

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA TEK TARAFLI OOFOREKTOMİ
SONRASI KALAN OVERDE FOLLİKÜL
DİNAMİĞİ VE APOPTOZ'UN İNCELENMESİ**

DR YUNUS AYDIN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA TEK TARAFLI OOFOREKTOMİ
SONRASI KALAN OVERDE FOLLİKÜL
DİNAMIĞI VE APOPTOZ'UN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR YUNUS AYDIN

Danışman öğretim üyesi
Prof Dr Murat Celiloğlu

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2006.KB.SAĞ.012
sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET.....	1
İNGİLİZCE İSİM VE ÖZET	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2.GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 İnsan ovarian folliküler dinamiği.....	7
2.1.1 Pre-antral folükül popülasyonu.....	8
2.1.2 Folliküler gelişimin başlaması.....	11
2.1.3 Preantral büyüme evresi veya bazal folüküler büyüme.....	11
2.1.4 Tonik büyüme evresi.....	12
2.1.5 Hızlı büyüme evresi.....	13
2.2 Oosit –Folükül gelişim kontrolü.....	14
2.2.1 Granuloza hücresi....Oosit gelişimi kontrolü.....	15
2.2.2 Oosit...granuloza hücre fonksiyon kontrolü.....	15
2.3 Apoptoz	15
2.3.1 Mitokondri ve Bcl-2 ailesi.....	16
2.3.2 Ölüm reseptörleri ve ligandları	17
2.3.4 Kaspazlar.....	17
2.3.5 Apoptoz kaskad	18
2.3.6 Oositlerde apoptoz.....	19
2.4 Stem cell.....	20
2.4.1 Embriyonik stem cell	21
2.4.2 Somatik (adult) stem cell.....	23
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	25
3.1 Deney hayvanları.....	26
3.2 Follikül dinamiği'nin incelenmesi.....	27
3.3 İstatistiksel Analiz.....	28

4.BULGULAR.....	29
4.1 Grup A.....	30
4.2 Grup B.....	32
4.3 Grup C.....	34
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
6.KAYNAKLAR.....	44

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Ovarian folüküllerin morfolojik klasifikasyonu (Gougeon, 1996).....	10
Tablo 4.1	Grup A'da yer alan (n:7) sıçanlarda primordial-primer-growing follikül gruplarındaki normal, atretik ve total follikül sayıları ile apoptotik index ortalamaları.....	31
Tablo 4.2	Grup B'de yer alan sıçanlarda primordial-primer-growing folükül gruplarındaki normal, atretik ve total folükül sayıları ile apoptotik index ortalamaları.....	33
Tablo 4.3	Grup C'de yer alan sıçanlarda primordial-primer-growing follikül gruplarındaki normal, atretik ve total follikül sayıları ile apoptotik indeks ortalamaları.....	35

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1 Fetal dönemde maximum 7 milyon'a ulaşabilen germ hücreler fetal dönemde başlayan oosit apoptoz'u ve doğumdan itibaren menopoz'a dek süren granuloza hücre apoptoz- folliküler atrezi ile tükenenlerdir7
- Şekil 2.2 Overdeki foliküllerin gelişimi.....9
- Şekil 2.3 Klas 1'den klas 8'e dek tam büyüme şeması, Gn, Gonadotropin.....12
- Şekil 2.4 Çift yönlü follikül gelişim kontrolü.....14
- Şekil 2.5 Apoptosis'in çok basamaklı kontrolü.....19
- Şekil 2.6 İnsan embriyonik stem cell elde edilmesi.....22
- Şekil 2.7 Embriyonik stem cell'in özellikleri.....22
- Şekil 2.8 Kemik iliği kaynaklı stem cell gruplarından farklılaşma.....24
- Şekil 2.9 Somatik stem cell plastisitesi (kemik iliğinden farklı dokulardaki matür hücrelere dönüşüm).....25
- Şekil 4.1 A)Çift uçlu ok ile primordial follikül grubu (yassı granuloza hücreleriyle çevrelenmiş folliküller) ve kesik çizgili oklar ile primer folliküller (kübük granuloza hücreleriyle çevrili folliküller) işaretlenmiştir (Hematoxyline-eosine[HE] boyanmış kesit x400). B) Çift sıra granuloza hücresi ile çevrili sağlıklı görünümlü sekonder follikül (HE, X400). C) Growing-klas 2 follikül. Antrum oluşumu başlamıştır (HE, X200). D) Atretikbir growing follikül'de apoptotik body'lerin düz çizgili ok ile gösterimi (HE, X400).29

Şekil 4.2	Grup A’da yer alan sıçanlarda primordial-primer-growing follikül gruplarındaki total follikül sayıları ile apoptotik index ortalamaları.....	31
Şekil 4.3	Grup B’de yer alan sıçanlarda primordial-primer-growing follikül gruplarındaki total follikül sayıları ile apoptotik indeks ortalamaları.....	33
Şekil 4.4	Grup C’de yer alan sıçanlarda primordial-primer-growing follikül gruplarındaki total follikül sayıları ile apoptotik index ortalamaları.....	35
Şekil 4.5	A-B-C grubundaki sıçanlarda kontrol ve çalışma overlerindeki <i>primordial folliküllerin</i> sayısal değişimi.....	36
Şekil 4.6	A-B-C grubundaki sıçanlarda kontrol ve çalışma overlerindeki <i>primer folliküllerin</i> sayısal değişimi.....	36
Şekil 4.7:	A-B-C grubundaki sıçanlarda kontrol ve çalışma overlerindeki <i>atretik growing</i> ve <i>toplam growing folliküllerin</i> sayısal gösterilmesi.....	37
Şekil 4.8	A-B-C grubundaki sıçanlarda kontrol ve çalışma overlerinde <i>atretik growing/toplam growing follikül</i> oranı.....	37

TEŞEKKÜR

Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimleri ile bu alanda yetişmemde katkı sahibi olan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent Gülekli Hocam başta olmak üzere; Prof. Dr. Oktay Erten, Prof. Dr. Ata Önvural, Prof. Dr. Berrin Acar, Prof. Dr. Namık Demir, Prof. Dr. Turhan Uslu, Prof. Dr. Cemal Posacı, Prof. Dr. Yakup Erata, Doç. Dr. Uğur Saygılı, Doç. Dr. Sabahattin Altunyurt, Doç. Dr. Serkan Güçlü, Doç. Dr. Erbil Doğan, Öğr. Gör. Uzm. Dr. Bahadır Saatli ve Öğr. Gör. Uzm. Dr. Emre Okyay Hocalarıma teşekkür ederim.

Bu tez projesi'nin hazırlanmasında emeği geçen, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerinden Prof. Dr. Meral Koyuncuoğlu ve Doç.Dr. Çağnur Ulukuş'a ve ayrıca Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlu Öğretim Üyesi Prof.Dr. Osman Yılmaz'a teşekkür ederim.

Ayrıca; asistanlık dönemi boyunca desteğini sürekli hissettiğim ve bu tez projesi'nin başlayışından bitişine dek heran birlikte çalıştığımız Sayın Hocam Prof. Dr. Murat Celiloğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Yunus Aydın

Son olarak; bana hep destek olan Eşim Ayşen Aydın, Oğlum Emir Emre Aydın ve Aileme sonsuz teşekkürler.....

Yunus Aydın

ÖZET

Günümüze dek over fiziyojisi ve follikül dinamiği üzerine yapılan incelemeler; dişi memeli overi'nin doğumdan itibaren sabit germ hücre havuzuna sahip olduğu fikri etrafında yürütölmüştür. Üreme biyojisi'nin temel doktrinlerinden birisi olarak kabul edilen bu düşünceye göre; sınırlı sayıdaki primordial folliküller, ovulasyon veya atreziye gidiş yoluyla tükenmektedir. Bugüne dek tek taraflı ooforektomi deney düzeneği ile yapılmış çalışmalarda, tek taraflı ooforektomiyi takiben gerçekleştiği düşünölen ovarian kompanzasyonun net mekanizması açıklanamamıştır. Bu çalışmaların hepsinde sabit follikül rezervi fikri'ni baz almışlardır. Ancak son birkaç yılda yapılan bazı hayvan deneyleri sonucunda indirekt olarak yeni oosit-primordial follikül oluşumu saptandı. Bu nedenle follikül rezervi'nin sınırlı olmadığı ve ovarian-ekstraovarian kaynaklı germ stem cell olabileceği düşünöldü.

Biz de kurduğumuz deney düzeneği ile tek taraflı ooforektomi sonrası morfolojik olarak follikül dinamiği ve apoptoz'u değerlendirdik. Amacımız, tek taraflı ooforektomi sonrası sadece ovarian kompanzasyonun mu yoksa ek bir oosit üretim kaynağının mı aktif olduğunu değerlendirmektir.

Tek taraflı ooforektomi'nin kısa, orta ve uzun dönem etkilerini değerlendirmek için çalışma 3 ayrı grup sıçanda planlandı ve *Grup A*(n:7): Çalışmanın 7. gününde relaparotomi ile kalan overin çıkartıldığı grup, *Grup B*(n:8): Çalışmanın 14. gününde relaparotomi ile kalan overin çıkartıldığı grup, *Grup C*(n:8): Çalışmanın 42. gününde relaparotomi ile kalan overin çıkartıldığı grup. Tüm sıçanlarda 0.günde alınan over, aynı sıçan için kontrol overi olarak kullanıldı ve iki over arasında; morfolojik olarak primordial follikül, primer follikül, growing follikül sayısal değişimi ve apoptotik indeks farklılığı araştırıldı.

Oluşturduğumuz her 3 grupta da primordial-primer follikül sayılarında (rezerv follikül grubu) ve apoptotik indekslerinde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. Growing follikül sayısı ise her 3 grupta da arttı. Rezerv folliküllerin sayısında çalışma ve kontrol overleri arasında geçen zamana rağmen anlamlı bir azalma saptanmaması ve aynı zamanda cohort'a katılan follikülleri temsil eden growing follikül sayısı'nın 3 grupta da anlamlı olarak artması ilginçtir. Eğer sadece ovarian kompanzasyon gelişmiş olsaydı; en azından rezerv folliküllerin azalmasını yada folliküler statik yaşam süresinin artması ve atrezinin azalması nedeniyle atretik folliküllerin azalmasını beklerdik.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında; tek taraflı ooforektomi sonrası yeni follikül üretimi olduğunu ve bunun da en olası kaynağı'nın direkt olarak gösterilememiş olsada, germ stem cell (ovaryan veya ekstraovaryan kaynaklı) olduğunu düşünmekteyiz.

INVESTIGATION OF FOLLICULAR DYNAMICS AND APOPTOSIS IN THE REMAINING OVARY FOLLOWING UNILATERAL OOPHORECTOMY IN RATS

SUMMARY

Until today, the studies about ovarian physiology and follicular dynamics have been based on the assumption that the female mammal ovary, as from the birth, has a constant germ cell pool. According to this idea, which is accepted as one of the main doctrines of reproduction biology, primordial follicles, which are limited in number, are depleted through ovulation or atresia. Until now, the exact mechanism of ovarian compensation, which is thought to occur following unilateral oophorectomy, could not be explained in the studies using an experimental set-up based on unilateral oophorectomy. All of those studies were based on the idea of fixed follicular reserve. However, some animal experiments conducted in the recent years have indirectly determined the production of new oocytes and primordial follicles. Thus, the results of these studies have shown that follicle reserve is not limited and suggested the presence of germ stem cells of ovarian or extraovarian origin.

Accordingly, following unilateral oophorectomy, we evaluated follicle dynamics and apoptosis morphologically by using our experimental setup. Our aim was to determine whether ovarian compensation was active alone or accompanied by a source of oocyte production.

In order to evaluate the short-, mid-, and long term effects of unilateral oophorectomy, three rat groups were included in the study. These groups were Group A (n=7), of which the remaining ovaries were removed via relaparotomy on the 7th day of the study, Group B (n=8), of which the remaining ovaries were removed via relaparotomy on the 14th day of the study and Group C (n=8), of which the remaining ovaries were removed via relaparotomy on the 42nd day of the study. The ovaries removed from each rat on day 0 were used as control ovaries and the changes in the number of primordial, primary and growing follicles and the difference in apoptotic index were investigated morphologically.

In all three groups that we formed, significant differences were not observed in the number of primordial and primary follicles and apoptotic index. On the other hand, it was found that there was an increase in the number of growing follicles in all three groups. It is striking that in spite of the time elapsed, a significant decrease was not determined between the study and control ovaries in terms of the number of reserve follicles. Additionally, another

interesting finding was the significant increase in the number of growing follicles, which represented the follicles that joined the cohort. If only ovarian compensation had developed, we would have at least expected a decrease in the number of reserve follicles or a decrease in the atretic follicles due to the increased length of the static phase and the decrease in atresia.

In light of the findings that we obtained, we think that production of new follicles took place after unilateral oophorectomy and its most likely source, although not directly shown, were germ stem cells (of ovarian or extraovarian origin).

Bölüm 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Birçok memeli türünün erkek bireylerinde primordiyal germ stem hücreleri bireyin yaşamı boyunca baki kalır, dişi bireyler için ise aynı durum söz konusu değildir. Kadın üreme sistemi ile ilgili 1951 yılında Zuckerman tarafından sınırları net olarak belirlenmiş ve o tarihten 2004 yılına dek tartışılmayacak derecede kabul görmüş bilimsel doktrin'e göre; dişi memeliler bölünebilme özelliği olmayan ve aynı zamanda 1. mayoz bölünmede beklemede kalmış sınırlı sayıdaki germ hücre popülasyonu (oositler) ile doğmaktadırlar (1-4).

İnsanda oositler postnatal dönemde apoptoz nedeniyle, artan bir ivme ile azalır ve 5. dekatta rezervin tükenmesiyle birlikte menopozal süreç başlar. Dişi memelilerde söz konusu olan sınırlı sayıdaki germ hücre varlığı, stem cell çalışmalarında kullanılan *Drosophila melanogaster*'de dahil birçok omurgasız organizmada farklıdır; bu canlıların erişkin overlerinde oosit yapımını devam ettiren germ stem cell varlığı direkt olarak gösterilmiştir (5-7).

İlk olarak 2004 yılında Johnson ve ark. tarafından fareler üzerinde yapılan bir deneysel çalışma sonucu; yeni oosit ve follikül gelişimine neden olabilecek proliferasyon olabilen germ hücrelerin varolabileceğini düşünülmeye başlandı (8).

Over biyolojisi ve dinamiği üzerine devrim yaratabilecek 'postnatal overde sürekli oosit yapımını sağlayabilecek germ stem cell varlığı' fikriyle son 3 yıldır Johnson ve ark ile birlikte birçok merkez sınırlı sayıda germ hücresi doktrini'ni sorgulamak üzere araştırmalara başlamıştır. Güncel çalışmalar ışığında direkt olarak germ stem cell varlığı henüz gösterilememiş olup indirekt bulgular ile stem cell varlığı desteklenmektedir (8,9).

Unilateral ooforektomi'nin etkilerini hormonal ve fertilité açısından inceleyen çalışmalarda tek taraflı ooforektomiyi takiben fertilitenin ve hormonal dengenin azalmadığı saptanmıştır. Bazı araştırmacılar bunun FSH yüksekliğine ikincil (10), bazıları da sinir sistemindeki etkileşim ile oluştuğunu düşünmektedirler (11).

Germ stem cell varlığına ilişkin ümit verici son bilgiler dahilinde, sıçanlarda tek taraflı ooforektomi sonrasında kalan overde follikül sayısındaki değişimi incelemeyi planladık. Eğer follikül sayısında artış olursa bu gerçekten stem cell varlığı ile yerine koyma şeklinde olabilir

yada folliküler apoptoz ve dolayısı ile atrezinin azalması ve kompanzatuvar mekanizma ile follikül sayısının sabit kalması şeklinde olabilir.

