

**T.C.**  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OOSİT OLGUNLAŞMASINDA**  
**NİTRİK OKSİTİN ROLÜ**

**Arş. Gör. HAKAN DARICI**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Meral ÖNCÜ**

**Tez No: 38**  
**2007 - ISPARTA**

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OOSİT OLGUNLAŞMASINDA  
NİTRİK OKSİTİN ROLÜ**

**Arş. Gör. HAKAN DARICI**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Meral ÖNCÜ**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından**

**1498-YL-07 Proje numarası ile desteklenmiştir**

**Tez No: 38  
2007-İSPARTA**

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı**  
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27.08.2007

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Meral ÖNCÜ  
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Doç Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Histoloji ve Embriyoloji A.D. Başkanı

Üye : Doç Dr. Meral ÖNCÜ  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Histoloji ve Embriyoloji A.D.

Üye : Doç. Dr. Ahmet KOYU  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fizyoloji A.D.

ONAY : Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halis KÖYLÜ  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanması ve düzeltilmesi ve deneylerle ilgili her konuda bana yardımcı olan danışmanım Sayın Doç. Dr. Meral ÖNCÜ başta olmak üzere, tezin her aşamasında beni destekleyen anabilim dalı başkanımız Sayın Doç. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e, gerek IVF laboratuvarında uygulanan teknikleri tanıtmada gerekse deneyler konusunda, bana büyük yardımları dokunan Sayın Prof. Dr. Firdevs GÜRER'e, beni üreme biyolojisi ile çalışmaya yönlendiren eski danışmanım Doç. Dr. Meltem ÖZGÜNER'e, ve bana kaliteli bilimsel çalışmaların nasıl olması gerektiğini öğreten tüm sevgili hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim. Bana deneylerimde kullandığım laboratuvar tekniklerini öğreten TUBİTAK GMBAE ekibine ve bunları geliştirmeme yardımcı olan başta Dr. Fulya KÜÇÜK, olmak üzere tüm Osmangazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji A.D. araştırma görevlilerine yardımları için teşekkür ederim. Son olarak gerek deney materyalleri gerek yardımları gerekse deneyimleri ile beni destekleyen anabilim dalımız araştırma görevlileri, Dilek ULUSOY KARATOPUK, Dilek BAYRAM, İ. Aydın CANDAN, Gülsüm KAHVECİ, Ahmet KOÇAK ve Kanat GÜLLE'ye, Tıbbi Biyoloji A.D. öğretim üyeleri Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK ve Yrd. Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU ile araştırma görevlileri Barış YAŞAR, Ayşe YİĞİT, Esin SAKALLI ÇETİN ve Mustafa SOYÖZ'e ve Anatomi A.D. araştırma görevlisi Hilal EVCİL'e içtenlikle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	2
ÖNSÖZ.....	3
İÇİNDEKİLER.....	4
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	6
ŞEKİLLER, TABLOLAR VE RESİMLER DİZİNİ.....	8
1. GİRİŞ.....	11
2. GENEL BİLGİLER.....	14
2.1. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi (Folikülogenezis) .....	14
2.1.1. Primordiyal Foliküller.....	15
2.1.2. Primer Foliküller .....	16
2.1.3. Sekonder (Antral) Folikül .....	18
2.1.4. Preovulatuvar (Tersiyer-Olgun) Foliküller .....	20
2.2. Ovulasyon.....	22
2.3. Oositin Gelişimi (Oogenezis) .....	23
2.4. Oositlerin Sınıflandırılması .....	25
2.5. Hücre Döngüsü.....	27
2.6. Mayotik Yeterlilik .....	28
2.7. Oosit Olgunlaşması .....	29
2.8. Metafaz II Arrest .....	34
2.9. Olgunlaşmada Etkili Mekanizmalar .....	36
2.9.1. MPF.....	36
2.9.2. PKA .....	38
2.9.3. cAMP.....	40
2.9.4. Adenilil Siklaz .....	44
2.9.5. G Proteinleri .....	45
2.9.6. G Proteini Reseptörleri.....	47
2.9.7. Kalsiyum .....	51
2.9.8. Fosfodiesterazlar.....	53
2.9.9. cGMP .....	56
2.9.10. Guanilil Siklaz.....	57

2.9.11. Nitrik Oksit .....	58
2.9.12. Nitrik Oksit Sentaz .....	59
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1. Materyal.....</b>	<b>67</b>
3.1.1. Deney Hayvanları .....	67
3.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzeme .....	67
3.1.3. Cihazlar .....	68
<b>3.2. Metod .....</b>	<b>68</b>
3.2.1. Deney Planı.....	68
3.2.2. Kültür Medyumlarının Hazırlanması .....	69
3.2.3. Süperovulasyon ve Ovaryumun Çıkarılması .....	70
3.2.4. Oositlerin elde edilmesi.....	71
3.2.5. Oositlerin kültürü ve İncelenmesi .....	71
3.2.6. Sonuçların değerlendirilmesi.....	72
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>73</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>87</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>95</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>96</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>97</b>

