



ARAŞTIRMA / RESEARCH

## Ovaryum yüzey epiteli primordial folikül ve primer folikül öncüsü yapılarına farklılaşıyor mu?

Does the ovarian surface epithelium differentiate into primordial follicle and primary follicle precursor structures?

Murat Serkant Ünal<sup>1</sup>, Mücahit Seçme<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Turkey

<sup>2</sup>Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Turkey

*Cukurova Medical Journal 2022;47(3):1256-1262*

### Abstract

**Purpose:** The aim of this study is to investigate the differentiation capacity of ovarian surface epithelial cells both in cell culture conditions and in ovarian tissue sections.

**Materials and Methods:** The ovaries of two prepubertal (4 weeks old) female rats were divided into small pieces and explant cell culture was created. Ovarian surface epithelium proliferating together with ovarian stromal cells in mixed cell culture was isolated and reproduced. In addition, ovarian surface epithelium was examined in histological sections of ovarian tissue and images were taken under the microscope.

**Results:** The morphological appearance of the ovarian surface epithelium was found to be cobblestone. In the count performed under phase contrast microscopy, it was observed that  $2 \times 10^6$  and  $3 \times 10^6$  cells were grown in the culture dishes, respectively. Primordial follicle-like structures were observed in some areas of the petri dishes. On the histological sections, primordial and primary follicle precursor structures were observed on the basement membrane.

**Conclusion:** Showing oocyte markers (Gdf-9, C-Mos, Zpc, Stella) and germ cell markers (Dazl, Vasa, Blimp1, Fragilis) both in cell cultures and in histological sections can give us valuable information in terms of monitoring the differentiation capacity of these cells.

**Keywords:** Ovarian surface epithelium, neoogenesis, primordial follicle, ovarian reserve, ovarian cancer

### Öz

**Amaç:** Ovaryum yüzey epiteli hücrelerinin farklılaşma kapasitelerini hem hücre kültürü şartlarında hem de ovaryum doku kesitlerinde araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** İki tane puberte öncesi dönemdeki (4 haftalık) dişi sıçanların ovaryumları küçük parçalara ayrılarak eksplant hücre kültürü oluşturuldu. Miks hücre kültüründe overyan stromal hücrelerle birlikte çoğalan ovaryum yüzey epiteli izole edilerek çoğaltıldı. Bununla birlikte ovaryum dokusunun histolojik kesitlerinde ovaryum yüzey epiteli incelenerek mikroskop altında görüntüleri alındı.

**Bulgular:** Ovaryum yüzey epitelinin morfolojik görünümünün parke taşı (cobblestone) şeklinde olduğu görüldü. Faz kontrast mikroskopisi altında yapılan sayımda kültür kaplarında sırasıyla  $2 \times 10^6$  ve  $3 \times 10^6$  hücrenin ürediği izlendi. Petri kaplarının bazı alanlarında primordial folikül benzeri yapıların oluştuğu görüldü. Histolojik kesitlerde ise bazal membranın üzerinde primordial ve primer folikül öncüsü yapıların olduğu gözlemlendi.

**Sonuç:** Hem hücre kültürlerinde, hem de histolojik kesitlerde oosit belirteçlerini (Gdf-9, C-Mos, Zpc, Stella) ve germ hücre belirteçlerini (Dazl, Vasa, Blimp1, Fragilis) göstermek bu hücrelerin farklılaşma kapasitelerini izlememiz açısından bizlere değerli bilgiler verebilir.

**Anahtar kelimeler:** Ovaryum yüzey epiteli, neoogenez, primordial folikül, ovaryum rezervi, ovaryum kanseri

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Mücahit Seçme, Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Turkey E-mail: mehtersecme@gmail.com  
Geliş tarihi/Received: 23.06.2022 Kabul tarihi/Accepted: 25.08.2022

## GİRİŞ

Ovaryumun yüzeyi bazı bölgelerde tek katlı kübik epitel ve yalancı çok katlı epitel; bazı bölgelerde ise yassı epitel ile döşelidir ve altında bazal membran vardır. Bazal membranın majör komponentleri, laminin, entaktin, heparin sülfat, proteoglikanlar, kollajen IV; minör komponentleri ise fibronektin, tenaskin, SPARC (osteonektin) ve fibulin'dir. Germinal epitel olarak bilinen sellüler tabaka mezovaryumu kaplayan mezotelyum ile devamlılık göstermektedir. Yüzey epiteli ile korteksin arasında sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer almaktadır. Silya, apikal mikrovillus, desmosom, integrin, kadherin ve tamamlanmamış sıkı bağlantılara (tight junction) sahip olan ovaryum yüzey epiteli tip 7,8,18 ve 19 sitokeratinleri içerir<sup>1-4</sup>.