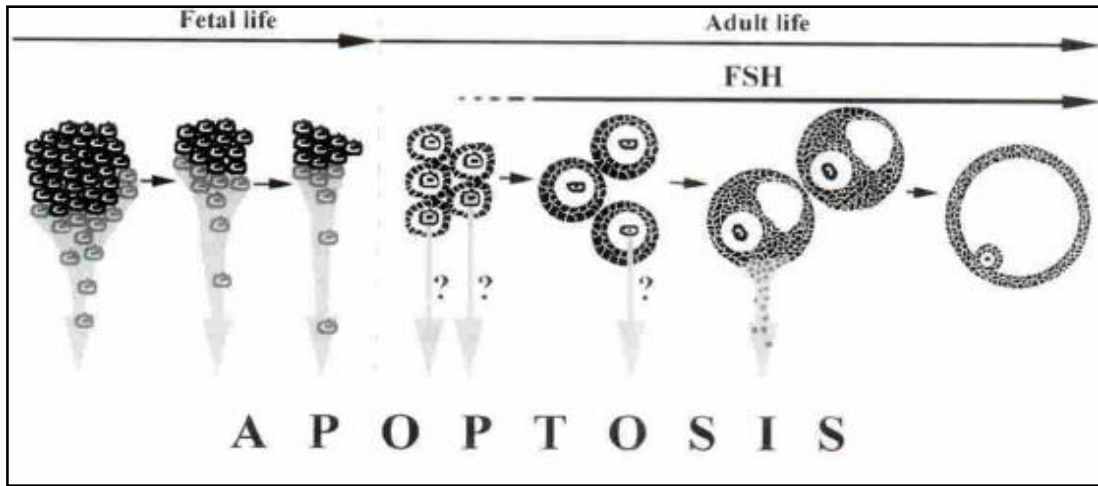
Bölüm 2

GENEL BİLGİLER

2.1 İnsan ovarian folliküler dinamiği

Primordial germ hücreleri ekstraembriyonik epiblast hücre öncüllerinden köken alırlar, ve yolk sak duvarı üzerinde göç ederek fertilizasyonu takiben 5–6. haftada gelişmekte olan gonadlara (genital tüberkül) yerleşirler (12,13). Germ hücre göçünde; C-kit proto-onkogen tarafından kodlanan transmembran tyrosine kinase reseptörü, C-kit, önemli rol alır (14,15).

Germ hücrelerindeki mitoz ile sayı artışı göç esnasında başlar ve 16–20.haftada maksimum rakama, 6–7 milyon oogoniaya, ulaşılır. Oogoniaların ulaşmasını takiben germ hücre kaybı başlar ve bu süreç artık menopoza kadar devam edecektir (figür 2.1). Oogonial artış ile oositlere dönüş döneminde maximum hücre kaybı olacak ve yaklaşık %70 germ hücre apoptoz ile kaybedilecektir (16,17).



Şekil 2.1: Fetal dönemde maximum 7 milyon'a ulaşabilen germ hücreler fetal dönemde başlayan oosit apoptoz'u ve doğumdan itibaren menopoza dek süren granuloza hücre apoptoz- folliküler atrezi ile tükenenlerdir (18).

İlk olarak 11-12.haftada başlayan mayoz bölünme ile oogoniyalar oositler'e dönüşürler ancak bu bölünme ovulasyona dek profaz I – diploten evrede bloke olur ve yalnızca ovulasyon ile birlikte 1.mayoz bölünme tamamlanabilir (18). Artık doğuma dek, bütün oogoniyalar profaz I-diploten evrede beklemek üzere oositlere dönüşeceklerdir (19).

Mayoz bölünmeye başlamış olan oositler'in hayatta kalabilmesi somatik hücreler ile ilişki kurabilmelerine bağlıdır (19). 18-20.haftada medüller alandan köken alan damarsal yapılar gonadal korteks'e invaze olurlar ve primer kökeni net olarak bilinmeyen (mezenkimal veya çöломik epitel) perivasküler pre-granuloza hücrelerini, kortikal alana taşırlar . Bu hücreler profaz-I diploten evrede beklemede olan oositlerin etrafını sarar. Profaz-I diploten evrede beklemede olan oosit, çevresinde içsi yapıda tek kat pregranuloza hücreleri ve en dış kısımda basal membran ile 'primordial follikül' olarak adlandırdığımız yeni yapıyı oluşturur (20).

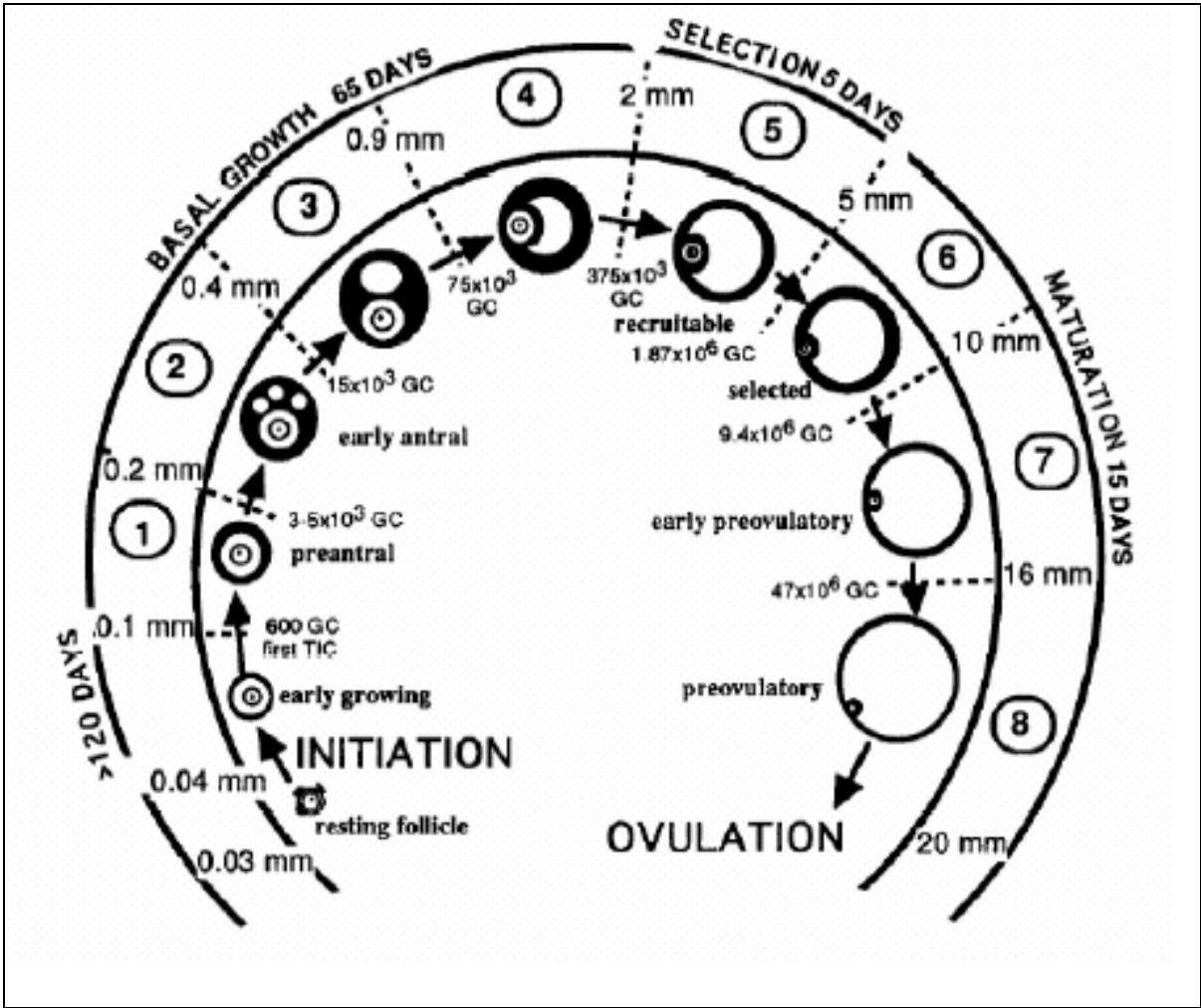
Primordial follikül oluşumu, tüm oositler follikül şeklini alana dek, doğuma kadar devam eder. Doğumda primordial folliküller yaklaşık 250 000-2 000 000 arası olacak ve pubertede bu rakam 400 000'lere düşecektir (21).

2.1.1 Pre-antral folükül popülasyonu

'Non-growing' folükül popülasyonu 4 tip folükülden oluşur; (i) içsi granuloza hücreleriyle çevrelenmiş primer oositten oluşan primordial folükül (35.0 μm çapta), (ii) içsi ya da küboidal granuloza hücreleriyle çevrelenmiş primer oositten oluşan intermediyer folükül (38.0 μm çapta) , (iii) tek tabaka granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositten oluşan primer folükül (46.0 μm çapta) ve (iv) >1 kat granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositten oluşan sekonder folükül (77.0 μm çapta)(22). Gerçek folüküler büyüme sekonder folükül içersinde oluşan germinal vezikül'ün > 19 μm 'yi geçmesiyle başlar (23).

35 yaşına kadar her ay bekleme evresindeki folüküllerin, 'resting follicle', yaklaşık olarak 1000 tanesi büyüme sürecine geçmek üzere aktive olur ve >35 yaş bu sayı gitgide artar ve sonunda resting follicle 100–1000 arası kalınca menopozal dönem başlar (21,24).

Folüküler büyüme-gelişme şekil 2.2'de ve morfolojik değişiklikler tablo 1'de gösterilmiştir (22).



Şekil 2.2: Overdeki folüküllerin gelişimi (Gougeon, 1996)

Tablo 2.1: Ovarian folüküllerin morfolojik klasifikasyonu (Gougeon, 1996)

Primordial Folükül	35 µm	• Tek tabaka yassı granuloza hücreleri
Intermediyer Folükül	38 µm	• Tek tabaka yassı ve küboidal granuloza hücreleri
Primer Folükül	46 µm	• Tek tabaka küboidal granuloza hücreleri ve zona pellucida
Sekonder Folükül	77 µm	• >1 tabaka küboidal granuloza hücreleri
		• Theca interna hücreleri üzerinde LH reseptör oluşumu
		• Folüküler vasküler ve lenfatik sistemi'nin oluşumu
		• Theca interna ve externa farklılaşması'nın başlaması
Klas 1	0.1 - 0.2 mm	• Granuloza hücreleri üzerinde FSH, östrojen ve androjen reseptörleri
		• Two-cell-two gonadotropin hormone sentezi'nin başlaması
Klas 2	0.2 - 0.4 mm	• Antrum henüz yoktur
		• Granuloza hücreleri arasında 'Call Exner body' oluşumu
		• Antrum gelişimi başlar
Klas 3	0.4 - 0.9 mm	• Cumulus oophorus oluşur
		• Küçük antrum
Klas 4	0.9 - 2.0 mm	• Orta antrum
Klas 5	2.0 - 5.0 mm	• Recruitment gerçekleşir
		• Antrumda bir miktar daha büyüme
Klas 6	5.0 - 10.0 mm	• Granuloza hücrelerinde aromatase aktivitesi
		• Seleksiyon
		• Medium antrum
Klas 7	10 - 16 mm	• Geniş antrum
Klas 8	>16 mm	• Ovulasyon

2.1.2 Folliküler gelişimin başlaması

Doğumla birlikte overlerdeki folliküllerin hemen hemen tamamı primordial folliküldür. Folliküler gelişimi başlatan mekanizma net olarak anlaşılacakla birlikte bir grup faktör'ün folliküler gelişimi başlattığı tesbit edilmiştir; epidermal growth factor, insulin-like growth factor, transforming growth factor, fibroblast growth factor ve cyclic adenosine monophosphate (cAMP) salgılanmasını arttıran vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase activating peptide ve neurotrophinler (25).

Diğer taraftan anti-müllerian hormone ve somatostatin'in follikül büyümesini engellediği tesbit edilmiştir. Bekleme evresindeki 'resting follicle' folliküllerin ne kadar miktarlar ile aktive olacağı; bekleme havuzunda kalan follikül sayısına, testesteron seviyesine, hastanın yaşına, beslenmeye ve timus aktivitesi ile opioid peptidlere bağlıdır (26,27).

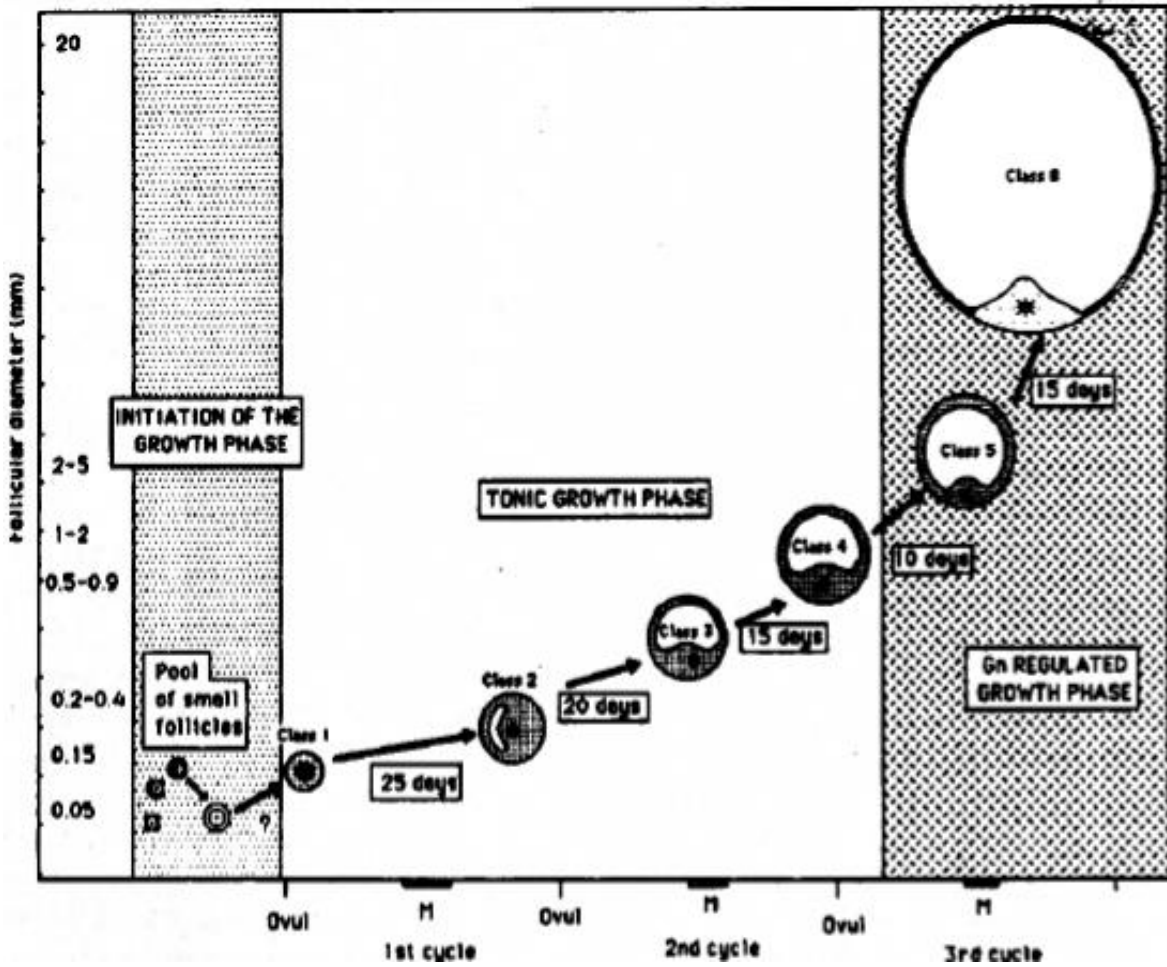
2.1.3 Preantral büyüme evresi veya bazal folüküler büyüme

Preantral büyüme evresine geçiş fetal dönemde başlar ve bu süreç menopoz'a kadar devam edecektir (23,25). Bu evre iğsi yapıdaki pregranuloza hücrelerinin (primordial follikül -35.0 µm), tek katlı kübik granuloza hücrelerine (primer follikül-46.0 µm), dönüşmesiyle başlar. Bu dönüşüm ile birlikte granuloza hücreleri ve/veya oosit tarafından yapılan mukopolisakkaride tabaka-zona pellucida oluşur (tablo 2.1) (28).

Primer oosit çevresindeki granuloza tabakasının 2 katı geçmesi ve ovarian stromal hücrelerin granuloza hücrelerini saran bazal lamina'nın etrafına lokalize olmasıyla primer folliküller sekonder follikül'e (≤ 120 µm) dönüşür (20). Sekonder follikülü oluşturan granuloza hücrelerinde FSH, östrojen ve androjen reseptörleri mevcut olmakla birlikte tam fonksiyonel değildir (20,29). Bazal lamina etrafındaki ovarian stromal hücreler theca interna ve theca externa olmak üzere 2 ayrı tabakaya farklılaşmışlardır. Theca interna hücreleri LH reseptörleri taşımaktadır. Sekonder folüküller ya büyümeye devam edeceklerdir yada %99'unda olduğu gibi atreziye uğrayacaklardır (30).

2.1.4 Tonik büyüme evresi

Tonik büyüme evresi, klas 1 (pre-antral) folikül'ün (0.12-1.20 mm çap) klas 5 follikül'e (2.0-5.0 mm çap) dönüşmesiyle karakterizedir (şekil 2.3) (20). Bu evredeki folliküller büyüme ve gelişme; klas 2'den başlayan glikoprotein yapıda sıvı birikimi ile antral kavite oluşumu ve granuloza ile theca hücrelerinin sayıca artışı ile karakterizedir (26).