## SİMGE VE KISALTMALAR

Kısaltma	Türkçe Açılımı	İngilizce Karşılığı
AC	Adenilil Siklaz	Adenylyl Cyclase
AG	Aminoguanidin	Aminoguanidine
CaM	Kalmodulin	Calmoduline
cAMP	halkasal (siklik) Adenozin Mono Fosfat	cyclic Adenosine Mono Phosphate
Cdc	Hücre bölünme döngüsü	Cell division cycle
Cdk	Siklin bağımlı protein kinaz	cyclin-dependent protein kinaz
cGMP	halkasal (siklik) Guanozin Mono Fosfat	cyclic Guanosine Mono Phosphate
cNOS	Yapısal Nitrik Oksit Sentaz	constitutive Nitric Oxide Synthase
COC	kümülüs oosit bileşkesi (kompleksi)	Cumulus-Oocyte Complex
CRE	cAMP yanıt elementi	cAMP response element
CSF	Sito-statik faktör	Cyto-Static Factor
dsRNA	çift zincirli	double strand RNA
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü	Epidermal Growth Factor
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz	endothelial Nitric Oxide Synthase
ER	endoplazmik retikulum	Endoplasmic reticulum
FBS	Fetal sığır serumu	fetal bovine serum
FSH	Folükül Uyarıcı Hormon	Follicle-Stimulating Hormone
G proteini	Guanin nükleotidi bağlayıcı protein	Guanine nucleotide binding protein
GC	Guanilil (Guanilat) Siklaz	Guanylyl (Guanilate) Cyclase
G <sub>i</sub>	baskılayıcı G proteini	G <sub>inhibitory</sub>
GPCR	G proteini bağlantılı reseptör	G protein coupled receptor
G <sub>s</sub>	uyarıcı G proteini	G <sub>stimulatory</sub>
GV	Germinal Vezikül	Germinal Vesicle
GVBD	Germinal Vezikülün Yıkımı	Germinal Vesicle Breakdown
HA	Hiyaluronik Asit	Hyaluronic Acid
hCG	İnsan koryonik gonadotropini	human Chorionic Gonadotropine
HX	Hipoksantin	Hypoxanthine
IBMX	İzobütıl metaksantine	Isobuthylmetaxanthine
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü	insulin-like growth factor-I
IVF	in vitro fertilizasyon	<i>in vitro</i> fertilization
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz	inducible Nitric Oxide Synthase
LH	Luteinleştirici Hormon	Luteinizing Hormone

<b>Kısaltma</b>	<b>Türkçe Açılımı</b>	<b>İngilizce Karşılığı</b>
L-NAA	N-Amino-arjinin	N-Amino- arginine
L-NAME	L-N-Nitro-arjinin-metil ester	L-N-Nitro- arginine- Methyl ester
L-NIO	Nomega-inometil-L-ornitin	Nomega-inomethyl-L-ornitin
L-NMA	L-N-Metil-arjinin	L-N-Methyl-arginine
L-NNA	L-N-Nitro-arjinin	L-N-Nitro- arginine
L-SMTC	S-Metil-L-tiyositrülin	S-Methyl-L-tiyocitrulin
MEM $\alpha$	Minimum Essential Medium-alpha	Minimum Essential Medium-alpha
MI	Metafaz 1	Metaphase I
MII	Metafaz 2	Metaphase II
MPF	Maturasyon (Mayoz) tetikleyici faktör	Maturation (Meiosis) Promoting
Factor		
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz	neuronal Nitric Oxide Synthase
NO	Nitrik Oksit	Nitric Oxide
NOS	Nitrik Oksit Sentaz	Nitric Oxide Synthase
PAS	Periodik Asit Schiff	Periodic Acid Schiff
PDE	Halkasal Nükleotid Fosfodiesteraz	cyclic nucleotide Phosphodiesterase
PEH	Primordiyal eşey hücreleri	Primordial germ cells
pGC	partikülal Guanilil Siklaz	particulate Guanylyl Cyclase
PI	Profaz 1	Prophase I
PKA	Protein Kinaz A	Protein Kinaz A
PMSG/eCG	Gebe Kısrak Serum Gonadotropini	Pregnant Mare Serum Gonadotropine
RIA	Radyoimmünoassay	Radioimmunoassay
RNAi	RNA interferans	RNA interference
sGC	Çözünür Guanilil (Guanilat) Siklaz	soluble Guanylyl (Guanilate) Cyclase
siRNA	Küçük baskılayıcı RNA	small interfering RNA
SNAP	S-nitrozo-N-asetil-DL-penisillamin	S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine
SNP	Sodyum nitroprusside	Sodium nitroprusside
ZP	Zona Pellusida	Zona Pellucida



## ŞEKİLLER, TABLOLAR VE RESİMLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
<b>ŞEKİLLER</b>	
Şekil 1: Ovaryumun Şematik Yapısı .....	14
Şekil 2: Gelişim halindeki foliküller .....	19
Şekil 3: Çeşitli gelişim aşamalarında ovaryum folikülleri .....	21
Şekil 4: Sığırlarda, FSH ile foliküllerin gelişimini karşılaştıran şematik diyagram ..	22
Şekil 5: Sığır oositlerinin, büyüme, kapasitasyon ve maturasyon aşamalarının folikülün gelişim durumu ile karşılaştırılması.....	24
Şekil 6: Hücre Döngüsü.....	28
Şekil 7: MPF ve CSF aktiviteleri .....	35
Şekil 8: MPF ve CSF aktivitelerinin oosit maturasyonu, yumurta aktivasyonu ve erken bölünme aşamalarındaki miktarları .....	35
Şekil 9: İmmatür bir oosite sitoplazma enjeksiyonu .....	37
Şekil 10: Protein Kinaz A'nın MPF'ye etki mekanizmaları.....	39
Şekil 11: PKA'nın aktivasyonu.....	39
Şekil 12: cAMP'nin 2 ve 3 boyutlu yapısı.....	41
Şekil 13: ATP'den cAMP sentezi ve CAMP'nin AMP'ye dönüştürülmesi.....	41
Şekil 14: Adenilil siklazın yapısı .....	44
Şekil 15: GDP ve GTP'nin biyokimyasal yapısı .....	46
Şekil 16: GPCR aracılığıyla AC'nin aktivasyonu.....	48
Şekil 17: G proteini bağlı reseptör .....	48
Şekil 18: GPR3'e bir ligand bağlanmasıyla gerçekleşen cAMP üretimi ve MPF'nin baskılanması .....	50
Şekil 19: Oosit maturasyonunu tetikleyebilecek mekanizmalar .....	52
Şekil 20: Çeşitli PDE izoformlarının şematik yapıları .....	54
Şekil 21: Oosit ve çevreleyen kümülüs hücrelerinde cAMP düzenlenmesinin şematik gösterimi.....	54
Şekil 22: GTP ve cGMP'nin kimyasal yapıları .....	57
Şekil 23: Guanilil siklazların şematik yapısı .....	58
Şekil 24: NOS enzimlerinin aktivasyonunun ve üretilen nitrik oksitin etkileri.....	61

