Stem cell poses a high differentiation and proliferation capacity which is important for cell manipulation, cell therapies and applications. Till now on literature there is no any research on stem cell properties of cumulus cells which effects the development quality of oocytes.

Our study is done on 30 patients. Cumulus cells were obtained with hyaluronidase enzyme digestion just before microinjection process. After cell number adjustment 1000 cumulus cells were allocated to culture dish with 2cc medium. On 4. and 7. days culture medium was refreshed. On 9. day the samples were stained with toluidin blue, closed with parafin oil. Colony groups (3-4 cells, 4-7 cells, etc.) was evaluated under inverted microscope.

We grouped our result according to colony properties ('A' for +10, 'B' for 6-10, 'C' as 3-6 cells). We obtained 16, 30 and 48 colonies for A,B and C classification consequently.

We suggest that a higher number of patients with longer duration evaluation seems helpful for a more proper conclusion. Our study is a more precise evaluation of infertility treatments.

Key Words: Cumulus cells, stem cell, colony forming, cumulus oocyte complex

8. KAYNAKLAR

1. Atabekoğlu SC. Oosit maturasyonunun folliküler sıvı hormon parametreleri ile ilişkisi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Uzmanlık Tezi 1998.
2. Attar E. Kk h¼creler ve kordon kanı toplanmasında g¼ncel durum. TJD Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi 2004; 6: 58-64.
3. Auvinen PK, Parkkinen JJ, Johansson RT, Agren UM, Tammi RH, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of hyaluronan in benign and malignant breast lesions. Int J Cancer. 1997; 74: 477-81.
4. Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, Tammi M, Agren U, Johansson R, Hirvikoski P, Eskelinen M, Kosma VM. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. Am J Pathol. 2000; 156: 529-36.
5. Aytekin M, aylak E. Hiyal¼ronan, tanı ve tedavideki nemi. T¼berk¼loz ve Toraks Dergisi 2009; 57: 356-364.
6. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc Natl Acad Sci. 1987 ;84: 2302-2306.
7. Beck WW. The menstrual cycle. In: Beck WW, ed. Obstetrics & Gynaccology. New York: John Wiley Sons 1989.
8. Bono P, Wasenius VM, Heikkilä P, Lundin J, Jackson DG, Joensuu H. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. Clin Cancer Res. 2004; 10: 7144-9.
9. Brecht M, Mayer U, Schlosser E, Prehm P. Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. Biochem J. 1986; 239: 445-50.
10. Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. FSH-induced expansion of the Mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon specific factor (s) secreted by the oocyte. Dev Biol. 1990; 138: 16-25.
11. Bulgurcuoğlu S, zsait B, Atar E. B¼y¼me Faktrlerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerine etkisi. Artemis. 2003; 4: 18-26.

12. Carson RS, Salamonsen LA, Findlay JK. Permeability of rat ovarian follicles to LH development and luteinization. *J Reprod Fertil.* 1986; 76:663-668.
13. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation. *Theriogenolog.* 1999;51:541-50.
14. Cıncık M, Sezen Ş, Özsoy H.M, Küçük Tansu, Korkmaz C. Kumulus hücrelerinin oosit in-vitro maturasyonu üzerine etkileri *T Klin J Med Sci* 2001; 21:161-165.
15. Cihangir N. İntrasitoplazmik spermenjeksiyonu-embriyo transferi sikluslarında otolog-kumulus hücre-oosit komplekslerinin kültür ortamı olarak kullanılmasının embriyo gelişim kalitesine, implantasyon ve gebelik oranlarına etkisinin araştırılması. Konya, Selçuk Üniversitesi Uzmanlık tezi 2009.
16. Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WF, Leung BS. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertility and Sterility.* 1991;55:1000-4.
17. De La Fuente R, J.O'Brien M, Eppig JJ. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum Reprod.* 1999;14:3060-3068.
18. Demir K. Fare embiyonik kök hücre koloni parçalarının açık çekilmiş payet yöntemi ile dondurulması. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doktora Tezi 2009.
19. Demir R. İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi, Ankara Palme Yayıncılık, 1995.
20. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;383: 531-35.
21. Dujikers IJM, Willemsen WNP, Hollanders HMG, Hamilton CJ, Thomas CM, Vemer HM. Follicular fluid hormone concentrations after ovarian stimulation using gonadotropin preparations with different FSH/LH ratios. *Int J Fertil.* 1997;42:306-310.
22. Enien WM, Sahway SE, Haris CP, Seif MW, Elstein M. Human chorionic gonadotropin and steroid concentrations in follicular fluid: the relationship to oocyte maturity and fertilization rates in stimulated and natural in-vitro fertilization cycles. *Human Reproduction.* 1995;10:2840-2844.
23. Erickson GF. Non-gonadotrophic regulation of ovarian function: growth hormone and IGFs. In: Filicori M, Flamigni C, editors. *Ovulation induction: basic science and clinical advances.* International Congress Series. Elsevier, Amsterdam; 1994. p.7384.