Şekil 2.3: Klas 1'den klas 8'e dek tam büyüme şeması, Gn, Gonadotropin. (Adashi ve ark., 1996).

Tonik büyüme evresi, theca internadaki fibroblast benzeri stromal hücrelerden en az 1 tanesinin epitelioid hücre tipine dönüşmesiyle karakterize klas 1 follikül oluşumuyla başlar (31). Klas 1 follikül, theca ve granuloza hücreleri arasındaki 'two-cell two gonadotropin' ilişkisiyle östrojen üretebilme yetisi kazanırlar. Theca hücreleri, LH (luteinizing hormone)

tarafından stimule edilir, üretilen androjen bazal lamina'yı geçerek granuloza hücreleri tarafından östrojen üretiminde kullanılır ve östrojen hem follüküler sıvıyı arttıracak hemde sistemik sirkulasyona geçecektir (20,22).

Granuloza hücrelerindeki mitotik index artışı, granuloza hücreleri arasındaki antral sıvının birleşerek tek ve büyük antral kavite oluşturması ile yaklaşık 2 menstruel siklus süren Klas 1-preantral follükül'ün (0.12-0.20 mm çap), klas 5 - follükül'e (2.0-5.0 mm) dönüşümü gerçekleşir.

Preantral follükül evresinde izole edilen oositler mayoz bölünmeyi tamamlayamamalarına karşın bölünmenin metafaz II evresine geçebilmesi için gereken moleküller bu evrede sentezlenmektedir (18). Antral kavite hem büyümeyi hemde follükül ve oosit için bulunmaz bir mikro-çevre oluşturarak gelişimi sağlamaktadır. Erken antral follükül yapısı içerisindeki primer oosit mayoz-I'i kaldığı yerden devam ettirebilme potansiyeline sahip iken ilişkili olduğu granuloza hücrelerinin etkisi ile mayoz, ovulasyona dek bekletilmektedir (32).

Follüküllerin klas 5 seviyesine dek gelişimi endojen gonadotropinlerin anlamlı derecede az olduğu; prepubertal dönem, gebelik, COC kullanımı ve hipotalamo-pituiter yetmezlik durumlarında dahi devam etmektedir. Bu nedenle follüküller < 2 mm çapta olduğu dönemde büyüme ve gelişim için sadece bazal seviyede gonadotropin'e ihtiyaç duyarlar (22,33,34). Klas 5 seviyesinden itibaren ise klas 8 seviyesine ulaşılabilmesi için siklik gonadotropin uyarımı gereklidir (22,23).

2.1.5 Hızlı büyüme evresi

Bu evre ortalama her birisi 5 günden oluşan ve toplam 20 günün sonunda ovulasyon ile sonlanan klas 5 follükül'ün klas 8 follükül'e dönüş aşamasıdır, aktif gonadotropin uyarımı gereklidir ve bu dönemde follükül kohortu seçilimi (recruitment), dominant follükül seçilmesi ve ovulasyon gerçekleşir (şekil 2.3) (23,34).

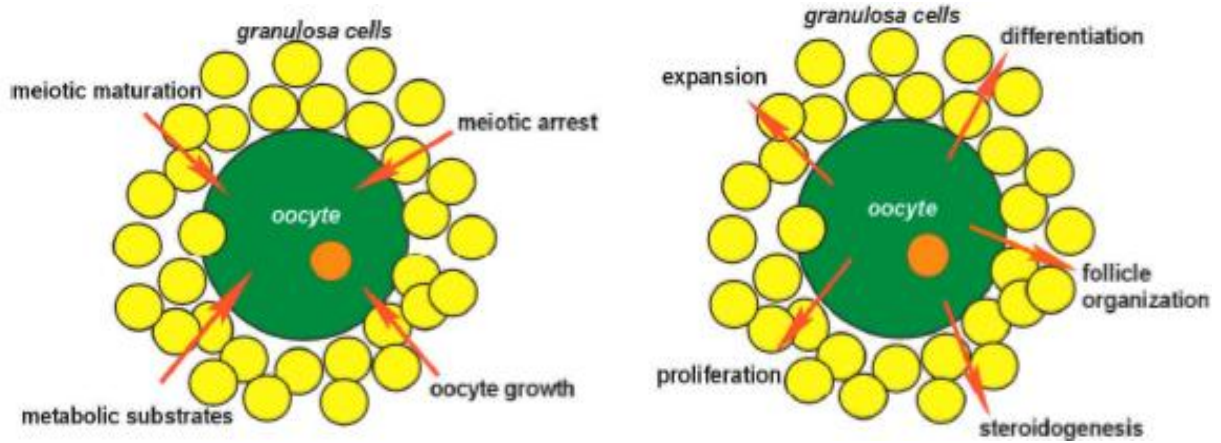
Bir önceki siklus'un midsiklus LH pik'ini takiben 12.gün civarında FSH artmaya başlar. FSH'nın bazal seviyenin %10-30 üzerine çıkmasıyla 1-15 klas 5 follükül'den oluşan küme atreziden kurtarılır (22,35-37). Atreziden kurtulan bu kohort'taki follüküllerin ortak özellikleri; diğerlerine nazaran daha büyük olmaları, en fazla FSH reseptörünü içeren follükül olmaları ve belirli FSH eşik seviyesi üzerinde uyarılabilir olmalarıdır. Gitgide yükselen

FSH'ya sekonder olarak bu kohort içerisindeki 1-15 follikül'ün çapı antral kaviteye salgılanan glikoprotein ve yüksek granuloza hücre mitotik indexi ile artar (38).

Menstrüel siklusun 5-7.gününde; en geniş çaplı olan, en yüksek mitotik index'e sahip olan ve cohorttaki diğer folüküllere nazaran en yüksek östrojen salgılama kapasitesine sahip olan follikül dominant folükül olarak seçilir ve bu seleksiyonun follikül çapı >8 mm olmadan gerçekleşmediği bildirilmiştir (39,40). Seleksiyonda, artan östrojen ile birlikte azalan FSH etkilidir.

Follikül'ün seçilmesini takiben granuloza hücre sayısındaki ve antral follikül sıvısındaki artış devam eder, midsiklus gonadotropin salgısından yaklaşık 5 gün önce oluşan östrojen belirgin artışı olur ve klas 7 (8-16 mm çap) takiben de klas 8 (18-20 mm) follikül oluşur (22). Follikül en çarpıcı gelişimini son 10-15 gün içerisinde yapmıştır; son 2 haftada follikül çapı yaklaşık 12 mm artmış iken büyümenin başlangıcından itibaren geçen yaklaşık 330 günde yaklaşık 6 mm çapa ulaşabilmiştir (23). Bu aşamadan itibaren follikül artık matürdür ve oluşacak gonadotropin ani salgısı ile ovulasyon olacaktır.

2.2 Oosit –Folükül gelişim kontrolü (şekil 2.4)



Şekil 2.4: Çift yönlü follikül gelişim kontrolü

2.2.1 Granuloza hücresi....Oosit gelişimi kontrolü

Oosit; büyüme, mayoz bölünme regülasyonu ve metabolik destek açısından granuloza hücrelerinin kontrolü ve desteğindedir (41,42). Germ hücreleri ve somatik hücreler arasındaki çift yönlü iletişimde özellikle gap junction yapısı ve parakrin faktörler önemlidir.

Gap junction 'connexin' yapısal proteinleri tarafından oluşturulur (43). Granuloza hücreleri arasındaki gap junction'da connexin 43 proteini daha baskındır ve connexin 43 eksikliği olan folliküler yapılarda erken preantral gelişim olamamaktadır. Granuloza hücresi-oosit arasındaki gap junction'da ise connexin 37 proteini daha baskın olmakla birlikte, eksikliğinde; antral follikül gelişimi, luteinizasyon ve ovulasyon olamamaktadır (44). Bu sonuçlar ile, granuloza-granuloza arası ve granuloza-oosit arası iletişimde büyük rol oynayan gap junction yapısı follikülogenez açısından hayati önem taşımaktadır.

Granuloza hücreleri ve oositler arasındaki ilk ligand-reseptör sistemi ise KL - Kit tyrosine kinase reseptör sistemidir (45,46). Ovarian follikül gelişiminde Kit; FSH reseptör formasyonu gerçekleşmeden önce etkili olmaya başlar ve etkisi takiben ovulasyon öncesi maturasyona dek sürer.

2.2.2 Oosit...granuloza hücre fonksiyon kontrolü

Oosit folükül yapısı içerisinde bir orkestra şefi gibi hareket eder; granuloza hücre proliferasyonu dolayısıyla folükül büyümesi ve maturasyonu, ayrıca steroid sentezi üzerine etkilidir. Oositektomi uygulanmış follikül çalışmalarında oositektomiye takiben kalan somatik hücrelerde; LH reseptör formasyonu ve maturasyonu engellenerek progesteron salgılanmasını önlemiştir. Oosit kaynaklı düzenleyici faktörlerin en önemlileri 'transforming growth factor-beta (TGF-beta) superfamily' grubunda yer alan growth differentiation factor 9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) ve BMP-6'dır (47,48).

2.3 Apoptoz

İlk kez 1972 yılında Kerr ve ark. tarafından karaciğer hücrelerinde morfolojik olarak nekrozdan farklı yapıda hücre ölümü tesbit edildi (49). Apoptotic hücreler komşu hücreler ve extraselüler matrixten ayrılırlar. Hücresel matrix'in aktif olarak kaspazlar tarafından

parçalanmasını takiben hücrede volüm kaybı ve büzüşme gerçekleşir. Apoptoz'un en önemli özelliklerinden biriside DNA'nın 150-200 baz çiftlerinden oluşan intranukleozomal parçacıklara ayrılmasıdır, bu enerji bağımlı aktif bir mekanizma olup nekrozdaki parçalanma tamamen pasif bir olaydır. Olayın sonunda komşu hücreler ve fagositler, 'apoptotic body' olarak adlandırılan cisimcikleri enflamatuar cevap gelişmeyecek şekilde fagositler ederler (50,51).

Nekroz ise hücrel membran'ın parçalanmasını takiben; hücrede şişme ve intraselüler yapıların rastgele hasarı ve sonuçta oluşan geniş enflamatuar cevap ile karakterizedir. Nekroz aynı patolojiye maruz kalan geniş sayıdaki hücre topluluğunda görülmekte iken, apoptoz tek bir hücrede görülür (50).

2.3.1 Mitokondri ve Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ilk olarak folliküler B hücreli lenfoma hücrelerinden elde edilmiş bir proto-onkogen olarak bulunmuştur. Günümüze kadar kadar en az 19 tane Bcl-2 ailesine ait üye protein tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesi üyesi proteinler apoptozu mitokondrial seviyede kontrol eden ana proteinlerdir. Bu üyeler Bcl-2 homoloji ünitesi adı verilen dört motiften en az birini içerirler (BH1-BH2-BH3-BH4). Bu üniteler dışında, proteinler arası ilişkilerden ve intraselüler iyon kanalları ve porların oluşumundan sorumlu olan transmembranal bir yapıyı da içerirler. Bcl-2 üyeleri fonksiyonları ve yapılarına göre üçe ayrılabilirler (52).

1- Antiapoptotik üyeler: Bu üyeler en azından BH1 ve BH2 ünitelerini içerirler ve hücreyi apoptozu karşı korurlar. En önemlileri şunlardır; Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, AI, NR13, Boo/Diva.

2- Proapoptotik üyeler: Bu üyeler apoptozda rol oynarlar ve BH4 dışındaki diğer üniteleri içerirler. En önemlileri şunlardır ; Bax, Bak, Bok.

3- Sadece BH3 ünitesi içeren üyeler: Bu üyeler sadece BH3 ünitesi içerirler ve proapoptotik rolleri vardır. En önemlileri şunlardır; Bid, Bad, Bim, Bik, Bnk, Hrk.

Bcl-2 ve Bcl-X_L sadece mitokondrinin dış membranında bulunurken proapoptotik üyeler sitozolde veya membranda bulunabilirler. Bcl-2 ailesi üyeleri endoplazmik retikulum ve nükleer zarfta bulunabilirler de esas olarak mitokondri yerleşimlidirler. Apoptoz sırasında proapoptotik Bcl-2 üyeleri konformasyonel bir değişikliğe uğrayarak proapoptotik BH3 ünitesi açığa çıkar. Bax, Bid ve Bad proteinlerinin mitokondriye geçmesiyle sitokrom c

salınır. Sitokrom c nükleer bir gendir, mitokondriye geçtiği zaman bir hem grubuyla birleşerek holositokrom c oluşur ve sadece bu form kaspaz aktivasyonunu sağlayabilir (53). Bcl-2 ve Bcl-X_L sitokrom c'nin mitokondriden salınımını önler yolda çalışırlar ve hücrenin yaşamına devam etmesini sağlarlar. Özetle, proapoptotik üyeler (bax, bak, bok) apoptozun gerçekleşmesi lehine çalışırken, antiapoptotik üyeler (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w) hücrenin yaşamının devamı yönünde çalışırlar.

Son yıllarda Smac veya DIABLO adlı bir proteinin de mitokondriden salındığı bulunmuştur (54,55). Bu protein apoptozom ile birlikte kaspazı indüklemekte ve 'inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)'i inhibe etmektedir. Bazı hücrelerde sitokrom c hücre ölümü için gerekli olsa da yeterli olamamaktadır. Bu hücrelerde Smac proteininin apoptozda rol oynadığı düşünülmektedir.

2.3.2 Ölüm reseptörleri ve ligandları

Ölüm reseptörleri "tumor necrosis factor receptor" (TNFR) ailesine üye proteinlerdir. Toplam beş tanedirler: TNFR1, fas (CD95), DR3/WSL, ve "TNF-related apoptosis-inducing ligand" (TRAIL)/Apo-2L. Bu proteinler sisteyinden zengin hücre dışı yapılar içerir. Karboksil terminallerinde ölüm ünitesi (DD) adlı reseptörleri vardır. Bu reseptörler ligandlara bağlandığında apoptoz meydana gelecektir.

Fas 45-52 kDa (355 amino asit içerir) ağırlığında glikolize bir hücre yüzey molekülüdür. Birçok hücrede eksprese edilir ve ekspresyonu interferon γ ve TNF gibi sitokinlerce artırılabilir. Fas ölüm reseptörlerine bağlandığında hücre ölümü için sinyaller dizisi oluşur. Daha sonra prokaspaz 8 aktive olarak kaspaz kaskatını tetikler.

2.3.4 Kaspazlar

Aspartat spesifik sistein proteaz yolağı apoptozun temel ana yollarından biri olarak gösterilmektedir [7]. 'İnterlökin-1 β konverting enzim (ICE; kaspaz 1)' kaspazların prototipi olup pro-interlökin-1 β 'nin biyolojik olarak aktif formuna dönüşmesinden sorumludur (56). Kaspaz 1'in apoptozda bir rolü olmasa da bu ailenin ilk tanımlanan üyesidir.

Memelilerde 14 tane kaspaz gen ailesi vardır ve insanlarda 11 tane enzim tanımlanmıştır. Bu gen ailesinin iki adet alt grubu vardır. Birincisi ICE ile ilişkili aile

(inflamatuar grup), ikincisi de apoptotik grubu oluşturan ailedir. Kaspazlar amino asit dizisi, yapıları ve substrat spesifiteleri bakımından benzerlikler gösterirler. Üç tane ünite içeren ön enzimler halinde sentezlenirler; bir N-terminal önünitesi, sistein içeren büyük bir subünite ve C-terminal küçük bir subünite.