<b>Şekil 25:</b> SNAP ve Glyco-SNAP türlerinin kimyasal yapısı.....	62
<b>Şekil 26:</b> hCG Öncesi ve Sonrası NOS miktarlarındaki değişim .....	65
<b>Şekil 27:</b> Saatlere göre GVBD oranları .....	78
<b>Şekil 28:</b> Saatlere göre GVBD oranlarındaki değişim .....	78
<b>Şekil 29:</b> Saatlere göre MII oositlerin oranları .....	80
<b>Şekil 30:</b> Saatlere göre MII oranlarındaki değişim .....	80
<b>Şekil 31:</b> Deney verilerine göre nitrik oksit in oosit maturasyonundaki rolü.....	93

## TABLÖLAR

<b>Tablo 1:</b> Sığır oositlerinde nükleer maturasyonun aşamaları.....	33
<b>Tablo 2:</b> Temel G protein aileleri .....	47
<b>Tablo 3:</b> 3 farklı PDE formu için değişik inhibitörlerin IC 50 değerleri.....	54
<b>Tablo 4:</b> Üç NOS izoformunun karşılaştırması .....	60
<b>Tablo 5:</b> İstenen molaritelerde kimyasallar elde etmek için kullanılacak miktarlar.	70
<b>Tablo 6:</b> 2. Saatte gruplara göre oositlerin durumları .....	73
<b>Tablo 7:</b> 4. Saatte gruplara göre oositlerin durumları .....	73
<b>Tablo 8:</b> 6. Saatte gruplara göre oositlerin durumları .....	73
<b>Tablo 9:</b> 8. Saatte gruplara göre oositlerin durumları .....	74
<b>Tablo 10:</b> 10. Saatte gruplara göre oositlerin durumları .....	74
<b>Tablo 11:</b> 20. Saatte gruplara göre oositlerin durumları .....	74
<b>Tablo 12:</b> 24. Saatte gruplara göre oositlerin durumları .....	74
<b>Tablo 13:</b> Hipoksantin (HX) grubunda saatlere göre oositlerin durumları.....	75
<b>Tablo 14:</b> L-NAME (LN) grubunda saatlere göre oositlerin durumları .....	75
<b>Tablo 15:</b> Hipoksantin + L-NAME grubunda saatlere göre oositlerin durumları .....	75
<b>Tablo 16:</b> Kontrol (KO) grubunda saatlere göre oositlerin durumları.....	75
<b>Tablo 17:</b> Saatlere göre GVBD'yi tamamlamış oositlerin oranları (%) .....	76
<b>Tablo 18:</b> Saatlere göre gruplar arasında Metafaz II'ye ulaşma oranları (%).....	76
<b>Tablo 19:</b> Saatlere göre gruplar arasında dejenere oositlerin oranları (%). .....	76
<b>Tablo 20:</b> Deney sonunda GVBD'yi tamamlamış oositlerin MII'ye geçme oranları.....	79

## RESİMLER

<b>Resim 1:</b> Primordiyal ve primer foliküller .....	16
<b>Resim 2:</b> Sekonder bir folikülde teka interna ve eksterna tabakaları.....	17
<b>Resim 3:</b> Multilaminar primer foliküller .....	18
<b>Resim 4:</b> Sekonder (antral) bir folikülde oosit .....	20
<b>Resim 5:</b> Olgun bir folikül (Graaf folikülü) .....	21
<b>Resim 6:</b> Profaz I Metafaz I ve Metafaz II aşamalarındaki oositler .....	26
<b>Resim 7:</b> Profaz I'deki bir oosit ile metafaz II'deki bir oosit .....	29
<b>Resim 8:</b> Çekirdek zarındaki laminin moleküllerinin parçalanması .....	30
<b>Resim 9:</b> Yoğunlaşmış (mitotik) kromozomlar ile G <sub>1</sub> evresindeki yoğunlaşmamış kromozomların karşılaştırılması .....	31
<b>Resim 10:</b> Sığır oositlerinde nükleer maturasyonun aşamaları .....	33
<b>Resim 11:</b> İki farklı kümülüs oosit kompleksi.....	34
<b>Resim 12:</b> PKA'ya cAMP bağlanması sonucu yapısında meydana gelen değişiklik .....	40
<b>Resim 13:</b> G proteininin bir ligand aracılığıyla uyarılması .....	46
<b>Resim 14:</b> Gpr3 <sup>+/+</sup> ve Gpr3 <sup>-/-</sup> farelerdeki oositler .....	49
<b>Resim 15:</b> GPR3 için RNAi enjekte edilen oositler.....	50
<b>Resim 16:</b> 20 saat kültürün ardından Pde3a <sup>+/+</sup> ve Pde3a <sup>-/-</sup> oositler .....	55
<b>Resim 17:</b> L-arjininin L-sitrüline dönüşümü sırasında nitrik oksit oluşması .....	59
<b>Resim 18:</b> NOS inhibitörleri olarak tanımlanan bazı arjinin analogları.....	61
<b>Resim 19:</b> eNOS ve iNOS enzimlerinin oositlerdeki yerleşimi .....	63
<b>Resim 20:</b> Fareden çıkarılmış, henüz folikülleri patlatılmamış ovaryum .....	82
<b>Resim 21:</b> Deney Başlangıcında GV aşamasındaki oositler ve COC'lar.....	82
<b>Resim 22:</b> 6 saatte HX+LN grubundan izole oositler ve COC'lar .....	83
<b>Resim 23:</b> 10. saatte HX+LN grubundan izole bir oosit ile 4 adet COC .....	83
<b>Resim 24:</b> 10. saatte HX grubundaki oositler ve COC'lar .....	84
<b>Resim 25:</b> 10. saatte LN grubundan bir COC.....	84
<b>Resim 26:</b> 24. saatte HX grubundaki oositler ve COC'lar .....	85
<b>Resim 27:</b> 24. saatte kontrol grubundan bir oosit .....	85
<b>Resim 28:</b> 20. saatte LN grubundaki oositler.....	86