24. Fabbri R, Porcu E, Tızıana M, Primavera MR, Cecconi S, Nottola SA, Motta PM, Venturoli S, Flamigni C, Human Embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system .*Journ of Asit Reprod Genetic*.2000; 17:1-12.
25. Fam H, Bryant JT, Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* 2007; 44: 59-74.
26. Fındıklı N, Kahraman S, Akçın O, Candan Z, Sertyel S. İnsan embriyonik kök hücre dizilerinin elde edilmesi, tanımlanması ve farklılaşma potansiyellerinin araştırılması. *J Turkish German Gynecol Assoc*.2005; 6: 210-216.
26. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: Its nature,distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997; 242: 27-33.
27. Gaud PT, Goud AP, Qiqn C, Laverge H, Van der Elst J, Sutter P De, Dhont M. In vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod*. 1998;13:1638-44.
28. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2005;67: 1165-1171.
29. Gliedt DW, Rosenkrans CF, Rorie RW, Rakes JM. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. *J Dairy Sci*.1996; 79: 532-535.
30. Gougeon A, Echiohard R, Thalabard JC. Age related changes of population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early follicles in aging women, *Biol Reprod* 1994; 31: 50- 653.
31. Greve T, Madison V. In vitro fertilization in cattle : a review. *Reprod. Nutr. Dev*. 1991; 31:147-57.
32. Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H, Hyttel P. In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim Reprod Sci*. 1993; 33: 51-69.
33. Grskovic B, Pollaschek C, Mueller MM, Stuhlmeier KM. Expression of hyaluronan synthase genes in umbilical cord blood stem/progenitor cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 890-5.
34. Güneş H. Sitokinlerin hücre döngüsü üzerine etkileri. *Tr J of Biology* 1999;23: 283–292.
35. Hampl A, Eppig JJ. Analysis of the mechanisms of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes *Development* Apr; 1995; 121 (4): 925-33.

36. Hemmings R, Langlais J, Falcone T, Granger L, Miron P, Guyda H. Human embryos produce transforming growth factors – activity and insulin-like growth factor II. *Fertility and Sterility*. 1992; 581:101-4.
37. Henningson CT Jr, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:745-753.
38. Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Shimada M, Wayne CM, Ochsner SA, White L, Richards JS. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process. *Mol Endocrinol*. 2006;20: 1300-21.
39. Hurk R, Bevers MM, Beckers JK. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology*. 1997; 47: 73-82.
40. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 1997; 47: 23-32
41. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida YO, Satoshi M, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999; 274: 25085- 92.
42. Iwai T, Nanbu Y, Iwai M, Taii S, Fujii S, Mori T. Immunohistochemical localization of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1990; 417: 369–75.
43. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. In: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışalı B, ed. 8. Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi, 1998.
44. Kalaycı Ş. Histoloji, Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986.
45. Kaneko T, Saito H, Taya M, Saito T, Nakahara K, Hiroi M. Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44. *J Assist Reprod Genet*. 2000;17: 162-167.
46. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 9. Baskı, Hacettepe-Taş 2000.
47. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem*. 1995;58:175-80.
48. Knee RS, Pitcher SE, Murphy PR. Basic fibroblast growth factor sense (FGF) and antisense (GFG) RNA transcripts are expressed in unfertilized human oocytes and in differentiated adult tissues. *Biochem Biophys Res Comm*. 1994;205: 577-83.