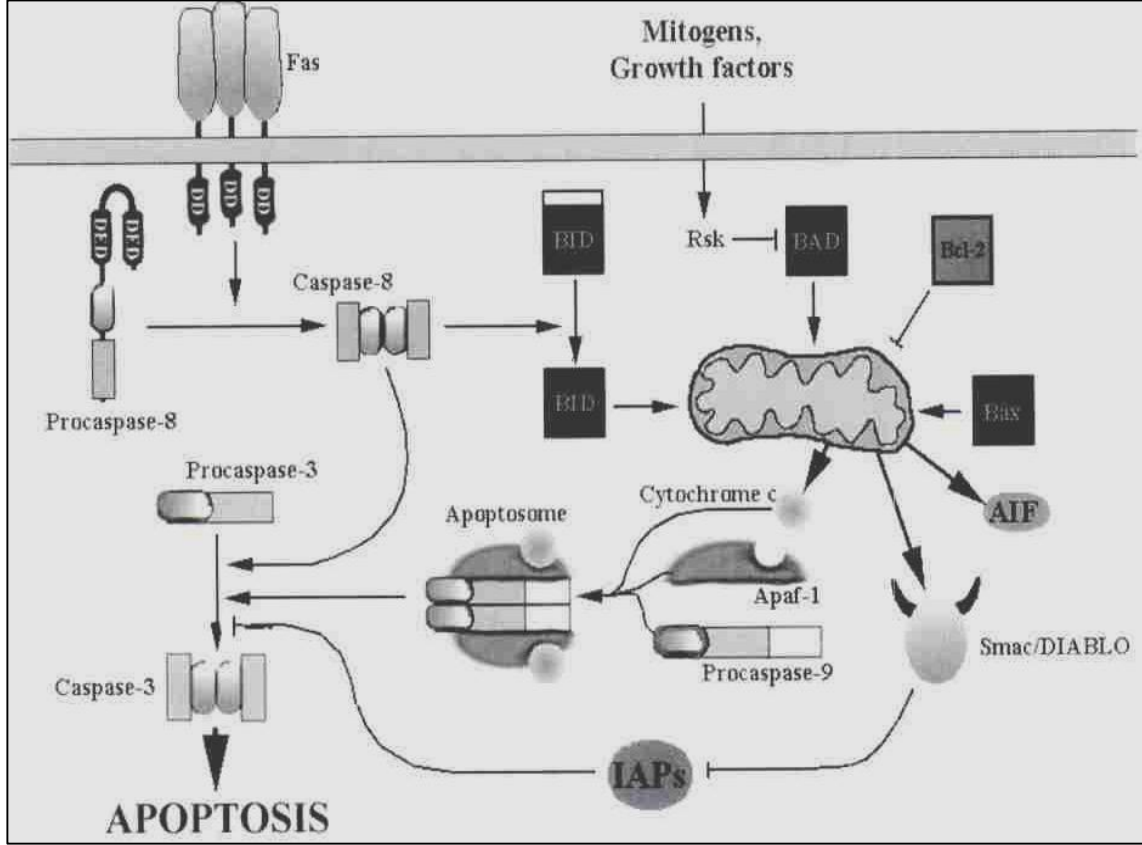
Hücrelerde en yaygın bulunan kaspaz, kaspaz-3'tür. Apoptotik etkinin çoğunluğundan kaspaz-3 sorumludur ve etkisi kaspaz-6 ve 7 tarafından desteklenir. DNA yıkımı kaspaz-3'ün "caspase-activated DNase" ı (CAD) aktive etmesiyle başlar (57,58). Apoptotik olmayan hücrede bu enzim CAD'ı inhibe eden bir protein ile bir kompleks oluşturmuş halde inaktif olarak bulunur. Apoptoz esnasında kaspaz-3, CAD'ı inhibe eden proteini yıkar ve nükleazın kromatini kesmesine olanak sağlar (59).

Hücreler kaspazları içerdikleri gibi, aynı zamanda doğal kaspaz inhibitörlerini de içerirler. En az beş tane 'inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)' tanımlanmıştır. Bunlar "X-linked inhibitor of apoptosis" (XIAP), c-IAP1, c-IAP2, nöronal IAP ve hücre kültüründe antiapoptotik etki yapan survivindir. Bunların içinde en yaygın ve etkin olanı XIAP'dir. XIAP, c-IAP1 ve c-IAP2 direkt olarak kaspaz 3, kaspaz 7 ve kaspaz 9'u inhibe ederler (28,60,62).

2.3.5 Apoptoz kaskad (şekil 2.5)

Apoptoz kontrolü çok basamaklıdır. Hücre dışı sinyaller apoptoz'u baskılayabilir (mitogen ve growth faktör) ya da başlatabilir (Fas ligand veya TNF-alfa). Ölüm reseptörlerini (Fas veya TNF reseptörleri) etkileyen hücre dışı sinyaller procaspase-8'in katalize olmasını sağlar. Aktif kaspaz-8, kaspaz-3 gibi apoptoz'da rol alan kaspazların direk aktivasyonuna yol açabilir. Bu işlem 'inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)' grubu proteinler ile önlenmektedir. Eğer caspase-8 direk caspase-3 aktivasyonu ile apoptoz'u başlatamazsa alternatif yol devreye girer. Proapoptotik sinyal, 'BH3 interacting domain death agonist (BID)' kısmını ayırarak aktif hale getirmesiyle sinyal amplifiye olur. Aktif BID, mitokondrial membran üzerine yerleşik anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini antogonize eder. Eğer proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine karşı üstün olabilirlerse; mitokondrial membran potansiyeli kaybolur ve mitokondri içerisindeki apoptoz indükleyici faktörler hücre sitoplazmasına dağılır. Bu faktörlerin en önemlileri apoptoz'u direkt indükleyebilen AIF (apoptoz inducing factor), IAPs molekülünü engelleyen Smac/DIABLO

ve en önemlileri sitokrom-c'dir. Sitokrom-c 'apoptosis inducing complex' oluşturarak yada Apaf-1 ve caspase-9 ile birleşerek 'apoptosome' oluşturarak apoptoz'u başlatır (63).



Şekil 2.5: Apoptosis'in çok basamaklı kontrolü.

2.3.6 Oositlerde apoptoz

Fizyolojik koşullar altında apoptoz, ovarian follikül'de 3 hücre tipinde görülür. Granuloza hücrelerinde ve luteal hücrelerde ki apoptoz sıklıkla erişkin dönemde olurken oositlerde ki apoptoz fetal hayatta gözlenir. Oositlerde apoptoz 13.haftadan başlar ve 14-20.haftalar arasında maximum seviyeye (%11-17) ulaşır (63). Bu dönemden sonra doğuma dek gitgide azalır ve postnatal oositlerde apoptoz izlenmemektedir.

2.4 Stem cell

Stem cell konusunu incelediğimizde, hızlı gelişimlerin yaşandığı bu bilim dalında karşımıza heran yeni tanımlamalar çıkmaktadır (64);

Stem cell: Embriyodan, fetüsten yada belirli şartlar altında erişkinden elde edilen ve organizmanın yaşam süresi boyunca çoğalarak artabilen (somatik stem cell'de bu süre yaşam süresi boyunca olmasa da uzun süreler boyunca devam eder) hücredir. Vücutta doku ve organ yapıtaşını oluşturan özelleşmiş hücelere dönüşebilir.

Pluripotent stem cell: Vücudu oluşturan 3 germ tabakasına da (endoderm, mezoderm, ektoderm) dönüşebilme kapasitesine sahip hücredir. İnsan Pluripotent stem cell grubunun bugün bilinen iki kaynağı; erken dönem insan embriyosu ve gonadal fetal dokunun izole edilip hücre kültüründe çoğaltılmasıdır.

Embriyonik stem cell: Blastokist olarak adlandırılan 4-5 günlük embriyo'nun iç hücre kitlesinden (inner cell mass) elde edilen hücredir. Bu hücreler kendileri embriyo değildir ve laboratuarda gelişmekte olan embriyodaki gibi davranmazlar.

Embriyonik germ cell: Fetal dokudan izole edilir. 5-10 haftalık fetüs'ün gonadal ridge bölgesindeki primordial germ hücrelerinden izole edilirler. Gelişmenin devam etmesiyle gonadal ridge testis veya over'e dönüşecek ve primordial germ hücreleride oosit yada sperm'e dönüşeceklerdir. Embriyonik stem cell ve embriyonik germ cell Pluripotent olmalarına rağmen karakter olarak birbirlerine eşdeğer değildir.

Özelleşme (Diferansiasyon): Özelleşmemiş bir hücrenin (stem cell gibi) vücudu oluşturan birçok hücreden birisine değişimi işlemidir. Diferansiasyon bazı genlerin aktive olup bazılarının da inaktive olması ile kontrol edilir. Ve sonuçta diferansiye olmuş hücreler birtakım fonksiyonları yerine getirebilen özel yapılara dönüşürler. Örneğin; diferansiye olmuş bir sinir hücresi, elektrokimyasal sinir iletimi ile diğer hücreler ile iletişim kurabilen bir hücreye dönüşmektedir. Laboratuarda stem cell özelleşmiş hücre tiplerine (kalp kası, sinir hücresi ve pankreatik hücre gibi) dönüşmek üzere manipüle edilebilir ve buna belirlenmiş diferansiasyon denilir.

Plastisite: Bir dokuya ait olan somatik stem cell'in, başka bir dokuya ait olan özelleşmiş hücelere dönüşebilmesidir.

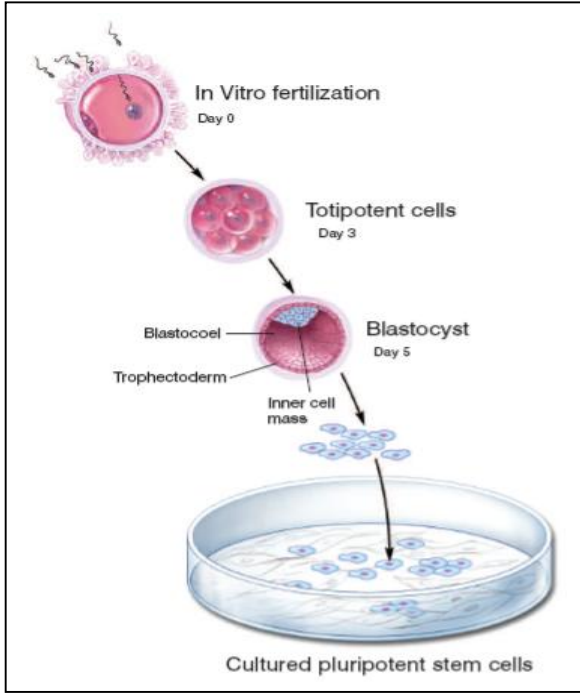
Klonalite: Bir hücrenin belirli bir hücrenin bölünmesi sonucu ve genetik olarak bölünmeye uğrayan hücre ile aynı olması kavramıdır. İnsan pluripotent stem cell'in klonal olarak

bölündüğü bugün net olarak bilinmekle birlikte somatik stem cell'in klonalitesi ile ilgili çok az çalışma mevcuttur.

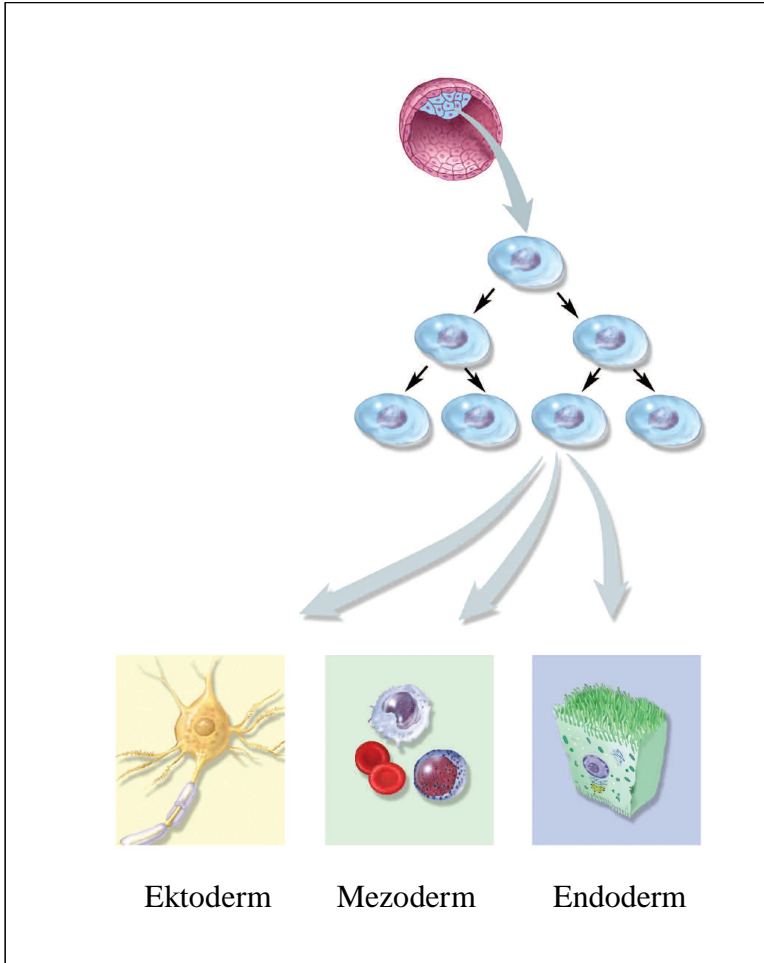
Progenitor cell: Bölünme sonucu tam diferansiye hücreler verebilme kapasitesine sahip olan parsiyel özelleşmiş hücredir. Progenitör ve somatik stem cell ayırımı önemlidir; stem cell bölündüğünde oluşan iki hücreden bir tanesi mutlaka replike olabilen ve self-renewal kapasitesine sahip stem cell'dir, bir progenitör hücre bölündüğünde ise replikasyon özelliği ve dolayısıyla self renewal kapasitesi olmayan 2 yeni progenitör hücre yada iki özelleşmiş hücre oluşur.

2.4.1 Embriyonik stem cell

Yaklaşık 5 günlük-blastokist aşamasındaki embriyonun iç hücre kitlesini oluşturan, blastomere olarak adlandırılan ve sayı olarak 30 civarındaki hücrenin; hücre kültüründe geliştirilmesi sonucu oluşur (şekil 2.6) (64). Diferansiye olmadan uzun süre simetrik olarak diploid kromozom yapısını koruyarak bölünebilirler. Bu hücreler kendileri embriyo değildir ve laboratuarda gelişmekte olan embriyodaki gibi davranmazlar. Pluripotent yapıdaki hücreler oldukları için her 3 germ tabakadaki hücreye dönüşebilir ve günümüzde insülin sentezleyebilen pankreas hücresi, kontraktil aktiviteye sahip kalp kası hücresi, kan hücreleri ve elektrokimyasal uyarı iletebilme kapasitesine sahip sinir hücresi oluşturulabilmiştir (şekil 2.7) (64,65). Hücre kültürlerinde elde edilebilen uzun telomeraz zinciri sayesinde uzun süreli olarak özelleşmeye gitmeden kendi sayılarını arttırabilmektedirler (long time self renewal) (66).



Şekil 2.6: İnsan embriyonik stem cell elde edilmesi



Şekil 2.7: Embriyonik stem cell'in özellikleri

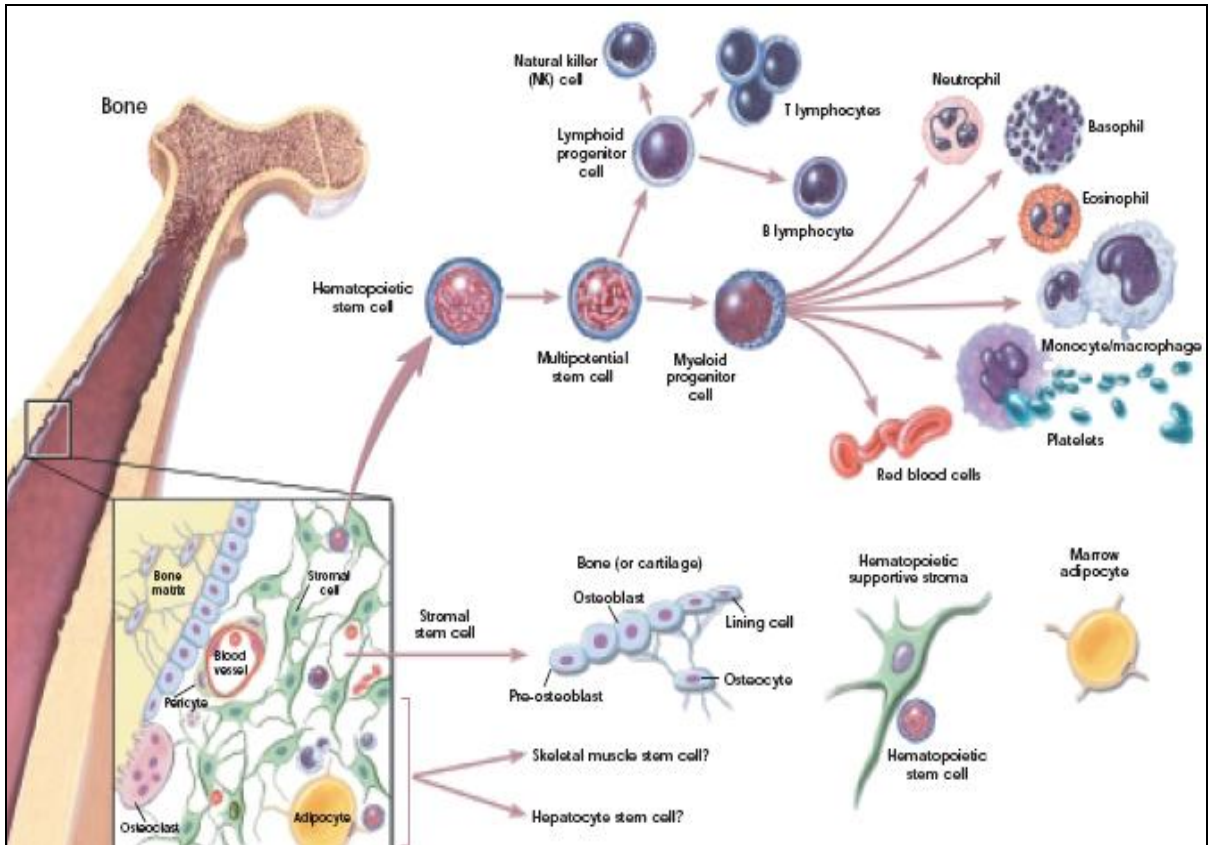
2.4.2 Somatik (adult) stem cell

Özelleşmiş bir doku içerisinde, kendisini yenileyebilen ve içinde bulunduğu dokunun tüm özelleşmiş hücrelerine dönüşebilme potansiyelini taşıyan diferansiye olmamış hücredir (64). Somatik stem cell organizmanın hayatı boyunca kendi kopya hücrelerini yapabilir (self-renewal). Somatik stem cell; karakteristik şekil ve fonksiyonlara sahip matür hücreleri (kontrakte olabilen kas hücresi, iletim yapabilen sinir hücresi) oluşturacak progenitör hücre oluşturmak üzere bölünür. Bilinen somatik stem cell kaynakları; kemik iliği, kan, gözün kornea ve retina bölümü, beyin, iskelet kası, diş minesini, karaciğer, cilt, gastrointestinal trakt iç yüzeyi ve pankreasıdır. Bugün henüz vücudun bütün hücrelerine dönüşebilme yetisine sahip izole somatik hücre popülasyonu elde edilememiştir; yani somatik stem cell, her 3 embriyonik germ tabakaya dönüşebilme yetisine sahip pluripotent stem cell özelliklerine sahip değildir. Organizma içerisinde iken bu hücreler uzun süreli olarak özelleşmeye gitmeden kendi sayılarını arttırabilmektedirler (long time self renewal). Bugünkü araştırmalarda en büyük sorun ise hücre kültürlerinde bu hücreler özelleşmeye gitmeden uzun süre sadece sayıca arttırılarak tutulamamaktadırlar (64,67).