## 1. GİRİŞ

Milattan önce 40.000–16.000 yıllar arasındaki döneme ait Willendorf Venüsü tarihte rastlanan ilk infertilite ikonudur. Yunan mitolojisindeki fertilitate tanrılarından Hipokrat ile Aristo'ya ve oradan da 20. yüzyıla kadar doğru bilimsel yaklaşımlara sahip olamayan fertilitate/infertilite olgusu ancak bu tarihten sonra uygun araştırma ve tedavi olanaklarına kavuşabilmiştir (1).

1934 yılında Pincus ve Enzmann ilk in vitro fertilizasyon (IVF) deneyini gerçekleştirmiş ve memeli oositlerinin canlı dışında da döllenebileceği göstermiştir (2). Bunu izleyen gelişmelerin ardından 1978 yılında ilk tüp bebek, 1989 yılında ise ilk Türk tüp bebek dünyaya gelmiştir.

En sık rastlanılan infertilite nedenleri arasında spermatogenezis ve ovulasyonda meydana gelebilen bozukluklar, endometriyozis ve yaşla ilgili problemler bulunmaktadır (1). Normal dişi fertilitesinde oositin düzgün gelişmesine bağlıdır (3). Embriyoda gelişmeye başlayan memeli oositleri, mayoz bölünmelerine gebeliğin 25. haftasından sonra başlar (3,4). Ancak mayoz, profaz I'in diploten aşamasında durur ve puberteden menapoza kadar süren yaklaşık 12–50 yıllık bir zaman dilimin içinde, uygun ortam şartları ve hormonal uyarım meydana gelirse yeniden devam etmeye başlar. Oositin tekrar mayoza girişi olarak tanımlanabilen **oosit olgunlaşması (maturasyonu)**, ovulasyondan hemen önce gerçekleşen ve fertilizasyon için gerekli olan bir durumdur. Bu aşamada oosit profazdan mayoz II'nin metafaz aşamasına kadar mayoza devam eder ancak bu noktada bölünme tekrar kesintiye uğrar. Mayoz bölünme bu kez ancak fertilizasyon gerçekleşirse tamamlanabilir (3). Maturasyonunu tamamlamış, fertilizasyona hazır bir oositin dişi üreme kanalındaki ömrü oldukça kısa olduğundan mayozda bekleme ve maturasyonun zamanlaması çok sıkı şekilde düzenlenmelidir (5).

Oosit maturasyonu ile ilgili mekanizmalar halen tam olarak aydınlatılmadığı için, bu konuda ortaya çıkabilecek yeni bilgiler yalnızca eşey hücrelerinin bölünmeleri ile ilgili bilinenlerin artmasını sağlamayacak aynı

zamanda infertil bireylere uygulanan yardımcı üreme tekniklerinin ve kültür ortamlarının da gelişimine katkıda bulunacaktır (3,4,6). Ağır hormon yükleri alınması gereken geleneksel doğum kontrol yöntemlerinde meydana gelen yan etkiler, yalnızca oosit maturasyonunda görev alan sinyal yollarına göre geliştirebilecek yöntemlerle en aza indirgenmiş olacaktır. Bu yolla gerçekleştirilebilecek doğum kontrolü, vücutta sadece oositi hedef alarak diğer organların işlevlerine etki etmeyecektir (7).

Malign tümörlü hastalarda, tedavi ile yaşam süresi uzatılabiliyor iken tedavide kullanılan kemoterapi ve abdominal radyoterapi nedeniyle, geri dönüşümsüz olarak infertilite meydana gelebilmektedir. IVF ile elde edilip dondurularak saklanan embriyolar böyle çiftlere çocuk sahibi olma şansı tanınmasına rağmen, IVF için gerekli olan uzun ve sıkıntılı ovaryan stimülasyon protokolü, tedavi süresini geciktirecektir. Üstelik bu tip stimülasyonlarda mitoz arttıran hormonların kullanılması gerektiğinden, kanserin gelişimi hızlandırılarak, hastanın sağlığını daha çok tehlikeye sokacaktır.