Ovaryum korteks ve medulla'dan oluşmaktadır. Ovaryum folikülleri korteksin stromasında yerleşmiştir. Ovaryumun yapısal birimi olan foliküller, oositlere mikroçevre oluştururlar. Ovaryumdaki foliküllerin gelişimi hücre-hücre etkileşimleri, endokrin, otokrin ve parakrin faktörlerle gerçekleşir. Ovaryumda en çok bulunan folikül çeşidi primordial foliküldür ve bu yapı ovaryumun rezervini temsil eder. Primordial foliküller tek sıralı yassı folikül hücreleriyle çevrili bir primer oosit içerir. Puberteden sonra primordial foliküller seçilerek büyümeye başlarlar. Sırasıyla primer, sekonder ve graff folikül olarak gelişimlerini sürdürürler<sup>5</sup>. Oositin köken aldığı primordial germ hücreleri, embriyonik yolk kesesinin dorsal duvarının endoderminde belirir ve sonrasında gonadlara doğru göç eder ve çoğalır. Ovaryumda doğumdan itibaren kadınlarda sabit sayıda folikülü olduğu bilgisi ilk olarak 1870 yılında Alman anatomist-embriyolog Heinrich Waldeyer tarafından ortaya atılmıştır ve bu görüşe göre kadınlar postnatal yaşam boyunca azalan bir oosit rezervi içermektedir. Bir başka görüş ise kadınlarda doğumdan itibaren gelen sabit bir oosit rezervi olduğu, buna ilaveten uygun koşullarda aktive olan ve erişkinde oosit üretebilen bir hücre topluluğu olabileceğidir. Ovaryum yüzey epitelinin farklılaşma potansiyeli son yıllarda tartışmalı bir alan olmuş, overyan kök hücre (OKH) varlığından söz edilmeye başlanmıştır. Daha sonra birçok farklı görüş olmasına rağmen postnatal memeli ovaryumunda yeni oosit yapımının (neogenez) olup olmadığı konusu belirsizliğini sürdürmüştür<sup>2,6</sup>.

Bizim bu çalışmadaki amacımız ovaryum yüzey epiteli hücrelerinin farklılaşma kapasitelerini hem hücre

kültürü şartlarında hem de ovaryum doku kesitlerinde araştırmaktır. Çalışmamızda ovaryum yüzey epitelinden farklılaşmış primordial ve primer folikül yapıları tespit edilmiştir. Bu bulgular şimdiye kadar doğru olarak kabul edilen doğumdan itibaren sabit sayıda folikül olduğu hipoteziyle uyuşmamaktadır ve mikroskop altında tespit edilen ilk görüntülerdir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Ovaryum dokusunun alınması ve eksplant hücre kültürü

Bu çalışma için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 13.01.2022 tarihli -E-60758568-020-219916 sayılı kararı ile onay alınmıştır. Çalışmanın deneysel basamakları Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Histoloji-Embriyoloji AD. Hücre Kültürü laboratuvarı alt yapısı kullanılarak yazarlar tarafından gerçekleştirilmiştir. İki tane puberte öncesi dönemdeki (4 haftalık) dişi sıçanların ovaryumları steril şartlarda alındı (Resim-1).

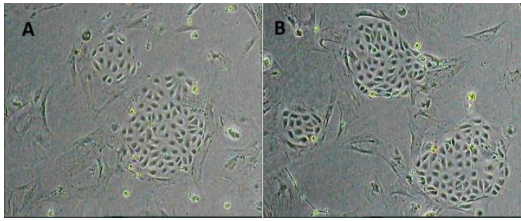
İlk önce stereo mikroskop altında çevresindeki adipoz doku eksize edildi. Daha sonra ovaryum dokusu petri kabında küçük parçalara ayrılarak eksplant hücre kültürü oluşturuldu. Miks hücre kültüründe, overyan stromal hücrelerle birlikte çoğalan yüzey epiteli hücrelerine bölgesel olarak işaretleme yapıldı ve lokal tripsinazasyon işlemi uygulanarak bu hücreler izole edildi. Adherent ovaryum yüzey epiteli hücreleri çoğalıp konflue olduktan (%70-80) sonra hücreler tripsin enzimi 0.25% (Hyclone, USA) ile kaldırıldı ve içinde komplet besiyeri olan iki yeni kültür kabına ekimleri yapıldı. Komplet besiyeri Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (Capricorn Scientific, Germany), Fetal Bovine Serum FBS (Capricorn Scientific, Germany), Penisilin-Streptomisin (Pan Biotech, Germany) içermektedir.