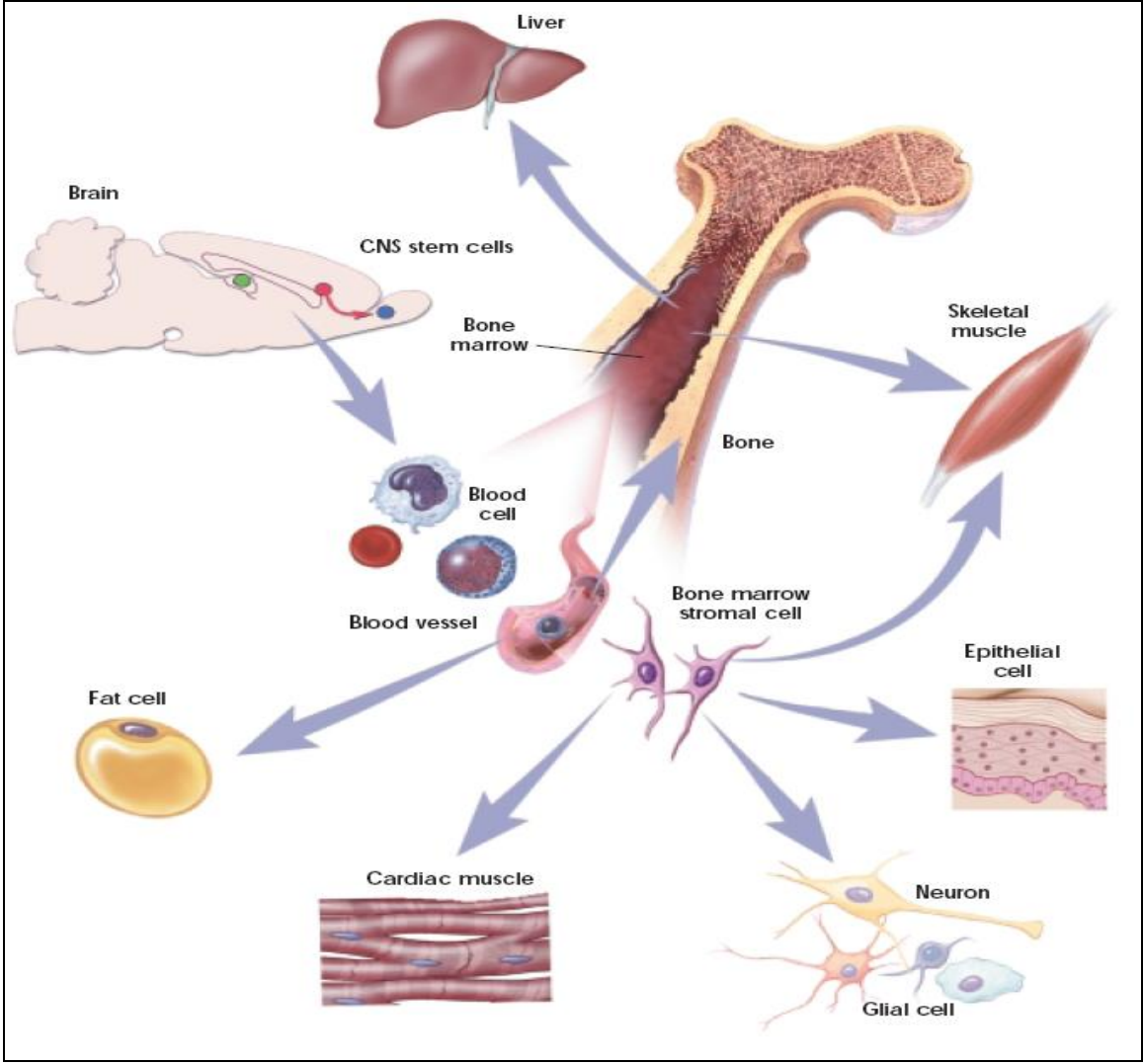
Günümüzde en çok çalışılan somatik stem cell, kemik iliği kaynaklı stem cell'dir ve major olarak iki tip olduğu saptanmıştır; hematopoietik stem cell (kan hücreleri oluşturabilir) ve mezenkimal stem cell (kemik, kıkırdak ve yağ dokusu oluşturabilir). Hematopoietik stem cell grubu en çok çalışılan grup olmasına rağmen hücrelerin hücre kültüründe çok replike olamaması ve özelleşme olmadan kalması büyük dezavantajdır, ayrıca kemik iliği kaynaklı stem celler'in farklı alt tiplerinin olabirliğine dair çalışmalar devam etmektedir (şekil 2.8) (68,69).

Somatik stem cell plastisiteside yeni bir kavram olmakla birlikte mekanizma net olarak bilinmemektedir; somatik stem cell'e uygun ortam ve koşullar sağlandığında bu hücrelerin, farklı dokularda yer alan özelleşmiş hücrelere genetik olarak tekrar programlanarak dönüştüğü izah edilmektedir. Bugüne kadar 3 grupta klinik olarak kesinleşmiş plastisite bildirilmektedir; 1) kemik iliği ve kan kaynaklı hematopoietik stem cell'in 3 ana beyin hücresine (nöron, oligodendrosit, astrosit), iskelet ve kalp kası hücresine, karaciğer hücresine dönüşümü. 2) kemik iliği kaynaklı mezenkimal stem cell'in iskelet ve kalp kası hücresine, yağ-kemik-kıkırdak hücresine dönüşümü. 3) beyin kaynaklı stem cell'in kan ve iskelet kası hücresine dönüşümü (şekil 2.9) (69).

Embriyolojik dönemde primordial germ hücreleri ile hematopoietik kök hücreleri proksimal epiblast'tan, yani aynı bölgeden köken almaktadırlar (70). Postnatal dönemde de hematopoietik sistem, kemik iliği kaynaklı stem cell popülasyonu ile desteklenmektedir (71). Primordial germ hücresi'nin in vitro koşullarda primitif hematopoietik stem cell oluşturabilme özelliğinin saptanması (72) ve kemik iliği kaynaklı stem cell'den plastisite kavramı dahilinde farklı dokulara ait hücreler elde edilmesiyle (73,74), kemik iliğinin germ stem cell kaynağı da olabileceği düşünüldü. Bu fikir'e yönelik yapılan çalışmaların en sonuncusu ve en önemlisi 2005'te Johnson ve ark. tarafından yapıldı; germ cell markerlarından Oct4, Mvh, Dazl, Stella ve Fragilis'in erişkin dişi fare kemik iliğinde eksprese edildiği saptandı. Aynı çalışmanın ikinci ayağında ise kemoterapi sonucu pre ve post mayotik germ hücre popülasyonu tamamen yok edilen farelere yapılan kemik iliği transplantasyonunu takiben her gelişim evresinde (resting primordial evresindeki foliküllerde dahil) oosit içeren foliküller saptandı (9).



Şekil 2.8: Kemik iliği kaynaklı stem cell gruplarından farklılaşma



Şekil 2.9: Somatik stem cell plastisitesi (kemik iliğinden farklı dokulardaki matür hücrelere dönüşüm)

Bölüm 3

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma prospektif kontrollü deneysel araştırma olarak yapıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri ödeneğinden 2006.KB.SAĞ.012 numaralı proje olarak desteklenmiş ve deney için Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Deney Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yapıldı. Ovarian morfolojik follikül dinamiği incelemesi ve apoptoz tayini Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1 Deney hayvanları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvar'ından cinsel yönden olgunluğa erişmiş, 125-175 gram ağırlıklarında, hepsi de 75 günlük olan Wistar albino suşu toplam 23 adet sıçan alındı ve 3 gruba ayrıldı. Sıçanlar'a deney süresince 12 saat gece ve 12 saat gündüz fotoperiyotta standart yem ve su verildi. Tek taraflı ooforektomi'nin kısa, orta ve uzun dönem etkilerini değerlendirmek için çalışma 3 ayrı grupta planlandı.

Grup A: Çalışmanın 0.gününde unilateral ooforektomi (3 rat'a sağ ooforektomi , 4 rat'a sol ooforektomi) yapıldı. Çalışmanın 7. gününde relaparotomi ile kalan overin çıkartıldığı grup (n:7).

Grup B: Çalışmanın 0.gününde unilateral ooforektomi (4 rat'a sağ ooforektomi , 4 rat'a sol ooforektomi) yapıldı. Çalışmanın 14. gününde relaparotomi ile kalan overin çıkartıldığı grup (n:8).

Grup C: Çalışmanın 0.gününde unilateral ooforektomi (4 rat'a sağ ooforektomi , 4 rat'a sol ooforektomi) yapıldı. Çalışmanın 42. gününde relaparotomi ile kalan overin çıkartıldığı grup (n:8).

Tüm sıçanlarda 0.günde alınan over, aynı sıçan için kontrol overi olarak kullanıldı.

Sıçanların bir östrus siklusu üç - dört gündür (61). Dolayısıyla grup A'daki sıçanlar 1-2, Grup B'deki sıçanlar 3-4 ve Grup C'deki sıçanlar 10-12 menstrual siklusal süre geçireceklerdir.

40-80 mg/kg Ketamine + 5-10 mg/kg Xylazine (intraperitoneal) ile uygulanan anesteziyi takiben steril şartlarda uygulanan laparotomi ile unilateral ooforektomi ile alınan overler (kontrol overi) formolin ile fikse edilerek patoloji laboratuvarına gönderildi. 3 gruptaki hayvanlara sırasıyla 7, 14, 42. günlerde relaparotomi uygulandı ve kalan over (çalışma overi) ooforektomi ile çıkartıldı. Hayvanların hepside relaparotomi sonrası toksik eter dozu ile sakrifiye edildiler.

3.2 Follikül dinamiği'nin incelenmesi

Parafin ile bloklanan dokulardan, doku bitene dek 8µm kalınlığında kesitler alındı ve literatürde tariflendiği şekilde ilk kesitten itibaren her beş kesitte bir kesit incelemeye alındı ve Hematoxylen-Eosin ile boyandı (75). 46 overden alınarak incelenen kesit sayısı 2392 idi. Her bir over başına incelenen kesit sayısı ortalama 52 idi.

Oosit involusyonu ile birlikte eosinofili izlenen, şekil olarak deforme olan ve granuloza hücrelerinde pyknosis gelişmiş olan folliküller atretik follikül ve sağlıklı görünümdeki folliküller normal follikül olarak değerlendirildi (20). Kesitlerde folliküller Gougeon tarafından tariflendiği şekilde sınıflandırıldı (8,20); (i) iğsi granuloza hücreleriyle çevrelenmiş primer oositten oluşan primordial follikül (35.0 µm çapta), (ii) tek tabaka granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositten oluşan ve oosit çevresinde zona pellucida tabakasının oluşmaya başladığı primer follikül (46.0 µm çapta), (iii) >1 kat granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositten oluşan sekonder follikül (ortalama 77.0 µm çapta) (iv) glikoprotein yapıda sıvı birikimi sonucu antral kavite oluşumu ile karakterize antral follikül. Bu sınıflamada yer alan sekonder ve antral folliküller tek bir grup altında growing follikül olarak adlandırıldı.

Üç grupta sayılan toplam normal ve atretik follikül sayısı istatistiksel analiz yapılırken, beş kesitte bir kesit incelemeye alındığı için, tüm overdeki sayının bulunabilmesi için beş ile çarpıldı (75). Her bir gruptaki çalışma overi kendi kontrol overi ile karşılaştırıldı. Her grup için çalışma overi ile kontrol overinde; primordial follikül, primer follikül, growing follikül ve apoptotik indeks ortalamaları hesaplandı.

Apoptoz incelemesinde, yeni geliştirilen birçok yönteme rağmen halen gold standart olarak ifade edilen morfolojik inceleme kullanıldı (76). İncelenen dokularda morfolojik olarak; sitoplazmik vakuolizasyon, kromatin kondensasyonu ve yuvarlak sitoplazmik kitle

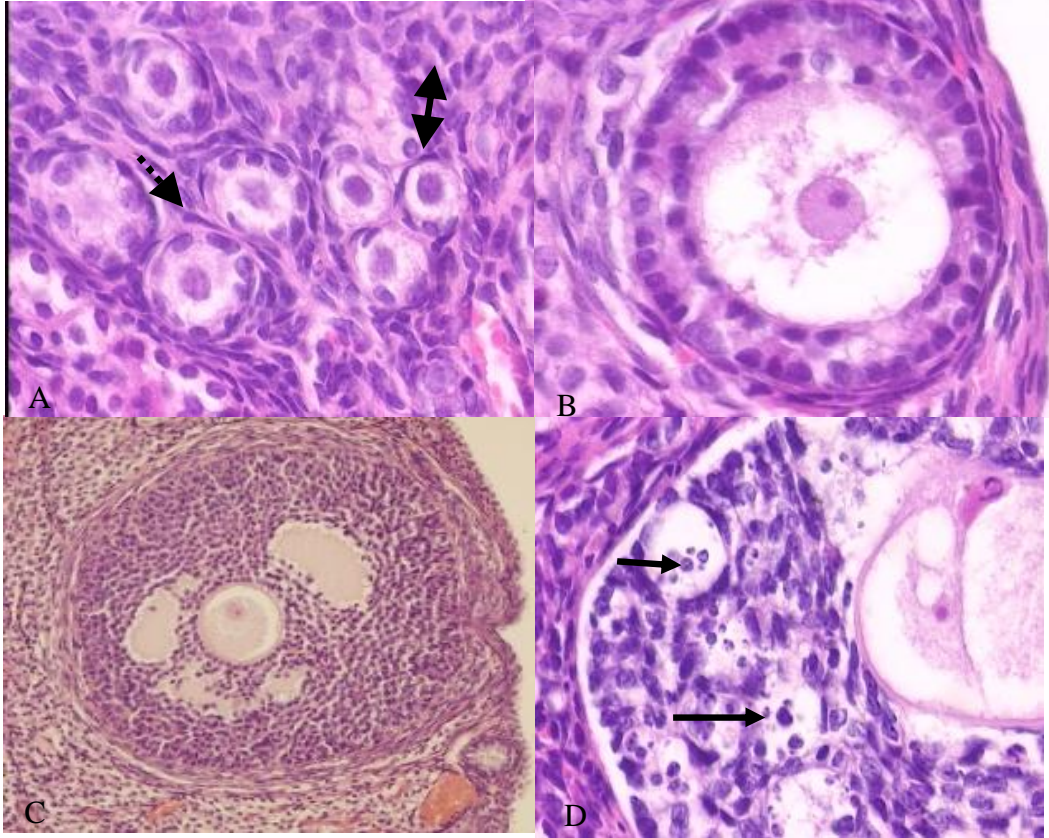
veya pyknotik kromatin kondensasyonu etrafında ince sitoplazmik halo olarak izlenebilen 'eosinofilik apoptotik body' ler sayıldı. Sıklıkla 1000 hücrede sayılan 'apoptotik body'ler 1000 hücrede index olarak verilmesine rağmen veri güvenilirliği açısından ortalama $4(\pm 2)$ kesitte sayılan 5000 hücredeki apoptotik body sayısı 1000 hücrede apoptotik indeks olarak verildi.