Embriyo saklanması yerine kullanılabilir oosit saklanması, bu gibi problemlere neden olmayacak daha sağlıklı bir yöntemdir. Ancak sperm ve embriyo saklanmasında elde edilen başarı oosit saklanmasında sağlanamamıştır. Oositler matür veya immatür olarak saklanabilir. Matür oositlerin zaten kısa olan yaşam süreleri ve dış etkenler ile dondurma/çözme işlemlerinden kolaylıkla etkilenebilmeleri, matür oositlerin saklanmasını oldukça güçleştirmektedir. Henüz olgunlaşmamış (immatür) oositlerin saklanması burada alternatif olabilir. Bir alternatif de ovaryum dokusunun dondurularak saklanmasıdır. Her iki yöntem de oositlerin in vitro maturasyonunu gerekli kılmaktadır (3,6,8,9). Gelişmekte olan oosite daha iyi bir kültür ortamı yaratabilmek de, oositin mikroçevresi ile sitoplazmik ve nükleer olgunlaşmanın aşamalarını anlamaya ve bu konuda yapılan çalışmaların gelişimine dayanmaktadır (10). Bu nedenle, oosit olgunlaşmasını, döllenmeyi ve embriyo gelişimini inceleyen araştırmalar, insan ve hayvanlarda gerçekleştirilen yardımcı üreme tekniklerini (YÜT) geliştirmek ve anormal embriyonik gelişimlerdeki nedenleri ortaya çıkarmak için de gereklidir (11).

Oosit maturasyonu, oositi mayozda bekleten ve olgunlaşmasını tetikleyen faktörler arasındaki hassas dengeler sayesinde gerçekleşir (3). Maturation

(Metaphase/Meiosis) Promoting Factor (MPF), mayoz ve mitozda hücre bölünmesini tetikleyen anahtar moleküldür (12). MPF, Protein Kinaz A (PKA) tarafından fosforile edilerek inaktif halde tutulmaktadır (5). PKA hücre içi ikincil mesajcı moleküllerden bir olan halkasal (siklik) Adenozin Mono Fosfat (cAMP) tarafından aktive edilmektedir (5). cAMP, oosit maturasyonunu düzenlemekte önemli görevi olan bir moleküldür (4). Oosit içindeki yüksek cAMP düzeyleri cAMP/PKA/MPF yolu ile maturasyonu engellemektedir (3,4,5,12,13).

Halkasal Nükleotid Fosfodiesterazlar (PDE'ler) halkasal nükleotidlerin (cAMP ve cGMP) indirgenmesinden sorumlu enzimlerdir (4). cGMP, PDE3A'ya yüksek affinite ile bağlanır fakat hidrolizasyonu cAMP'ye göre çok yavaş gerçekleşir. Bu nedenle cGMP, PDE3A için inhibitör gibi fonksiyon göstermektedir (13-19). PDE3'ün cGMP ile baskılanması cAMP düzeyini ve dolayısıyla PKA aktivitesini arttırmaktadır (14,16,18-20).

Hücrede çeşitli fonksiyonlara sahip önemli bir mesajcı molekül olan nitrik oksit (NO), cGMP sentezinden sorumlu olan Guanilil Siklazın (GC) iyi bilinen bir aktivatörüdür (19-22). NO sentezini gerçekleştiren üç enzimden ikisi (eNOS ve iNOS) ovaryumlarda sentezlenmektedir ve bunların oosit maturasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (20-22). Bu konuda yapılan çalışmalar olaya tam bir açıklık getiremediği gibi farklı NO dozlarının maturasyon üzerinde farklı etkiler gösterdiği de belirlenmiştir (21-23).

Çalışmamızda, fare oosit hücre kültüründe, PDE3A aktivitesini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyecek kimyasallar kullanarak, NO'nun maturasyondaki rolünü belirlemeyi amaçladık.

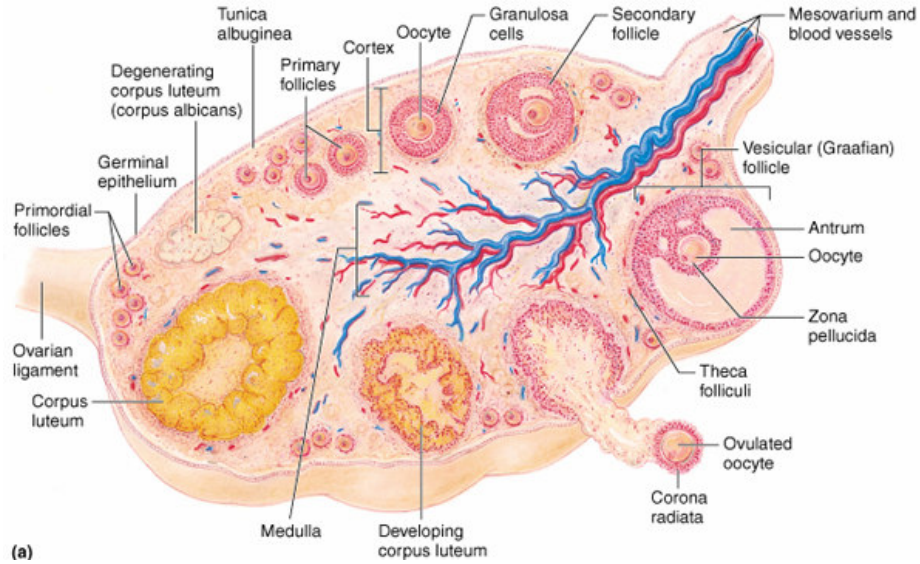
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi (Folikülogenezis)

Bir ovaryum folikülü belli hücre tiplerinden oluşan oldukça karmaşık bir yapıdır (24). Her biri bir oosit içeren foliküller değişik çaplarda, korteksin stroması içine yayılmış durumdadırlar. Folikülün çapı oositin gelişim durumunu gösterir. Histolojik olarak gelişim durumlarına göre üç temel tip folikül bulunur.