Hücreler çok hızlı proliferasyon gösterdiğinden kültür kaplarının medyumları her gün değiştirildi ve optimal kültür şartları oluşturuldu. Çoğalan hücreler canlılıklarının değerlendirilmesi için tripan blue ile boyandı ve hücre sayıları Neubauer Improved sayım kamarasıyla tespit edildi. Tüm bu aşamalar invert mikroskop (CKX41 Olympus, Japan) kullanılarak gözlemlendi. Devam eden pasajlarda çoğalan hücreler araştırmalarda kullanılmak üzere kriyoprezervasyon işlemi yapılarak kriyo tüpler içinde -80°C'de derin dondurucuya kaldırıldı. Dondurma vasatı olarak

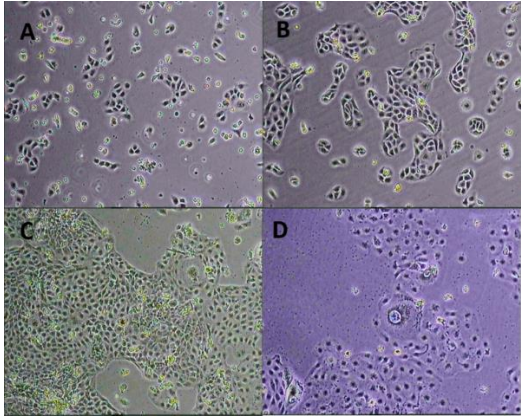
Dimetilsülfoksit (DMSO) ve DMEM karışımı kullanıldı.



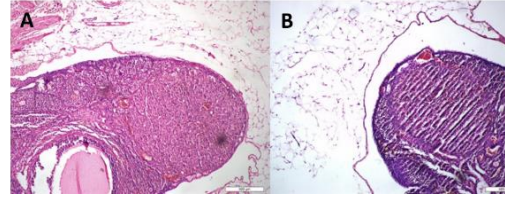
Resim-1. Sıçan ovaryumlarının eksize edilmesi.



Resim-2. Kültüre edilen (miks kültür) overyan stromal hücrelerin ve ovaryum yüzey epitelinin (A-B) faz kontrast mikroskopisi altındaki (x10) morfolojik görünüşleri.



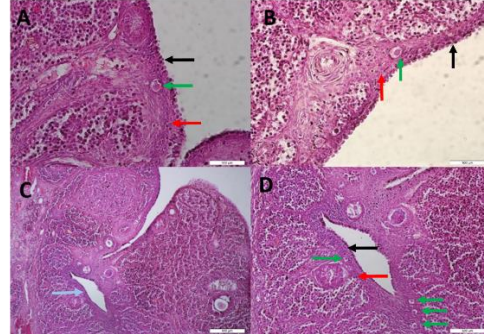
Resim-3. Ovaryum yüzey epitelinin pasajının (P1) yapıldıktan sonra 1. gün (A) ve 2. gün (B) faz kontrast mikroskopisi altındaki (x10) morfolojik görünüşleri. 4. günde oluşan içinde oosite ve çevresindeki granuloza hücrelerine benzeyen (C-D) primordial folikül benzeri yapılar.



Resim-4. Ovaryum yüzey epitelinin bitişiğinde fibroblast hücrelerini içeren fibröz kılıf ve ovaryumun çevresindeki (A-B) peri-overyan adipoz dokusunun ışık mikroskopisi altındaki (x10) görünümü

### Histolojik görüntülerin alınması

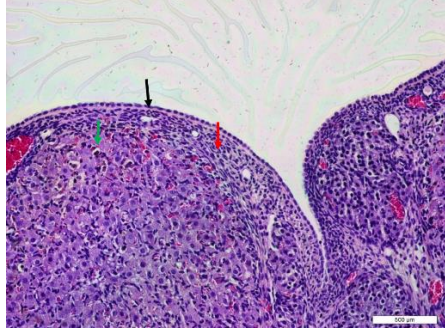
Bir sonraki adımda ise “Deneysel olarak siklofosamid ile overyan yetmezlik oluşturulan sıçanlarda over dokusu kaynaklı stromal kök hücrelerin ovaryum dokusu üzerine olası iyileştirici etkileri” isimli projeye ait olan (8 haftalık kontrol grubundaki sıçanların) ovaryum doku kesitlerinde, yüzey epitelinin ışık mikroskopisi (BX51 Olympus, Japan) altında görüntüleri alındı.