3.3 İstatistiksel Anali

Tüm istatistikler "SPSS for Windows 12.0" istatistik programı ile yapıldı. Her grup kendi içerisinde bağımsız olarak Wilcoxon Signed Ranks Test ile değerlendirildi. p değeri 0.05'den düşük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bölüm 4

BULGULAR



Şekil 4.1: A) Çift ok ile primordial follükül grubu (yassı granuloza hücreleriyle çevrenmiş follüküller) ve kesik çizgili oklar ile primer follüküller (kübük granuloza hücreleriyle çevrili follüküller) işaretlenmiştir (Hematoxylene-eosine[HE] boyanmış kesit x400). B) Çift sıra granuloza hücresi ile çevrili sağlıklı görünümlü sekonder follükül (HE, X400). C) Growing-klas 2 follükül. Antrum oluşumu başlamıştır (HE, X200). D) Atretik bir growing follükül'de apoptotik body'lerin düz çizgili ok ile gösterimi (HE, X400).

4.1 Grup A

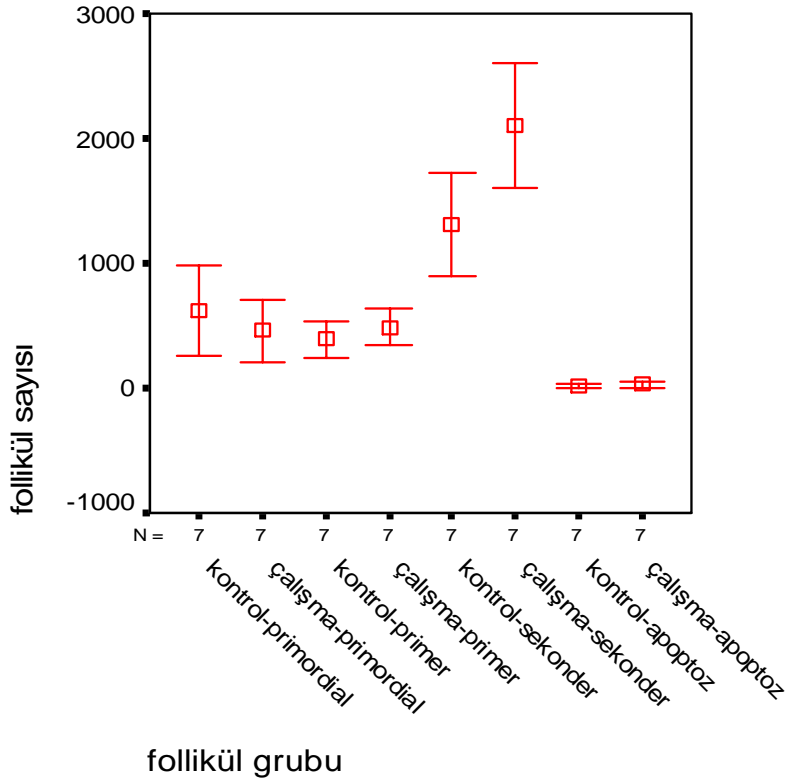
Grup A [Çalışmanın 0.gününde unilateral ooforektomi-kontrol over (3 sıçan'a sağ ooforektomi , 4 sıçan'a sol ooforektomi) ve çalışmanın 7. gününde relaparotomi ile kalan over-çalışma over çıkartıldığı grup] içersindeki primordial follikül, primer follikül, growing follikül gruplarının normal, atretik, total sayıları ve apoptotik indeks ortalama [SD] ile p değerleri tablo 4.1 ve şekil 4.2'de gösterilmiştir. Bu grupta primordial ve primer follikül açısından çalışma overinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış saptanmamış olup sadece growing atretik ve growing total follikül sayılarında anlamlı artış saptanmıştır (p=0.028). Çalışma ve kontrol overinde apoptotik indeks açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 4.1: Grup A'da yer alan (n:7) sığanlarda primordial-primer-growing follikül gruplarındaki normal, atretik ve total follikül sayıları ile apoptotik index ortalamaları

Grup A (N:7)	P. Normal	P. Atretik	P. Total	Primer Normal	Primer Atretik	Primer Total	Growing Normal	Growing Atretik	Growing Total	Apoptoz
Kontrol Over	573,5 [409,1]	51,4 [67,0]	625 [388,7]	178,6 [88,4]	214,3 [78,1]	392,9 [158,6]	60 [50,5]	1252,1 [448,5]	1312,1 [442,7]	13,1 [15,6]
Çalışma Over	342,8 [251,1]	117,1 [61,0]	460,0 [269,0]	158,6 [76,5]	330,8 [126,4]	489,3 [165,2]	64,3 [53,6]	2041,4 [522,4]	2105,7 [534,5]	27,6 [32,4]
p Değeri	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.028	0.028	NS

p değeri: < 0.05 ise anlamlı ve değer belirtilmiştir
p değeri: >0.05 ise anlamsızdır ve NS olarak belirtilmiştir.
[]: SD değeridir.
P: Primordial

Şekil 4.2: Grup A'da yer alan sığanlarda primordial-primer-growing folükül gruplarındaki total folükül sayıları ile apoptotik index ortalamaları



4.2 Grup B

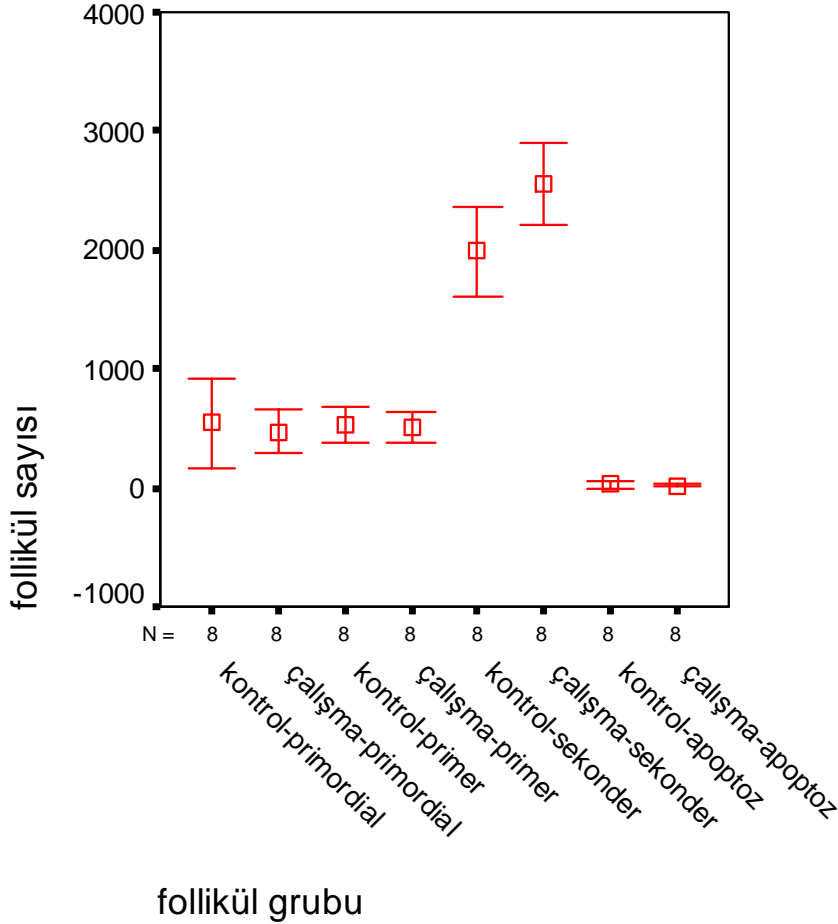
Grup B [Çalışmanın 0.gününde unilateral ooforektomi-kontrol over (4 sıçan'a sağ ooforektomi , 4 sıçan'a sol ooforektomi) ve çalışmanın 14. gününde relaparotomi ile kalan over-çalışma over çıkartıldığı grup] içersindeki primordial follikül, primer follikül, growing follikül gruplarının normal, atretik, total sayıları ve apoptotik indeks ortalama [SD] ile p değerleri tablo 4.2 ve şekil 4.3'de gösterilmiştir. Bu grupta primordial ve primer follikül açısından çalışma overinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış saptanmamış olup sadece growing atretik (P=0.025) ve growing total (P=0.017) follikül sayılarında anlamlı artış saptanmıştır. Çalışma ve kontrol overinde apoptotik indeks açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 4.2: Grup B’de yer alan sıçanlarda primordial-primer-growing folükül gruplarındaki normal, atretik ve total folükül sayıları ile apoptotik index ortalamaları

Grup B (N:8)	P. Normal	P. Atretik	P. Total	Primer Normal	Primer Atretik	Primer Total	Growing Normal	Growing Atretik	Growing Total	Apoptoz
Kontrol Over	475,6 [496,1]	67,5 [82,2]	543,1 [441,2]	190,6 [61,1]	344,4 [129,1]	535 [176,4]	113,7 [110,1]	1876,2 [386,6]	1990 [457,8]	24,7 [32,6]
Çalışma Over	350,6 [188,5]	120,0 [156,2]	470,6 [221,0]	229,4 [102,8]	266,9 [86,8]	506,2 [156,8]	108,7 [72,9]	2442,5 [381,7]	2551,2 [409,3]	20,7 [16,8]
p Değeri	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.025	0.017	NS

p değeri: < 0.05 ise anlamlı ve değer belirtilmiştir
p değeri: >0.05 ise anlamsızdır ve NS olarak belirtilmiştir.
[]: SD değeridir.
P: Primordial

Şekil 4.3: Grup B’de yer alan sıçanlarda primordial-primer-growing follükül gruplarındaki total follükül sayıları ile apoptotik indeks ortalamaları



4.3 Grup C

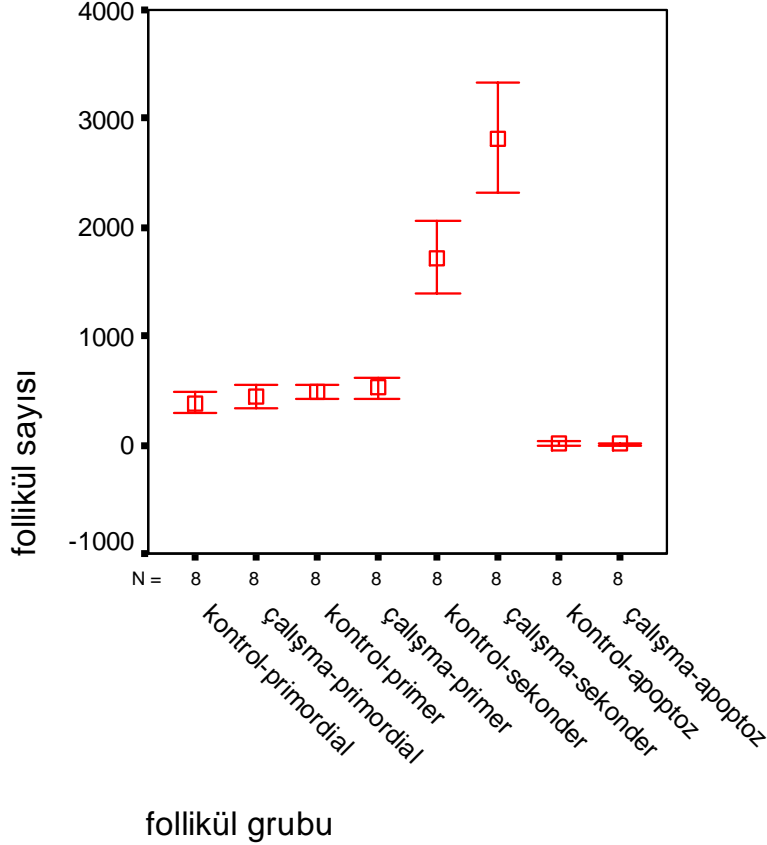
Grup C [Çalışmanın 0.gününde unilateral ooforektomi-kontrol over (4 sıçan'a sağ ooforektomi , 4 sıçan'a sol ooforektomi) ve çalışmanın 42. gününde relaparotomi ile kalan over-çalışma over çıkartıldığı grup] içersindeki primordial follikül, primer follikül, growing follikül gruplarının normal, atretik, total sayıları ve apoptotik indeks ortalama [SD] ile p değerleri tablo 4.3 ve şekil 4.4'te gösterilmiştir. Bu grupta primordial ve primer follikül açısından çalışma overinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış saptanmamış olup sadece growing normal ($p=0.036$), growing atretik ($P=0.012$) ve growing total ($P=0.012$) follikül sayılarında anlamlı artış saptanmıştır. Çalışma ve kontrol overinde apoptotik indeks açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 4.3: Grup C’de yer alan sıçanlarda primordial-primer-growing follikül gruplarındaki normal, atretik ve total follikül sayıları ile apoptotik indeks ortalamaları

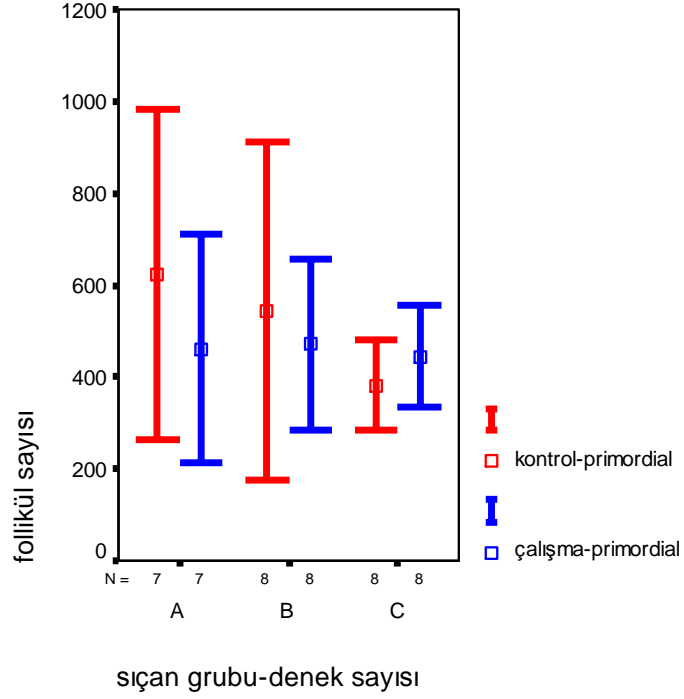
Grup C (N:8)	P. Normal	P. Atretik	P. Total	Primer Normal	Primer Atretik	Primer Total	Growing Normal	Growing Atretik	Growing Total	Apoptoz
Kontrol Over	290,0 [72,7]	91,2 [87,2]	381,2 [117,8]	208,8 [48,5]	278,1 [62,8]	486,9 [84,8]	68,1 [73,4]	1658,1 [356,0]	1726,2 [398,3]	13,5 [19,7]
Çalışma Over	390,0 [130,9]	55,0 [60,3]	445,0 [134,4]	216,9 [59,1]	306,2 [79,4]	523,1 [111,3]	135,6 [94,1]	2689,4 [610,4]	2825,0 [601,7]	9,6 [16,6]
p Değeri	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,036	0,012	0,012	NS

p değeri: < 0.05 ise anlamlı ve değer belirtilmiştir
p değeri: >0.05 ise anlamsızdır ve NS olarak belirtilmiştir.
[]: SD değeridir.
P: Primordial

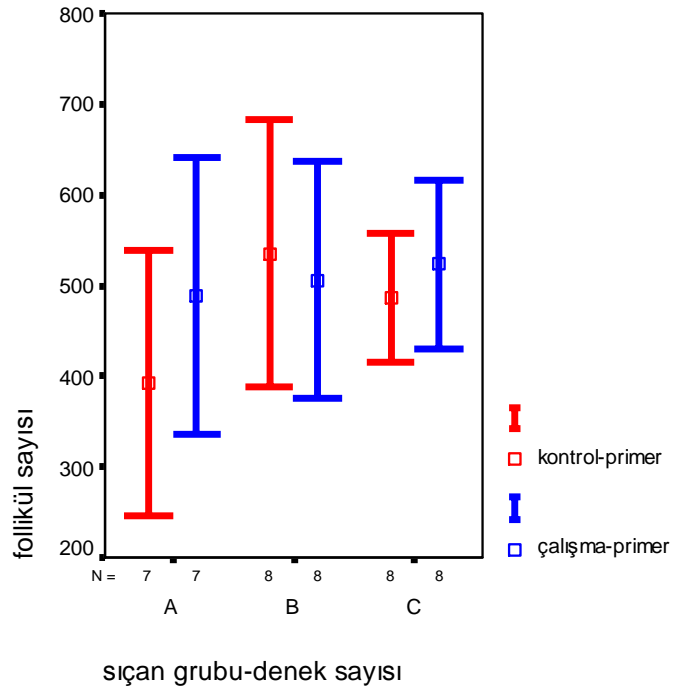
Şekil 4.4: Grup C’de yer alan sıçanlarda primordial-primer-growing folükül gruplarındaki total folükül sayıları ile apoptotik index ortalamaları