- **Primordiyal foliküller**
- **Gelişmekte olan foliküller**
- **Olgun (Matür) foliküller (Graaf folikülleri)**

Gelişmekte olan foliküller ayrıca **primer** ve **sekonder (antral)** foliküller olarak ikiye ayrılırken primer foliküller de kendi içerisinde **unilaminar (erken)** ve **multilaminar (geç)** primer foliküller olarak ikiye ayrılır. Bir ovaryumda tüm tiplerdeki foliküller aynı anda görülmektedir ancak primordiyal foliküller en yaygın olan tiptir (25).



Şekil 1: Ovaryumun Şematik Yapısı (26).

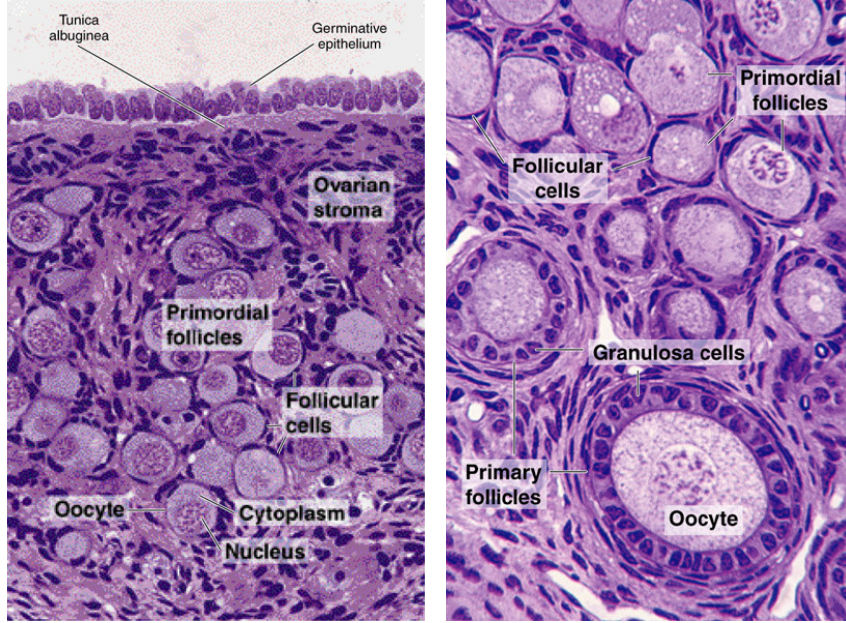
### 2.1.1. Primordiyal Foliküller

Primordiyal eşey hücreleri (PEH) insanın fetal gelişimi sırasında, 4. haftanın başlarında vitellus kesesinin dorsal endoderminde allantoyise yakın bir bölgede belirir. Embriyonun katlanması sırasında vitellus kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olurken PEH'ler arka barsağın dorsal mezenteri boyunca göç ederek ürogenital kabartıda gonadları oluşturacak bölgeye yerleşirler (27). Dişi bireylerde PEH'ler mitozla çoğalarak 25. haftada yaklaşık 7 milyon oogonyum meydana getirir. Bu aşamada yassı epitel hücreleri oogonyumların çevresini tek tabaka halinde sararak primordiyal folikülleri oluşturur.

Mayoza girmiş primer oositlerin büyük çoğunluğu primer folikül oluşturamayıp atreziye uğrar ve yok olurlar (28). Fetal hayatın beşinci ayında başlayan atrezi foliküllerin sayısını logaritmik olarak azaltır. Atrezi başlamadan önce beş milyon civarında olan oosit sayısı doğumda %20'den de aza iner (25). Pubertede ise bu rakam 200.000'e kadar inmiştir (29). Puberteden itibaren her menstrual siklusa birkaç adedi gelişerek bir tanesi egemen folikül olup son aşamaya kadar gelişirken diğerleri atreziye giderek yavaş yavaş yok olmaya devam eder.

Bir kadının üretken dönemi süresince yaklaşık 400 oosit bu aşamaya kadar gelip ovulasyonla atılır. Menapozdan sonra geri kalan oositler birkaç yıl içinde tamamen yok olur (25). Bununla beraber, son yıllarda bazı araştırmalar fare türlerinde germ hattı kök hücrelerinden yaşamın erken yıllarında tekrar germ hücresi oluşabildiğini göstermiştir. Bazı kurbağa türlerinde (*Xenopus laevis*) kök hücrelerden, yaşam süresinin çoğu boyunca germ hücresi üretildiği yönündeki kanıtlar oldukça kuvvetlidir (3,27).





Resim 1: Primordiyal ve primer foliküller (30).

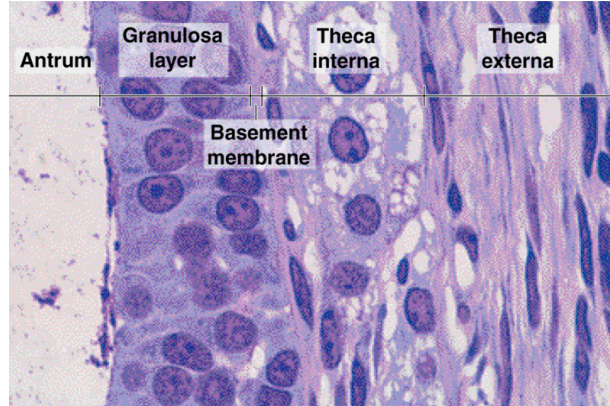
### 2.1.2. Primer Foliküller

Puberteden itibaren çeşitli faktörlerin etkisiyle oositler ve buna eşlik edecek şekilde folikül hücreleri bir büyüme evresine girerler. Büyümenin ilk sinyali, yassı folikül epitel hücrelerinin kübiğe dönüşmesidir. Bu aşamada folikül **tek tabakalı (erken/unilaminar) primer folikül** adını alır. İlerleyen aşamalarda granüloza hücrelerinin çoğalmasıyla **çok tabakalı (geç/multilaminar) primer folikül meydana gelir**. Çoğalan folikül epitel hücreleri de **granüloza hücreleri** adını alır (6). Folikül büyüdükçe korteksin daha derin kısımlarına doğru hareket eder. Çoğalan granüloza hücreleri aralarındaki oluklu bağlantılar (gap junctionlar) aracılığıyla birbirleriyle temas kurarlar.