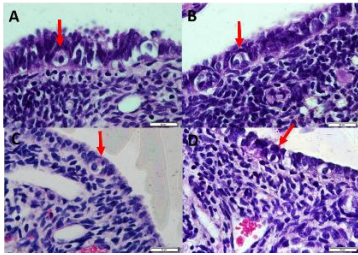
Resim-5. Ovaryum yüzey epitelinin hemen altındaki tunika albuginea'daki (A-B) primordial foliküller. Ovulasyondan sonra inklüzyon kistlerinin oluşumuna neden olan invagine olmuş yüzey epiteli ve tunika albugineanın bir bölümü; siyah okla gösterilen ovaryum yüzey epiteli, yeşil okla gösterilen primordial folikül, kırmızı okla gösterilen tunika albuginea tabakasıdır. (C-D) ve içerdiği primordial foliküllerin ışık mikroskopisi altındaki (x10-x20) görünümü; mavi okla gösterilen inklüzyon kisti (C), siyah okla gösterilen ovaryum yüzey epiteli, yeşil okla gösterilen primordial folikül, kırmızı okla gösterilen tunika albuginea tabakasıdır (D).

## BULGULAR

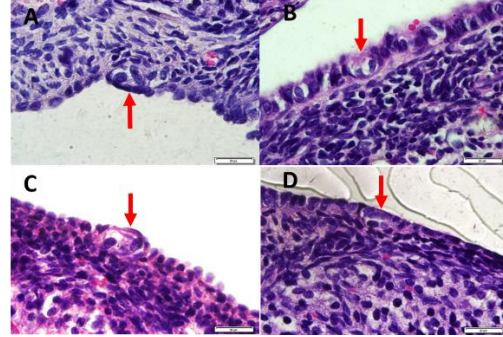
Hücreler ovaryumun doku parçalarından yaklaşık olarak 3 gün sonra migrasyona uğramaya başladı. 7. Günde overyan stromal hücreler ve ovaryum yüzey epiteli hücrelerinin (miks hücre kültürü) petri kabını doldurduğu görüldü. Overyan stromal hücrelerin morfolojik görünümünün fibroblast benzeri hücreler olduğu, ovaryum yüzey epitelinin ise parke kaldırımı (cobblestone) şeklinde olduğu görüldü (Resim-2). Yapılan ilk pasajda (P1) hücrelerin 4. günde konflue olarak petri kabını doldurdukları izlendi.



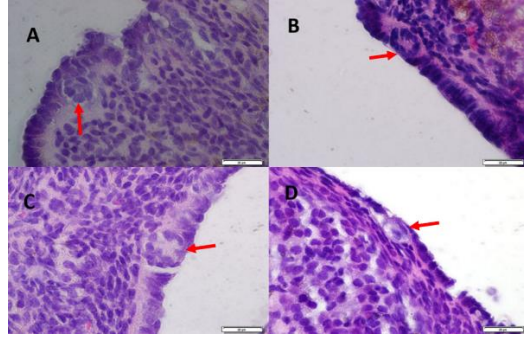
Resim-6. Tek katlı ovaryum yüzey epiteli ve hemen altındaki tunika albugineanın ışık mikroskopisi altındaki (x10) görünümü; yeşil okla gösterilen corpus luteum, siyah okla gösterilen ovaryum yüzey epiteli,, kırmızı okla gösterilen tunika albuginea tabakasıdır.



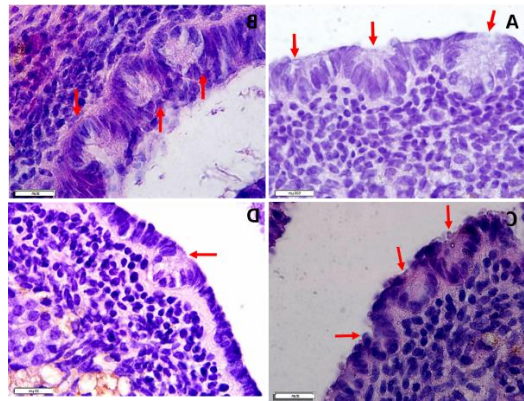
Resim-7. Bazal membranın üstüne dizilmiş ve farklılaşmış ovaryum yüzey epiteli hücrelerinin ışık mikroskopisi altındaki (x100) görünümüleri A)primordial folikül B)primer folikül C-D) primordial folikül.