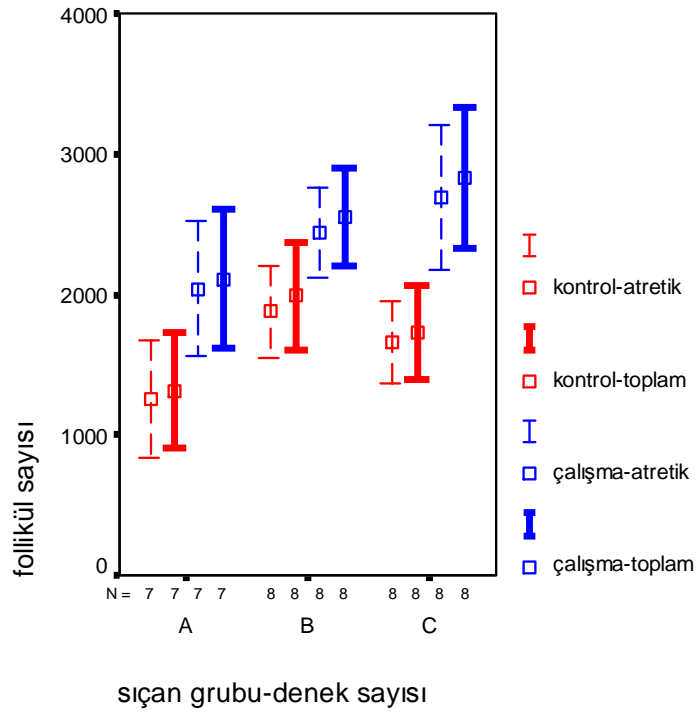
Şekil 4.5: A-B-C grubundaki sıçanlarda kontrol ve çalışma overlerindeki *primordial follüküllerin* sayısal değişimi



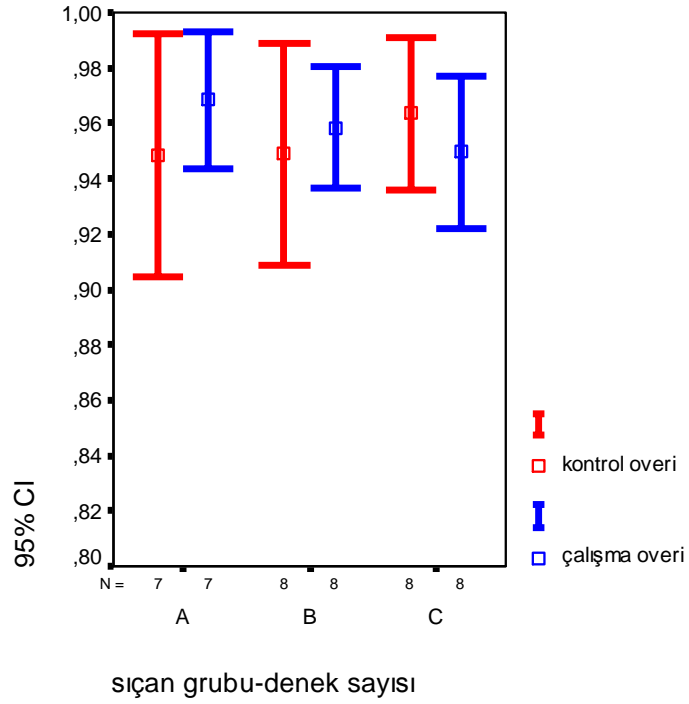
Şekil 4.6: A-B-C grubundaki sıçanlarda kontrol ve çalışma overlerindeki *primer follüküllerin* sayısal değişimi



Şekil 4.7: A-B-C grubundaki sıçanlarda kontrol ve çalışma overlerindeki *atretik growing* ve *toplam growing follüküllerin* sayısal gösterilmesi



Şekil 4.8: A-B-C grubundaki sıçanlarda kontrol ve çalışma overlerinde *atretik growing/toplam growing follükül oranı*



BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Gelişimsel biyoloji tarihinde; sabit bir teorinin kabul edilmesi nedeniyle, yeni hipotezlerin tartışılmadığı sık olmuştur (77). Greenfield ve Flaws'a göre, bilim tarihi uzun süreli paradigmalara kölece bağlanma nedeniyle olan şanssızlıklar ile doludur (78).

Erişkin memeli overinde neo-oogenez'in gerçekleşmediği, dişi memelilerin sınırlı ve kendini yenileyemeyen germ hücreler ile doğdukları doktrini yaklaşık yarım yüzyıl önce kabul görmüştür (79). O zamana dek neo-oogenez üzerine yapılan tartışmalara 1951 yılında Zuckerman 'deneysel ve sayısal veriler ışığında erişkin memeli overinde neo-oogenez gerçekleşmeyeceği' sonucunu noktayı koymuştur. Germ stem cell mitozunun over dışında gerçekleşip gerçekleşmeyeceği konusunda ise Zuckerman tarafından ifade edilen açıklama yoktu (1). O tarihten itibaren birçok araştırmacı Zuckerman'ı destekleyen veriler yayınladılar. Bunlardan en güçlüleri ise; Borum tarafından 1961'de yayınlanan leptotene, zygotene, pachytene ve erken diplotene figürleri'nin (mayoz bölünme duraklaması önce geçirilen 1.mayoz bölünme-profaz'ın basamakları) sadece memeli fetal overlerinde görüldüğü ve memeli erişkin overlerinde görülmediği verisi idi. Diğer de yine Borum tarafından 1967'de yayınlanan; 3H-thymidine (replikte olmakta olan DNA yapısına katılan radyoaktif işaretli thymidine-mitozdaki hücreleri gösterir) enjeksiyonu sonucu memeli erişkin overinde sayıca artabilen germ stem cell olmadığı verisi idi (2,80).

İlk defa olarak 2003'te Hubner ve ark. tarafından in vitro koşullarda fare embriyonik stem cell'den oosit elde edildi (81). Bunu takiben 2004 yılında Johnson ve ark. tarafından, Zuckerman'ın doktrinini yıkabilecek, postnatal memeli overinde oosit yapımını devam ettiren germ stem cell varlığına ilişkin bulgular olduğu yayınlandı (8). 2004 yılından beri üreme endokrinolojisi üzerine deneyimli birçok merkezde devam eden çalışmalarda; oosit yaşlanması, menopoz ve prematür ovarian yetmezlik üzerine yeni çığırar açabilecek olan 'postnatal memeli overinde oosit yapımını devam ettiren germ stem cell varlığı' hipotezi üzerine çalışılmaktadır.

Germ stem cell olabilirliği üzerine yapılmış en çarpıcı çalışma, Johnson ve ark. tarafından 2004'te Nature'da yayınlandı (8). Johnson ve ark. çok basamaklı olan bu çalışmanın ilk aşamasında; puberte dönemi C57BL/6-fareler'de 9,10-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)

[folliküler atreziyi başlatan kimyasal] enjeksiyonu ile folliküler apoptoz'un başlayıp atrezi oluşumu ve temizlenme sürecinin en fazla 72 saat sürdüğünü göstermişlerdir. Atretik folükül sayısı puberte döneminde 700 ile 1300 arasında iken non-atretik folükül sayısını 4000 civarında tesbit etmişlerdir. Bu hızda atrezi ve temizlenme ile devam eden süreçte haftalar içerisinde folliküllerin tamamen tükenmesi ve reproduktif fonksiyonların genç erişkin döneminde sonlanması beklenirken, C57BL/6-fareler'de 12 ay sonunda bile primordial ve growing follikül saptamışlardır. Çalışmaları'nın 2.aşamasında; ooforektomiden 1 saat önce 5-bromodeoxyuridine (BrdU) [hücre bölünmesini gösterir] enjeksiyonu yapıldığında Vasa homologue (MVH, germ hücrelerinde sentezlenen bir protein) açısından pozitif olan over yüzeyi büyük ovoid hücrelerinden bazılarının BrdU pozitif olduğu saptamışlardır.

Johnson ve ark. 2005 yılında Cell'de yayınlanan bir başka makalelerinde, yenilenmekte olan germ cell havuzu hipotezini desteklemekle birlikte bu hücrelerin kaynağı niteliğindeki stem cell için ise kemik iliğini düşünmüşlerdir (9). Yine çok basamaklı olarak yapılan bu çalışmanın ilk aşamasında; doxorubicin enjeksiyonunu takiben, primordial (2500'ten 500'e) ve total immatür (3500'ten 1000'e) follikül sayısında sağlanan anlamlı düşüşü takiben enjeksiyon sonrası 12. saatte primordial (500'den 1500'e) ve total immatür (1000'den 2500'e) follikül sayısında anlamlı artış saptanmış ve 2.ayda kontrol grubu ile aynı sayıda follikül tesbit edilmiş. Bu kadar hızlı yenilenmenin over yüzeyinde saptanan az sayıdaki germ cell öncüsü olabilecek büyük ovoid hücrelerden olamayacağını düşünen araştırmacılar, plastisite ile başka dokulardaki diferansiye hücrelerin oluşmu'nun en fazla olduğu kemik iliğini incelemişlerdir. Daha önceki çalışmalardan da bilinen germ cell markerlarını (Oct 4, Mvh, Dazl, Stella ve Fragilis), kemik iliğinde taramışlardır (83,84). Aynı zamanda female-germ-cell-specific homeobox geni nobox'un kemik iliğindeki varlığına bakmışlar. Dişi memeli germ cell spesifik olan bu markerları anlamlı olarak kemik iliği dokusunda saptamışlar. Bu çalışmanın bir sonraki aşamasında saptanan en çarpıcı bulgu ise, busulfan+cyclophosphomide ile sterile hale getirilen dişi farelere yapılan kemik iliği ve periferal kan hücresi transferini takiben yapılan morfolojik ovarian inceleme sonuçlarıdır. Transfer yapılmayan hayvanlardan farklı olarak kemik iliği transferi yapılan hayvanlarda resting primordial follikül evresi de dahil olmak üzere tüm evrelerden folliküller tesbit edilmiş ve oosit yapımının başladığı gösterilmiştir.

Klinik gözlemlerimize göre memelilerde tek taraflı ooforektomiye takiben kalan over reproduktif fonksiyonu üstlenmektedir. Bu konu ile ilgili yapılmış en çarpıcı araştırmalardan birisi; Levitas ve ark.'nın tek taraflı ooforektomi yapılmış hastalar ile her iki overi de mevcut hastaların in vitro fertilizasyon-embriyo transferi (IVF-ET) sonuçları'nı inceledikleri çalışmadır. İlginç bir şekilde tek taraflı ooforektomi uygulanmış hastalarda anlamlı şekilde daha yüksek gebelik oranları saptanmış (toplanan oosit ve transfer edilen embriyo sayıları her iki grupta aynı iken elde edilen gebelik oranı tek taraflı ooforektomi uygulanan grupta %52.9 iken her iki overi mevcut olan hasta grubunda bu oran %20.8'lerde kalmıştır) (82). Ooforektomi sonrası artan FSH sonucunda overde gerçekleşen endokrin ve parakrin kompanzatuvar mekanizmalar ile elde edilen matür oosit sayısı ve gebelik oranlarında negatif yönde etkilenme olmadığı, hatta artış olabileceği belirtilmiş ve bu hasta grubunda bulunan yüksek FSH seviyesinin over rezerv testlerinde yön gösterici olarak kullanılmaması gerektiği belirtilmiş (82).

Kurmuş olduğumuz bu deneysel çalışmada tek taraflı ooforektomi sonrası fizyolojik uyarılar ile, olması muhtemel over kaynaklı yada extraovarian (kemik iliği) kaynaklı germ stem cell aktivasyonu olabileceğini düşündük (8,9). Kalan overde (her iki overin follikülogenez işlevini tek başına üstlenmiş olduğu halde); kısa (A grubu)-orta (B grubu)-uzun (C grubu) dönemde follikül sayısının sabit kalacağı ve hatta artabileceği hipotezi ile follikül dinamiğini inceledik. Deney planımıza göre, eğer gerçekten germ stem cell mevcut ise tüm follikül gruplarında sayı sabit kalacak veya artacaktır; burada gerçek ovarian rezervinin göstergesi olarak düşündüğümüz primordial+primer follikül gruplarındaki değişim diğer gruplara nazaran daha büyük önem arz etmektedir.

Oluşturduğumuz her 3 grupta da primordial-primer follikül sayılarında ve apoptotik indekslerinde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. Çalışma süresince yaklaşık 1-2 menstruel siklus geçiren A grubundaki hayvanlarda growing atretik (P=0.028) ve growing total (P=0.028) follikül sayısında, B grubundaki hayvanlarda da growing atretik (P=0.025) ve growing total (P=0.017) follikül sayısında, C grubundaki hayvanlarda ise growing normal (P=0.036), growing atretik (P=0.012) ve growing total (P=0.012) follikül sayısında artış saptandı (tablo 4.1-4.3). Gerçek follikül rezervi olarak değerlendirdiğimiz primordial+primer follikül sayılarında çalışma ve kontrol overleri arasında geçen zamana rağmen anlamlı bir azalma saptanmaması (tablo 4.1-4.3 ve şekil 4.5-4.6) ve aynı zamanda growing follikül sayısı'nın 3 grupta da anlamlı olarak artması ilginçtir. Sonuçlarımızın bu şekilde olması ilk

bakışta 2 nedenle olabilir; 1) geçici ovarian kompanzasyon, 2) follikül rezervini yenileyebilen germ stem cell varlığı.

Günümüze dek unilateral ooforektomi deney düzeneği ile yapılmış bazı çalışmalarda ovarian kompanzasyon sonucu reproduktif fonksiyonun etkilenmediği bildirilmiştir (85-89). Ovarian kompanzasyon'un kurtarıcı yol olarak gösterildiği bu çalışmalarda sebep olarak bir çok mekanizma düşünülmüştür: i) azalan östrojen ve inhibin seviyesine bağlı olarak artmış FSH'ya ikincil olarak cohort'a katılan folliküllerin artması (90); ii) azalan serum progesteronuna bağlı olarak ovulatuvar boyuttaki folliküllerin yaşam sürelerinin uzaması (91), iii) afferent-efferent adrenerjik sinir sistemi yardımıyla folliküller'in yaşam süreleri'nin uzaması (92,93); iv) azalan atrezi ve artan recruitment'a bağlı follikül sayısı'nın fazla olarak saptanması (11,20-22); v) önceki folliküler dalgalardan gelen statik faz folliküller'in yaşam süreleri'nin uzaması (11). Bu çalışmaların hemen hepsinde hormonal inceleme yada overin görüntüleme yöntemleri (örn,USG) baz alınmıştır. Ayrıca 2004'e dek 'memelilerin artma potansiyeli olmayan germ cell havuzu ile doğdukları' fikri tartışılmaz bir doktrin olarak kabul edilmekteydi. Bu yüzden kurulan deney düzenekleri sabit bir havuzun reproduktif fonksiyonu nasıl kompanze edebileceğine yönelik fikirlerdi. Yapmış olduğumuz deneysel araştırma, tek taraflı ooforektomi sonrası morfolojik ve apoptotik değerlendirme ile germ cell'leri inceleyen literatürdeki ilk ve tek çalışmadır. Yukarıdaki mekanizmalardan hangisi olursa olsun tek sebep kompanzasyon olsaydı; en azından rezerv folliküllerin azalmasını yada folliküler statik yaşam süresinin artması ve atrezinin azalması nedeniyle atretik folliküllerin azalmasını beklerdik. Kurduğumuz deney planında ne rezerv havuzunda azalma olmuştur (şekil 4.5-4.6), ne de atretik follikül sayısında ve atrezi oranında (şekil 4.7-4.8) azalma olmuştur. Aynı zamanda her 3 grupta da kontrol ve çalışma overlerinde apoptotik indeksler açısından fark saptanmamıştır (tablo 4.1, 4.2, 4.3). Bu bize folliküler atrezi hızında değişiklik olmadığını göstermektedir. A,B ve C grupları'nın hepsinde de rezerv follikül sayıları aynı kalmış olup cohort'a katılan follikülleri temsil eden growing grubunda sayısal artış saptanmıştır (şekil 4.7). Özellikle uzun dönem etkiyi göstermekte olan C grubunda growing normal-atretik-total follikül sayıları artmıştır (tablo 4.3). Johnson ve ark.'nın atretik follikül temizlenme süreci olarak saptadıkları 72 saat'ide göz önüne alırsak rezerv sayısının aynı kalıp growing grubunun her üç grupta artması bize ek bir kaynağı düşündürmektedir.