Testisten farklı olarak foliküller içerisinde granüloza hücreleri birbirleriyle sıkı bağlantı oluşturmazlar. Böylece kan damarları ile folikül sıvısı arasında madde alışverişi gerçekleşebilir. Oosit ve folikülün normal gelişimi için, besin maddeleri ve sinyal moleküllerinin folikül sıvısına ve granüloza hücrelerinin oluklu bağlantıları aracılığıyla da oosite geçişi zorunludur.

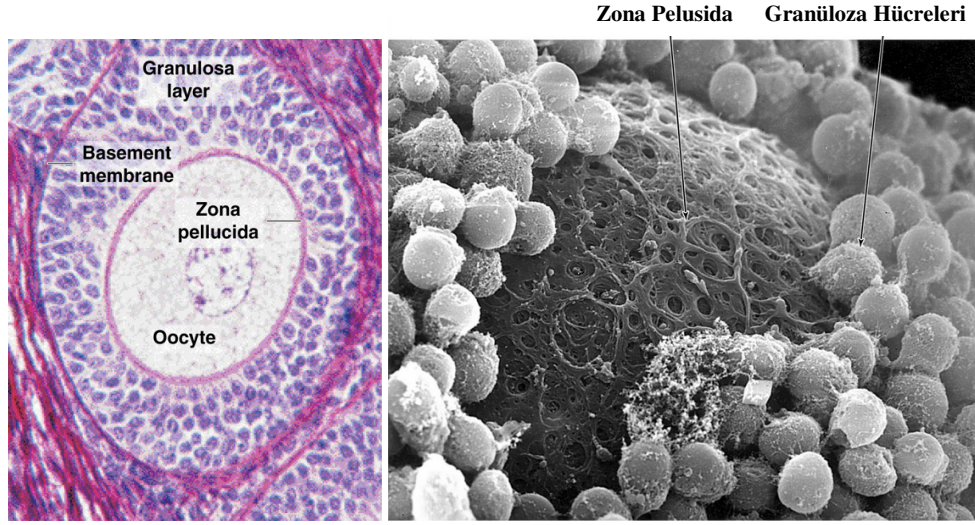
Granüloza hücreleri çoğalırken çevredeki stroma hücreleri de folikülü bağ dokusu bir kılıfla sararak teka tabakasını oluşturur. Teka tabakası geliştikçe iki tabakaya farklılaşır. **Teka interna** adı verilen iç tabaka oldukça damarlanmış, kübik salgı hücrelerinden oluşur. Bu hücreler oldukça farklılaşarak steroid üreten hücreler haline geçerler. Luteinleştirici Hormon (LH) reseptörü taşıyan bu hücreler östrojen öncülü androjenleri salgırlar. Teka interna tabakası, fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük damarlardan oluşan zengin bir dolaşım ağıyla tipik bir endokrin organ görünümü sergiler. Dışta bulunan diğer tabaka, **teka eksterna**, içerdiği kollajen demetleri ve düz kaslarıyla daha çok bir kapsül görevi görür. Teka eksterna tabakası ile ovaryumun stroması arasındaki sınır tam olarak belirgin olmamasına rağmen teka interna ile granüloza tabakası arası sınır, burada bulunan bazal lamina ile oldukça iyi belirlenmiştir (25).

2001 yılında yapılan bir çalışmada, oogonyumların çevresini saran folikül epitel hücrelerinin, oogonyumlar için kontrollü bir çevre sağlayarak, kan akışıyla gelebilecek zararlı maddelere karşı korudukları belirlenmiştir (28).



**Resim 2:** Sekonder bir folikülde teka interna ve eksterna tabakaları (30).

Oosit, folikül gelişimi sırasında kendi çevresinde, glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin bir membran olan '**Zona Pellusida**'yı (**ZP**) oluşturur. ZP; homojen, asidofilik, PAS (+) ve oldukça iyi boyanan jel kıvamında bir yapıdır (25).



**Resim 3:** Solda, multilaminar primer bir folikülde oosit, ZP ve granuloza hücreleri ışık mikroskopik bir kesitte, sağda da ZP ve granuloza hücreleri, elektron mikroskopu ile elde edilen bir resimde görülüyor (30).