Resim-8. Tunika albuginea'nın üstünde bazal membran boyunca dizilmiş ve farklılaşmış ovaryum yüzey epiteli hücrelerinin ışık mikroskopisi altındaki (x100) görünümüleri A)primer folikül B) primordial folikül C-D) primer folikül



Resim-9. Tunika albuginea'nın üstünde bazal membran boyunca dizilmiş ve farklılaşmış ovaryum yüzey epiteli hücrelerinin ışık mikroskopisi altındaki (x100) görünümüleri A-B-C) primer folikül D)primordial folikül.



Resim 10. Ovaryum yüzey epitelinde gelişen primer folikül benzeri yapılar (x100) görünümüleri A-B-C-D) primer folikül

Faz kontrast mikroskopisi altında yapılan sayımda kültür kaplarında sırasıyla  $2 \times 10^6$  ve  $3 \times 10^6$  hücrenin ürediği gözlemlendi. Bazı alanlarda ise primordial folikül benzeri yapıların oluştuğu görüldü (Resim-3). Histolojik kesitlerde (hematoksilen-eozin ile boyanmış) yapılan çalışmalarda ise bazı bölgelerde, yalancı çok katlı yüzey epitelinin aralarında ve bazal membranın üzerinde primordial folikül ve primer folikül öncüsü yapıların olduğu gözlemlendi (Resim-7-8-9).

## TARTIŞMA

Hücre kültür ortamında yapılan çalışmalarda ovaryum yüzey epiteli izole edilmiş; proliferasyon özellikleri ve morfolojileri incelenmiştir<sup>7,8</sup>. Hem epitelyal (sitokeratin) hem de mezenkimal belirteçleri (vimentin) ifade eden ovaryum yüzey epitelinde FSH, androjen, progesteron, östrojen ve TSH reseptörlerinin bulunduğu gösterilmiştir<sup>9-13</sup>. Ovaryum yüzey epitelinin mezoderm kökenli olduğu bilinmektedir. Ovaryum kanserlerinin yaklaşık olarak %90'undan fazlasına neden olan yüzey epitelinde Oct 4, Stella, C-Kit ve Nanog gibi kök hücre belirteçleri ekspres edilir<sup>2,14</sup>. Overyan siklusa yüzey epiteli sıklık değişikliklere bağlı olarak morfolojik değişikliklere uğrar ve proliferer olur. Ovulasyondan sonra, ovaryum yüzey epiteli hasarlı bölgelerin onarımına yardımcı olmaktadır<sup>15</sup>. Deney hayvanlarında ovaryum yüzey epitelinin ileri yaşlarda katlantılara sahip olduğu ve yapısının düzensizleştiği bildirilmiştir<sup>16</sup>. Bazı durumlarda ovulasyondan sonra ovaryum yüzey epitelinin bir kısmı korteks bölgesine doğru invagine olur ve bir miktar tunika albuginea ile birlikte mevcudiyetini sürdürür. İnklüzyon kistleri olarak bilinen bu yapılar ultrasonografi incelemelerinde görülmez ve malign değişikliklere uğrama eğiliminde olabilir<sup>1</sup>. Kesitlerde tespit ettiğimiz inklüzyon kistlerinde primordial foliküllerin varlığı gözlemlendi (Resim-5).

Daha önceleri germinal epitel olarak bilinen ovaryum yüzey epiteli ile ilgili olarak birçok araştırma yapılmıştır. Bukosky ve ark. yaptıkları çalışmada kazıntıyla elde ettikleri ovaryum yüzey epitelinden oosit benzeri hücrelerin ve granuloza hücrelerinin farklılaştığını bildirmişlerdir<sup>17</sup>. Klunt ve ark. kazıma ile elde ettikleri materyalden overyan kök hücreleri izole ettiklerini ileri sürmüşlerdir. Bu hücrelerin SSEA-4, OCT4, NANOG, SOX2 VE C-KIT gibi kök hücre belirteçlerini ifade ettiklerini bildirmişlerdir<sup>18-20</sup>. Bhartiya ve ark. yaptıkları çalışmada ovaryum yüzey epiteli kazıntılarında iki

farklı boyutta hücre popülasyonu tespit etmişlerdir. Bunlardan daha küçük boyutta olan (3–5µm) VSELs'in (çok küçük embriyon benzeri kök hücreler) nükleer olarak OCT4'ü ifade ettiği belirtilirken, büyük boyutta olan (8 µm'den fazla) hücrelerin ise (overyan kök hücre) sitoplazmik olarak OCT4'ü ifade ettiğini göstermişlerdir<sup>11</sup>.