49. Koyabashi T, Oda T, Yoshimura Y, Takehara Y, Natori M and Nozawa S. Androstenedione and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with successful fertilization and cleavage of human oocytes in vitro. *Fertility and Sterility* 1991; 56:301-305.
50. Lammich S, Okochi M, Takeda M, Kaether C, Capell A, Zimmer AK, Edbauer D, Walter J, Steiner H, Haass C. Presenilin dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an alike peptide. *J Biol Chem* 2002; 277:44754-9.
51. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *Faseb J* 1992;6:2397-404.
52. Leeson TS, Leeson CR, Poparo AA. *Text/ Atlas Histology*. W.B Company. Harcourt Brace Jovanovich, 1988.
53. Li HK, Kuo TY, Yang HS, Chen LR, Li SS, Huang HW. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Anim.Reprod Sci.* 2008;103:312-22.
54. Lindner Ch, Lichtenberg V, Westhof G, Braendle W, and Bettendorff G. Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. *Horm Metob Res.* 1988; 20: 243-246.
55. Lopata A. The fertilizability of human oocytes at different stages of meiotic maturation *Ann NY Acad Sc: USA*, 1988; 541:324-36.
56. Macun HC. Sığır oositlerinin in vitro maturasyonuna follikül uyarıcı hormon ve insan menopozal gonadotropini'nin etkisi. Ankara, Uzmanlık tezi 2004.
57. Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL. Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 1991;35: 3750-52.
58. McGrath SA, Esquelo AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol.* 1995; 9:131-6.
59. McNatty KP, Makris A, Degrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. The production of progesterone, androgens oestrogens by human granulosa cells in vitro and in vivo. *J.Steroid Biochem.* 1979 11;775-779.
60. McNatty KP, Smith DM, Makris A, Rapin O, Ryan KJ. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin. Endocrinol Metab.* 1979; 49:851-855.

61. McNatty KP, Markris A, Degrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. Steroidogenesis by recombined follicular cells from the human ovary in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980 51; 1286-1285.
62. McPherron AC, Lee SJ. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem.* 1993;268(5): 3444-9.
63. Misra S, Ghatak S, Toole BP. Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase and ErbB2. *J Biolhem.* 2005; 280: 20310-20315.
64. Mlynarcikova A, Nagyova E, Fickova M, Scsukova S. Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol In Vitro* 2008;23:317-7.
65. Nazikoğlu A, Çakar NA. CD44 ve organizmadaki CD44 bağımlı oluşumlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2006; 37:142-148.
66. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;175:123-30.
67. O'Shea K.S. Self renewal vs. Differentiation of mouse embryonic stemcells. *Biology of Reproduction.*2004;71: 1755-1765.
68. Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter Temel Histoloji.*In: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P,ed. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri,2009.
69. Parikh FR, Nadkarni SG, Naik NJ, Naik DJ, Uttamchandani SA, Cumulus coculture and cumulus aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* .2006; 86 :839-47.
70. Pawshe CH, Appa Rao KBC, Totey SM. Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotrophins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation and biosynthetic activity of cumulus cells and granulosa cells in buffalo. *Molecular Reproduction and Development* 1998;49: 277-85.
71. Pellicer A, Albert C, Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J Reprod Fertil Suppl.* 2000;15:173-88.
72. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:33-45.
73. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet.*1996;13:9 –14.

74. Reizel Y, Elbaz J, Dekel N. Sustained activity of the EGF receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. *Mol Endocrinol.*2010; 24: 402-11.
75. Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 289–312.
76. Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, 2007;13: 289–312.
77. Russell DL, Salustri A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med* 2006;24:217–227.
78. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*, 8. Edition, Lippincott Williams & Wilkins. 2000.
79. Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Saito T, Hiroi M. Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. *Fertil Steril.* 2000;74:1148-1152.
80. Salha O, Nugent D, Dada T, Kaufmann S, Levett S, Jenner L, Luis, Sharma V. The relationship between follicular fluid aspirate volume and oocyte maturity in in-vitro fertilization cycles. *Hum Reprod.* 1998;123: 1901-6.
81. Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 1992; 151:541-551.
82. Sato E, Miyamoto H, Kaide SS. Hyaluronic acid-like substance from mouse ovaries with angiogenic activity. *Z Naturforsch C.*1990; 45:873-80.
83. Sirard MA, Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod. Sci.* 1996 ;42:417-426.
84. Soom AV, Kruif AD. Oocyte maturation, sperm capacitation and preimplantation development in the bovine: Implications for in vitro production of embryos. *Reprod Dom Anim.* 1996;31:687-701.
85. Suzuki H, Jeong BS, Yang X. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod.* 2000;63:723.
86. Toole BP. Hyaluronan : From extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:528-539.
87. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2005;100: 12-27.
88. Van de Velde H, Nagy ZP, Joris H, De Vos A, Van Steirteghem AC. Effects of different hyaluronidase concentrations and mechanical procedures for cumulus cell removal on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.*1997;12: 2246–50.