Kerr ve ark. 2006 da C57BL/6-fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 7. gün follikül sayısı ile 100.gün follikül sayısı aynı bulmuşlardır. Overden kaybedilen follikül sayısı ilk 7

gün içersinde yaklaşık olarak 561 ± 85 /gün tesbit edilen bu hayvanlarda follükül sayısının bu süreç içersinde aynı kalmış olması 'germ hücreleri'nin halen sayıca artmakta olduğu fikrini destekler' olarak yorumlandı. Kerr ve ark.'nın çalışmasında, follükül sayısının zamanla birlikte belli bir dönem sabit kalabilmesinin atrezideki azalma nedeniyle olamayacağı bulgumuzu desteklemektedir (94).

21 günlük CBA/Ca farelerinde primordial havuzdan kaybolan total follükül sayısı 89 follükül/gün (48 ölüm ile 41 gelişim basamağına geçiş ile) olarak gösterilmiştir (8); biz çalışmamızda follükül kaybının yüksek dönemde olduğunu düşündüğümüz puberte evresindeki 75 günlük sıçanlarda yaptık. Kısa dönemden itibaren başlayarak, A grubu, uzun dönem olarak isimlendirdiğimiz C grubu da dâhil 3 grupta primordial ve primer follükül sayısında anlamlı düşüş olmaması ve growing follükül sayısında artış olması nedeniyle follükül sayısında artış ile olan desteğin ve dolayısıyla germ cell çoğalmasının akut dönemden itibaren gerçekleştiğini düşündürmektedir. Buda bize Johnson ve ark.'nın 2. çalışmalarında saptadıkları kemik iliği kaynaklı germ stem cell desteği verisinin (9), daha doğru olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü akut dönemden itibaren follükül rezervini sabit tutabilecek germ cell kaynağı aynen Johnson ve ark.'da belirttiği gibi (9), over yüzeyinde olduğu düşünülen az miktardaki stem cell kaynağından daha fazla potansiyele sahip, kemik iliği gibi, bir noktadan sağlanıyor olabilir .

Bugüne kadar ovarian follüküler dinamiğine ilişkin yapılan çalışmalarda morfolojik inceleme açısından birçok yöntem kullanılmıştır; birkısında alınan kesit kalınlığı arttırılıp azaltılmış, birkısında ise yapılan tüm kesitlerden farklı aralıklar ile inceleme yapılmıştır (75). Yapılan bu incelemelerde follükül sayıları arasında 16 kat'a dek olan sayısal değişiklikler saptanmıştır. Üç boyutlu bir yapı olan overdeki tüm follükülleri pratik olarak her çalışma için sayamadığımızdan dolayı gerçek follükül sayısına (95) %3-11 oranında en yakın rakamı verebilen, Johnson ve ark. ile birlikte diğer güncel araştırmaların kullandığı yöntemi uyguladık (8,9). 8 µm kalınlığında alınan her 5 kesitten bir tanesini incelemeye aldığımız bu zor ve zahmetli olan ve toplam 2392 kesit incelediğimiz yöntemle bile gerçek follükül sayısını verememekle birlikte literatür bilgisi ışığında gerçeğe en yakın verileri elde ettiğimizi düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; yapmış olduğumuz deneyde tek taraflı ooforektomi sonrası kalan overde yaklaşık 10-12 menstruel siklus sonrası (C grubu) bile follükül rezervi azalmamıştır. Buna karşılık cohort'u temsil eden growing grubunda follükül sayısı artmıştır. Ovaryan

kompanzasyon mekanizması'nın temeli olarak gösterilen *atrezideki azalma*'nın olmadığı, tam tersine atretik folliküllerin de arttığı gösterilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular ışığında; tek taraflı ooforektomi sonrası yeni follikül üretimi olduğunu ve bunun da en olası kaynağı'nın direkt olarak gösterilememiş olsada, germ stem cell (ovaryan veya ekstraovaryan kaynaklı) olduğunu düşünmekteyiz. Germ stem cell olabilirliği üzerine yapılan çalışmaların en büyük kısıtlılığı, henüz diğer dokulara ait somatik stem cell marker'ları gibi net bir marker'ın tesbit edilememiş olmasıdır. Ayrıca bu deneysel araştırma, tek taraflı ooforektomiye takiben morfolojik-apoptotik incelemenin yapıldığı ilk çalışmadır. Bu şekilde indirekt olarak stem cell varlığını araştırmaya yönelik çalışmaların, ovarian follikül sayısındaki değişim sebebini dahada fazla aydınlatabilmesi için C grubumuzdaki 42 gün izlenen hayvanlardan daha uzun izlenmesi uygun olabilir. Somatik germ stem cell varlığı üzerine yapılacak yeni çalışmalar ile daha fazla kanıt elde edebilir ve bir sonraki aşamada germ stem cell'i izole edebilirsek dışı reproduktif endokrinolojisi açısından devrim niteliğinde bir yenilik olacaktır.

BÖLÜM 6

KAYNAKLAR

- 1- Zuckerman S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Progress Hormone Research*. 1951;6:63–108.
- 2- Borum, K. Oogenesis in the Mouse. A study of meiotic prophase. *Exp. Cell Res.* 1961;24:495-507.
- 3- Peters H. Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1970;259:91-101.
- 4- McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1984;38:7-23.
- 5- Spradling AC, Drummond-Barbosa D & Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001;414,98–104.
- 6- Lin H. The fate of stem cells in the germline. *Annu. Rev. Genet.* 1997;31:455-491.
- 7- Lin H. The stem cell niche theory: lessons from flies. *Nature Rev. Genet.* 2002;3:931–940.
- 8- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK & Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004;428:145–150.
- 9- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 2005a;122:303–315.
- 10-Cooper GS, Thorp JM Jr. FSH levels in relation to hysterectomy and to unilateral oophorectomy. *Obstet Gynecol.* 1999;94(6):969-72.

- 11-Duggavathi R, Bartlewski PM, Barrett DM, Bagu E, Rawlings NC. Short- and Long-Term Effects of Unilateral Ovariectomy in Sheep: Causative Mechanisms. *Biol Reprod.* 2008 Mar;78(3):490-6.
- 12-Buehr M. The primordial germ cells of mammals: some current perspectives. *Experimental cell research.* 1997;232:194–207.
- 13-Sadler TW. Gametogenesis. Langmann's Medical Embriology 6th edition. Williams&Wilkins, Baltimore, USA. 1990;3–20.
- 14-Speroff L, Glass R, Kase N. Regulation of the Menstrual Cycle. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1999:226-230.
- 15-Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update.* 2005;11:461-471.
- 16-Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. Initiation of oogenesis in the human fetal ovarv: ultrastructural and squash preparation study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1986;155:189-195.
- 17-Gondos B, Bhiraleus P, Hobel GJ Ultrastruclural observations on germ cells in human fetal ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1971;110:644-652.
- 18-Telfer E. Natural history of the mammalian oocyte. *Reproductive BioMedicine Online.* 2007;15:288-295.
- 19-Baker TG 1963 A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royad Society of London. Series B* 158.417-433.

- 20-Adashi E. The Ovarian Follicular Apparatus. In: Adashi E, Rock J, Rosenwaks Z, eds. Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology. Vol 1. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher; 1996:18-40.
- 21-Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. Human Reproduction. 1992;7:1342-1346.
- 22-Gougeon A. Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. Endocrine Reviews. 1996;17:121-155.
- 23-Gougeon A. Some Aspects of the Dynamics of Ovarian Follicular Growth in the Human. Acta Europaea Fertilitatis. 1989;20:189-194.
- 24-Gougeon A, Ecochard R, Thalabard J. Age-related Changes of the Population of Human Ovarian Follicles: Increase in the Disappearance Rate of Non-Growing and Early-Growing Follicles in Aging Women. Biology of Reproduction. 1994;50:653-663.
- 25-Gougeon A. Dynamics for Human Growth: Morphologic, Dynamic and Functional Aspects. In: Leung P, Adashi E, eds. The Ovary. 2 ed. San Diego:Elsevier Academic Press; 2004:25-43.
- 26-Fritz M, Speroff L. The Endocrinology of the Menstrual Cycle: the Interaction of Folliculogenesis and Neuroendocrine Mechanisms. Fertility and Sterility. 1982;38(5):509-529.
- 27-Chabbert-Buffet N, Bouchard P. The Neuroendocrine Regulation of the Human Ovarian Cycle. Chronobiology International. 2001;18(6):893-919.
- 28-Roy S. Regulation of Ovarian Follicular Development: A Review of Microscopic Studies. Microscopy Research and Technique. 1997;27:83-96.

- 29-Oktay K, Briggs D, Gosden R. Onogeny of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Expression in Isolated Human Ovarian Follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;5(7):967-978.
- 30-Hodgen G. Biological Basis of Follicular Growth. *Human Reproduction*. 1989;4(Supplement):37-46.
- 31-Gougeon A. Dynamics of Follicular Growth in the Human: a Model from Preliminary Results. *Human Reproduction*. 1986;1(2):81-87.
- 32-Vanderhyden B. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 2002;7:2006-2022.
- 33-Bassett D. The Changes in the Vascular Pattern of the Ovary of the Albino Rat during the Estrous Cycle. *American Journal of Anatomy*. 1943;73:252-292.
- 34-Channing C, Kammerman S. Characteristics of Gonadotropin Receptors of Porcine Granulosa Cells During Follicle Maturation. *Endocrinology*. 1973;92:531-540.
- 35-Gougeon A. Dynamics of Follicular Growth in the Human: a Model from Preliminary Results. *Human Reproduction*. 1986;1(2):81-87.
- 36-Monnaeus D, Huet C, Besnard N, et al. Follicular Growth and Ovarian Dynamics in Mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1997;51(Supplement):2-23.
- 37-Hillier S. Current Concepts of the Roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reproduction*. 1994;9:188-191.
- 38-McNatty K, Hillier S, van den Boogaard A, Trimbo-Kemper T, Reichert L, Van Hall E. Follicular development during the luteal phase of the human menstrual Cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1983;56(1):1022-1031.

- 39-Baerwald A, Adams G, Pierson R. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biology of Reproduction*. 2003;69:1023-1031.
- 40-van Santbrink E, Hop W, van Dessel T, de Jong F, Fauser B. Decremental follicle stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. *Fertility and Sterility*. 1995;64(1):37-43.
- 41-Cecconi, S. & R. Colonna: Influence of granulosa cells and of different somatic cell types on mammalian oocyte development in vitro. *Zygote*.1996;4:305-307.
- 42-Heller, D.T. & R.M. Schultz: Ribonucleoside metabolism by mouse oocytes: metabolic cooperativity between the fully grown oocyte and cumulus cells. *J Exp Zool*. 1980;214:355-364.
- 43-Kumar, N.M.: Molecular biology of the interactions between connexins. *Novartis Found Symp*. 1999;219:6-16.
- 44-Juneja, S.C., Barr K.J, Enders G.C & Kidder G.M. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod*. 1999;60:1263-1270.
- 45-Orr-Urtreger A, Avivi A, Zimmer Y, Givol D, Yarden Y& Lonai P. Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus. *Development*. 1990;109:911-923.
- 46-Horie K, Takakura K, Taii S, Narimoto K, Noda Y, Nishikawa S, Nakayama H, Fujita J& Mori T. The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. *Biol Reprod*. 1991;45:547-552.
- 47-McGrath SA, Esquela AF& Lee SJ. Oocytespecific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol*.1995;9:131-136.

- 48-Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ & Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol.*1998;12:1809-1817.
- 49-Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer.* 1972;26: 239-257.
- 50-Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin.* 1997;53:451-465.
- 51-Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *Journal of Pathology.* 1984;142:67-77.
- 52-Kim M, Tilly JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochimica et Biophysica Acta* . 2004; 1644: 205– 210.
- 53-Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim C ve ark. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-32.
- 54-Du C, Fang M, Li Y, Li L ve ark. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
- 55-Verhagen AM, Ekert PG, Pusch M, Silke J ve ark. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.
- 56-Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G ve ark. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;171.
- 57-Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K ve ark. A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitors ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.

- 58-Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase 3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-84.
- 59-Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A ve ark. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278:294-98.
- 60-Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:239-52.
- 61-Tabarowski Z, Szołtys M, Bik M, Słomczyńska M. Atresia of large ovarian follicles of the rat. *Folia Histochem Cytobiol.* 2005;43(1):43-50.
- 62-Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-04.
- 63-Vaskivua TE, Tapanainen JS. Apoptosis in the human ovary. *Reproductive BioMedicine Online.* 2002;6(1):24-35.
- 64-Kirschstein R. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions.NIH report.2001;1-43.)
- 65-Reubinoff B.E, Pera M.F, Fong C.Y, Trounson A, and Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat. Biotechnol.*2000;18:399-404.
- 66-Thomson J.A and Marshall V.S. (). Primate embryonic stem cells. *Curr. Top.Dev. Biol.* 1998;38:133-165.
- 67-Brazelton T.R, Rossi F.M., Keshet G.I., and Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000;290:1775-1779.

- 68-Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, and Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19:180-192.
- 69-Junying Y, Thomson J.A. *Regenerative Medicine* 2006. NIH report 2006:1-35.
- 70-Lawson, K.A., and Hage, W.J. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found. Symp.* 1994;182:68–84.
- 71-Morrison S.J, Uchida N, and Weissman I.L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1995;11:35–71.
- 72-Rich I.N. Primordial germ cells are capable of producing cells of the hematopoietic system in vitro. *Blood*. 1995;86:463–472.
- 73-Herzog E.L, Chai L, and Krause D.S. Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood*. 2003;102:3483–3493.
- 74-Heike T, and Nakahata T. Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int. J. Hematol.* 2004;79:7–14.
- 75-Tilly JL. Ovarian follicle counts- not as simple as 1,2,3. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003;1:11-13.
- 76-Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*. 2005;11(2):162-178.
- 77-Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG & Andersen CY. Eggs forever? *Differentiation* 2005;73:438–446.
- 78-Greenfeld C & Flaws JA. Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. *BioEssays*. 2004;26: 829–832.

- 79-Gosden RG Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? Human Reproduction Update. 2004;10:193–195.
- 80-Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the origin of the mature ova. *Exp Cell Res.* 1967; 45:39–47.
- 81-Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science.* 2003; 300:1251–1256.
- 82-Levitas E, Furman B, Shoham-Vardi I, Lunenfeld E, Potashnik G. Treatment outcome in women with a single ovary versus patients with two ovaries undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;88(2):197-200.
- 83-Schöler, H.R, Hatzopoulos, A.K, Balling, R, Suzuki, N, and Gruss,P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J.* 1989;8:2543–2550.
- 84-Saitou, M, Barton, S.C, and Surani, M.A. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature.* 2002;418:293–300.
- 85-Lipschutz A. Dynamics of ovarian hypertrophy under experimental conditions. *Br J Exp Biol* 1925;2:331.
- 86-Biggers JD, Finn CA, McLaren A. Long-term reproductive performance of female mice: effect of removing one ovary. *J Reprod unexpected significantly high pregnancy rate among single Fertil* 1962;3:303.
- 87-Findlay JK, Cumming IA. The effect of unilateral ovariectomy on plasma gonadotropin levels, estrus and ovulation rate in sheep. *Biol Reprod* 1977; 17:178-183. 425

- 88-Peppler RD, Greenwald GS. Influence of unilateral ovariectomy on follicular development in cycling rats. *Am J Anat* 1970; 127:9-14.
- 89-Bast JD, Greenwald GS. Acute and chronic elevations in serum levels of FSH after unilateral ovariectomy in the cyclic hamster. *Endocrinology* 1977; 100:955-966.
- 90-D'Agostino J, Woodruff TK, Mayo KE, Schwartz NB. Unilateral ovariectomy increases inhibin messenger ribonucleic acid levels in newly recruited follicles. *Endocrinology* 1989; 124:310-317.
- 91-Vinoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 1999; 51:1351-1361.
- 92-Gibson WR, Ingram BW, Lee VW. Can reduced consumption of gonadotrophins account for ovarian compensation in unilaterally ovariectomized, immature mice injected with gonadotrophins? *J Reprod Fertil* 1979; 57:209-218.
- 93-Gerendai I, Marchetti B, Maugeri S, Roxas MA, Scapagnini U. Prevention of compensatory ovarian hypertrophy by local treatment of the ovary with 6-OHDA. *Neuroendocrinology* 1978; 27:272-278.
- 94-Kerr J B, Duckett R, Myers M, Britt K L, Mladenovska T, Findlay J K. Quantification of follicles in postnatal mouse ovary. *Reproduction*. 2006; 132: 95–109.
- 95-Hirshfield AN and Midgley AR Jr Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 1978;19:597-605.