Johnson ve ark. farelerde overyan kök hücrelerin ovaryum yüzey epitelinde bulunduğunu ve postnatal foliküler yenilenmeyi sürdürdüklerini iddia etmişlerdir. Daha sonrasında ise kemik iliği ya da periferik kanın overyan kök hücreler için depo görevi gördüğünü ve bu hücrelerin ovaryuma doğru göç ettiklerini ileri sürmüşlerdir. Erişkin dişi fare kemik iliğinde Mvh, Dazl, Stella ve Fragilis olarak adlandırılan germ hücre belirteçleri izole edilmiştir. Birçok çalışmadaki veriler overyan kök hücrelerin overyan yüzey epitelinde bulunduğunu ve yetişkin yaşamında hem neogenez hem de ovaryum kanserinden sorumlu olabileceğini göstermektedir. Overyan kök hücre olduğu düşünülen hücrelerin karakterizasyonlarının yapılarak izole edilmesi infertilite, prematür overyan yetmezlik, gibi üreme kapasitesini etkileyen durumlarda ayrıca kemoterapi almış kadınlarda fertilitenin sürdürülebilmesi için oldukça önem taşıyabilir. Bu hücrelerin çoğalmasındaki zorlukların aşılması ve farklılaşabilme potansiyellerinin gösterilmesiyle birlikte tedavi amaçlı olarak kullanılabilmesi yolunda önündeki engeller kalkabilir<sup>21-26</sup>. Diğer yandan preantral foliküllerin in vitro kültür ortamında gelişmelerini sürdürmeleri ve olgun (MII) oosit elde edilmesi yönünde de birçok çalışma yapılmaktadır. Kemoterapi alan kadınlarda ovaryum kortikal biyopsilerinin çıkarılması ve dondurularak saklanması fertilitenin korunması açısından önemli bir adımdır. Fakat bu dokuların transplantasyonu tüm hastalar için uygun bir seçenek olmayabilir. Olgun oositin oluşmasını sağlayan in vitro sistemlerin IVG-IVM (in vitro büyüme ve in vitro matürasyon) geliştirilmesiyle birlikte fertilitenin geri kazanılması sağlanabilir. Bazı araştırmacılar izole ettikleri primordial folikülleri matrijel veya alginat hidrojel içinde enkapsüle ederek ve in vitro aktivasyonunu yaparak folikül gelişmelerinin (primer-sekonder-graaf folikül) tamamlanmasını sağlamışlardır<sup>27-33</sup>.

Histolojik kesitlerde ovaryumun bazı bölümlerinde yüzey epitelinin hemen üstünde içinde fibroblastların olduğu fibröz bir kılıfın olduğu görülmüştür (Resim-4). Bu fibröz kılıf ovaryumun çevresindeki adipoz doku (peri-overyan adipoz doku)

ile ovaryum yüzey epiteli arasında bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda peri-overyan adipoz dokunun ovaryumdaki foliküllerin gelişimlerini sağladığı bildirilmiş ve bu dokunun ovaryumun fonksiyonları için önemli olduğu gösterilmiştir<sup>34-36</sup>.

Sonuç olarak, bazı kaynaklarda ovaryumun korteks bölgesi, yüzey epitelinden medullaya kadar olan bölüm olarak belirtilmişken bazı kaynaklarda ise bu bölge tunika albugineadan sonraki kısım olarak gösterilmiştir. Çalışmamızda ovaryumun korteks bölgesinin yanı sıra, tunika albugineada da primordial ve primer foliküller gözlemlendi (Resim-5). Ayrıca histolojik kesitlerde bazı bölgelerde yüzey epitelinden farklılaşmaya başlayan, bazal membranın üzerine dizilmiş primordial folikül ve primer folikül benzeri yapılar tespit edildi (Resim-7-8-9-10-11). Bazal membran ovaryum yüzey epiteli ve tunika albuginea arasında yer almaktadır. Görüntüleme çalışmalarımızda özellikle bu membranın üzerinde farklılaşan yüzey epitel hücrelerini göstermeyi amaçladık (Resim-6).