89. Voss AK, Fortune JE . Oxytocin secretion by bovine granulosa cells: Effects of stage of follicular development, gonadotropins, and co-culture with theca interna. *Endocrinology* 1991,128 :1991-1999.
90. Wit de AA, Wurth YA, Kruip TA. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci.* 2000;78: 1277–83.
91. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev.*2005; 85: 635–678.
92. Young EL, Baird DT, Hillier SG. Mediation of gonadotropin-stimulated and differentiation of human granulosa cells by adenosine 3'5'- monophosphate:one molecule, two messages. *Clin Endocrinol.*1992; 37: 51-55.
93. Younis AI, Brackett BG, Fayrer HRA. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gametes Res.*1989;23: 189-201.

9. EKLER

EK.A: Etik Kurul Onay Formu

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ETİK KURUL KARARLARI

Toplantı Sayısı: 02	Toplantı Tarihi: 27-02-2009
----------------------------	------------------------------------

Karar Sayısı:2009/073;Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. T.Murad AKTAN'ın "Kumulus Oosit Kompleksinde Kök Hücre Populasyonunun Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 23.02.2009 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü; yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. T.Murad AKTAN'ın sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR
27-02-2009

Şazer BİLGİN
Fakülte Sekreteri

EK. B: Bilgilendirilmiş Onay Formu

Aşağıdaki konularda hastaya gerekli tüm bilgiler verilmelidir. Hazırlanacak olan HASTA ONAM FORMUNUZ ayrıntılı olarak aşağıdaki sıralamaya ve çalışmamızın niteliğine uygun bir şekilde hazırlanarak çalışma dosyanıza konulacaktır.

- a-** Çalışmanın amacı yumurta toplama işlemi (OPU) esnasında ayıklanıp atılacak olan kumulus, granüloza hücreleri içerisinde kök hücre varlığını araştırmaktır. Yöntemimizde size ait tıbbi atık durumundaki materyal kullanılacaktır. Eğer hedeflediğimiz hücre grubu varsa bunun yararı kısırlık tedavisinin ileride daha iyi yorumlanıp uygulanmasına sebep olabilir. Hastaya hiçbir riskimiz yoktur.
- b-** Çalışmamızın mevcut tedaviniz ile bir ilgisi yoktur.
- c-** Çalışmamız vaka başına 5-21 gün süre tutacaktır.
- d-** Çalışmamızda vakaya herhangi bir mali yük getirmeyecektir.
- e-** Çalışmamızda vaka hakkında kişisel bilgiler bir başkası ile paylaşılmayacaktır.
- f-** Çalışmamız şahsınıza hiçbir zarar vermeyecektir.
- g-** Çalışmamızda hedeflenen gönüllü sayısı 30'dur.
- h-** Çalışma ile ilgili başvurulabilecek doktor; Doç.Dr. T. Murad AKTAN, 2236731 nolu telefonla ulaşılabilmektedir.
- i-** Araştırmacı çalışılan kültür şartlarında oluşabilecek bir sorun sebebi ile araştırma dışı bırakılabilir.
- j-** Çalışmaya katılan gönüllü, istediği herhangi bir zamanda ayrılıp vazgeçme hakkına sahiptir.
- k-** Çalışmamızda kullanılacak materyal evli çiftten sadece bayan eşe ait ve gebelikle ilişkisi bulunmayan bir biyolojik yapıdır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

TARİH:

Gönüllünün Adı Soyadı,İmzası, Adresi (varsa telefon/faks no.)

Açıklamaları yapan araştırıcının Adı soyadı,İmzası

Nihan GÜNASLAN

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı,soyadı, imzası (varsa telefon/faks no)

Doç.Dr. T. Murad AKTAN

Tel: 0537 960 96 94

Rıza alma işleminde başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin Adı soyadı,

Ayten ŞAHİN (Hemşire)

10. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılı Diyarbakır doğumludur. İlköğrenimini 1995 yılında Ankara Dr. Reşit Galip İlkokulu'nda tamamladıktan sonra ortaokul eğitimini Ankara G.O. P ilköğretim okulunda ve lise eğitimini 2001 yılında Ankara 50.Yıl Lisesinde tamamlamıştır. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun olduktan sonra 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'da yüksek lisans eğitimine başlamıştır.