Ovaryumun eksplant kültürlerinde overyan stromal hücreler, peri-overyan adipoz dokudan köken alan mezenkimal hücreler ve yüzey epiteli hücrelerinin, hem hücre-hücre etkileşimi hem de salgıladıkları parakrin faktörlerle aynı in vivo ortamda olduğu gibi birbirlerinden sinyal aldıkları düşünülmektedir. Ovaryum yüzey epitelinin yanı sıra overyan stromal hücrelerin ve peri-overyan adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin ko-kültürleri yapılarak hücrelerin birbirleriyle etkileşimlerinin gösterilmesi, bizlere oositlerin ve granüloza hücrelerinin içinde bulunduğu mikroçevre-makroçevre ve foliküllerin gelişim basamakları hakkında fikirler verebilir (Resim-4). Hem hücre kültürlerinde hem de histolojik kesitlerde, oosit belirteçlerinin (Gdf-9, C-Mos, Zpc, Stella) ve germ hücre belirteçlerinin (Dazl, Vasa, Blimp1, Fragilis) gösterilmesi sonucu bu hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin ve davranışlarının anlaşılmasıyla birlikte infertilite ve ovaryum kanseri tedavilerinde yeni stratejiler geliştirilebilir. Çalışmamızda bazı kısıtlılıklar da mevcuttur. Çok küçük boyutta oldukları için ve bazen lokalizasyonları nedeniyle hücrelerin her zaman tam olarak boyanamadıkları gözlemlenmiştir. Ayrıca hücreler seri kesitlerde bile bir kesitte görülürken bir sonraki kesitte tespit edilememiş ve sadece x1000'lik büyütmelemede immersiyon yağı altında gözlemlenmiştir.

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/Tasarımı: MSÜ, MS; Veri toplama: MSÜ, MS; Veri analizi ve yorumlama: MSÜ, MS; Yazı taslağı: MSÜ, MS; İçeriğin eleştirel incelenmesi: MSÜ, MS; Son onay ve sorumluluk: MSÜ, MS; Teknik ve malzeme desteği: MSÜ; Süpervizyon: MSÜ, MS; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

**Etik Onay:** Bu çalışma için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 13.01.2022 tarih ve 2022/01 sayılı kararı ile etik onay alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Author Contributions:** Concept/Design : MSÜ, MS; Data acquisition: MSÜ, MS; Data analysis and interpretation: MSÜ, MS; Drafting manuscript: MSÜ, MS; Critical revision of manuscript: MSÜ, MS; Final approval and accountability: MSÜ, MS; Technical or material support: MSÜ; Supervision: MSÜ, MS; Securing funding (if available): n/a.

**Ethical Approval:** For this study, ethical approval was obtained from the Pamukkale University Animal Experiments Ethics Committee with the decision dated 13.01.2022 and numbered 2022/01.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support

## KAYNAKLAR

1. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology and pathology. *Endocr Rev.* 2001;22:255-88.
2. Xu J, Zheng T, Hong W, Ye H, Hu C, Zheng Y. Mechanism for the decision of ovarian surface epithelial stem cells to undergo neo-oogenesis or ovarian tumorigenesis. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50:214-232.
3. Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang FL, Moravec MB, Xu M, Padmanabhan V et al. The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction.* 2020;160:25-39.
4. Chichi CDC, Smith ER, Yang DH, Roland IH, Vanderveer L, Cohen C et al. Dynamic alterations of the extracellular environment of ovarian surface epithelial cells in premalignant transformation, tumorigenicity, and metastasis. *Cancer.* 2002;15:95:1802-15
5. Ross MH, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas.* (Çeviri Eds Baykal B, Ankara) Palme Yayıncılık, 2014.
6. Seghinsara AM, Banimohammad M. New facts about ovarian stem cells: the origin and the fate. *Int. J. Women's Health Reprod. Sci.* 2018;6:127-133.
7. Kruk PA, Bandiera SLM, Auersperg N. A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab Invest.* 1990;63:132-6.
8. Dunfield LD, Shepherd TG, Nachtigal MW. Primary culture and mRNA analysis of human ovarian cells. *Biol Proced Online.* 2002;28:55-61.
9. Okamoto S, Okamoto A, Nikaido T, Saito M, Takao M, Yanaiharu N et al. Mesenchymal to epithelial transition in the human ovarian surface epithelium focusing on inclusion cysts. *Oncol Rep.* 2009;21:1209-14.
10. Edmondson RJ, Monaghan JM, Davies BR. The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. *Br J Cancer.* 2002;18;86:879-85.

11. Bhartiya D, Singh J. FSH–FSHR3–stem cells in ovary surface epithelium: basis for adult ovarian biology, failure, aging, and cancer. *Reproduction*. 2015;149:35-48.
12. Wong AST, Leung PCK. Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *J Obstet Gynaecol Res*. 2007;33:3–16.
13. Huang WL, Li Z, Lin TY, Wang SW, Wu FJ, Luo CW. Thyrostimulin-TSHR signaling promotes the proliferation of NIH:OVCAR-3 ovarian cancer cells via trans-regulation of the EGFR pathway. *Sci Rep*. 2016;7:27471.
14. Murdoch WJ, McDonnell AC. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction*. 2002;123:743-50.
15. Gaytán M, Sánchez MS, Morales C, Bellido C, Millán Y, de Las Mulas JM. et al. Cyclic changes of the ovarian surface epithelium in the rat. *Reproduction*. 2005;129:311-2.
16. Mara JN, Zhou LT, Larmore M, Johnson B, Rebecca Ayiku R, Amargant F. et al. Ovulation and ovarian wound healing are impaired with advanced reproductive age. *Aging*. 2020;12:9686-9713.
17. Bukovsky A. Ovarian stem cell niche and follicular renewal in mammals. *Anat Rec. (Hoboken)*. 2011;294:1284-306.
18. Klun IV, Skutella T, Hren M, Gruden K, Cvjeticanin B, Vogler A. et al. Isolation of small SSEA-4-positive putative stem cells from the ovarian surface epithelium of adult human ovaries by two different methods. *Biomed Res Int*. 2013;690415
19. Klun IV, Skutella T, Stimpfel M, Sinkovec J. Ovarian surface epithelium in patients with severe ovarian infertility: a potential source of cells expressing markers of pluripotent/multipotent stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2011;381928.
20. Klun IV, Zech N, Rozman P, Vogler A, Cvjeticanin B, Klemenc P et al. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*. 2008;76:843-56.
21. Martin JJ, Woods DC, Tilly JL. Implications and current limitations of oogenesis from female germline or oogonial stem cells in adult mammalian ovaries. *Cells*. 2019;8:93.
22. Galateanu AAG, Hinescu ME, Enciu AM. Ovarian adult stem cells: hope or pitfall? *J Ovarian Res*. 2014;7:71.
23. Bharti D, Jang SJ, Lee SY, Lee SL, Rho GJ. In vitro generation of oocyte like cells and their in vivo efficacy: how far we have been succeeded. *Cells*. 2020;9:557.
24. Hanna C, Hennebold J. Ovarian germline stem cells: an unlimited source of oocytes? *Fertil Steril*. 2014;101:20–30.
25. Clarkson YL, McLaughlin M, Waterfall M, Dunlop CE, Skehel PA, Anderson RA et al. Initial characterisation of adult human ovarian cell populations isolated by DDX4 expression and aldehyde dehydrogenase activity. *Sci Rep*. 2018;8:6953.
26. Özakpınar ÖB, Maurer AM, Özsavcı D. Ovarian stem cells: from basic to clinical applications. *World J Stem Cells*. 2015;7:757-68.
27. Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. In vitro culture and in vitro maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertil Steril*. 2002;77:373-83.
28. Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and non-human primates. *Fertil Steril*. 2013;99:1523-33.
29. Wang JJ, Ge W, Liu JC, Klinger FG, Dyce PW, Felici MD et al. Complete in vitro oogenesis: retrospects and prospects oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Cell Death Differ*. 2017;24:1845–185.
30. Yang Q, Zhu L, Jin L. Human follicle in vitro culture including activation, growth, and maturation: a review of research progress. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:548.
31. Jin SY, Lei L, Shikanov A, Shea LD, Woodruff TK. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertil Steril*. 2010;93:2633-9.
32. Güzel Y, Oktem Ö. Understanding follicle growth in vitro: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from in vitro-grown follicles in human? *Mol Reprod Dev*. 2017;84:544-59.
33. Bertoldo MJ, Walters KA, Ledger WL, Gilchrist RB, Mermillod P, Locatelli Y. In-vitro regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies. *Reprod Biomed Online*. 2018;36:491-9.
34. Yang L, Chen L, Lu X, Tan A, Chen Y, Li Y et al. Peri-ovarian adipose tissue contributes to intraovarian control during folliculogenesis in mice. *Reproduction*. 2018;156:133-44.
35. Zhu M, Shen Q, Li X, Kang J. Removal of peri-ovarian adipose tissue affects follicular development and lipid metabolism. *Biol Reprod*. 2020;103:1199–208.
36. Zhang L, An G, Wu S, Wang J, Yang D, Zhang Y. et al. Long-term intermittent cold exposure affects peri-ovarian adipose tissue and ovarian microenvironment in rats. *J Ovarian Res*. 2021;14:107.