### 2.1.3. Sekonder (Antral) Folikül

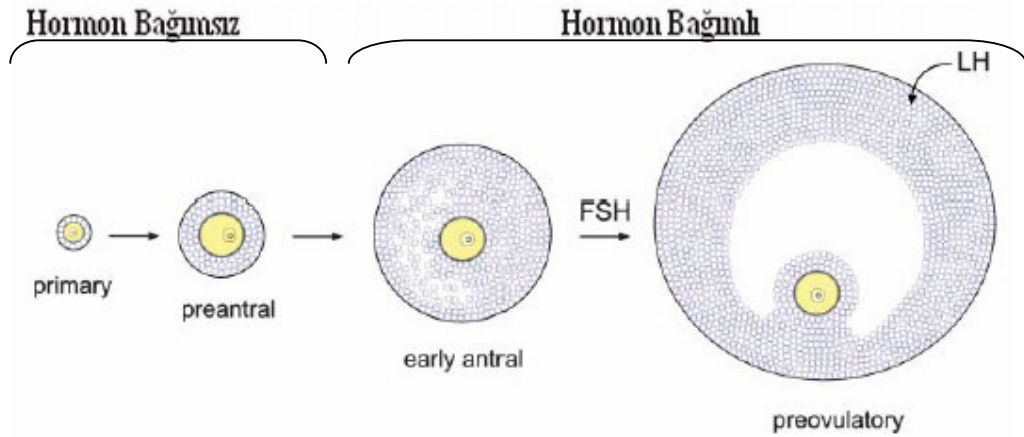
Büyümeye devam eden folikül içinde sıvı dolu bir boşluk (antrum) oluşur (6). Foliküler antrumu dolduran sıvı kan damarlarından plazmanın sızmasıyla oluşup yerel salgılar ile metabolizma ürünleri ile modifiye hale gelir (31). Antrum sıvısı (likör folikülü), hiyaluronat, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerden zengindir (32). Boşluğun oluştuğu andan itibaren folikül **Sekonder (Antral) Folikül** adını alır. Bu aşamada oositler neredeyse olgun boyutlarına (~120µm) ulaşır ve büyümeleri durur. Ancak granuloza hücreleri çoğalmaya devam eder (6).

Oositin ve folikülün gelişimi için çeşitli faktörler gereklidir. Bunlar folikül uyarıcı hormon (FSH), kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) iyonları ve çeşitli büyüme faktörleridir. Gelişimde etkili büyüme faktörleri; Epidermal Growth Factor (EGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I) olarak sıralanabilir.

Granuloza tabakası oositi çevreleyen bölge hariç her yerde aynı kalınlıktadır. Ekzantrik yerleşim gösteren oosit çevresinde ise granuloza hücreleri daha yoğun bir şekilde birikerek bir tepçik oluştururlar. Burada **kümülüs ooforus** adını alan

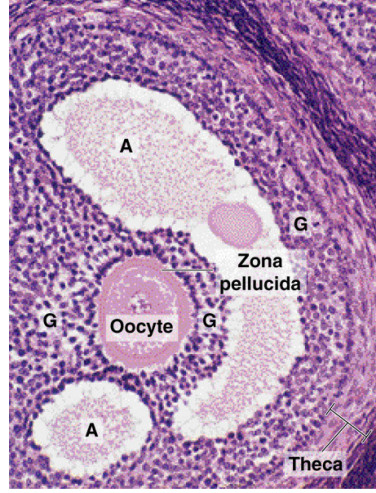
granüloza hücreleri ovulasyon sonrasına kadar oosit ile birleşik halde kalırlar. Ovulasyondan sonra **korona radyata** tabakası adını alan bu tabaka ile oosit, aralarındaki oluklu bağlantılar aracılığıyla sürekli temasta olduklarından dolayı birlikte **kümülüs oosit bileşkesi (kompleksi) (COC)** olarak adlandırılır (25).

Ovaryumdaki gelişim faktörleriyle belli bir çapa ulaşp antrum meydana getiren foliküller bu aşamadan sonra hormonlara bağımlı hale gelir ve gelişimlerine devam edebilmek için gonadotropinlere ihtiyaç duyarlar. Yeterli miktarda hormona maruz kalan foliküller arasında meydana gelen seleksiyon sonucu, (canlı türüne göre değışmekle birlikte) insanlar için genellikle bir folikül baskın hale gelerek gelişimini son aşamaya kadar sürdürür. Folikül gelişimi puberte öncesi ve hamilelik sırasında da meydana gelir ancak uygun bir hormonal uyarım olmadığından gelişim devam etmez (25,28). İnsanlarda preantral bir folikülden preovulatuvar folikül oluşumuna kadar yaklaşık 85 günlük bir süre geçer. Farelerde bu 10-12 gün kadardır (29).



**Şekil 2:** Gelişim halindeki foliküller. Primer ve preantral foliküllerdeki oositler, izole edildiklerinde mayozu devam edemezken erken antral dönemden itibaren mayozu devam etme yeteneğı kazanırlar. Erken antral döneme kadar oositler hormon bağımsız olarak gelişirlerken bu dönemden sonra ileri gelişim için FSH'a ihtiyaç duymaktadırlar (5,29).



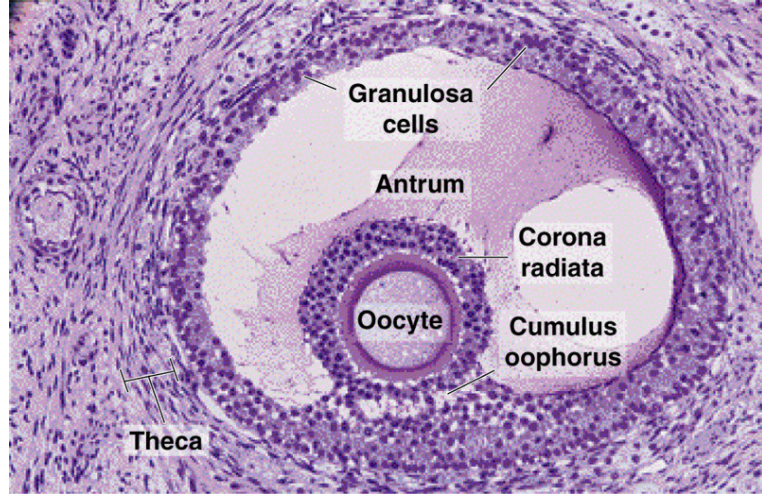


**Resim 4:** Sekonder (antral) bir folikülde oosit, ZP ve granüloza hücreleri. Henüz tam birleşmemiş antrum boşlukları (A), granüloza hücrelerinin (G) arasında görülüyor (30).

#### 2.1.4. Preovulatuvar (Tersiye-Olgun) Foliküller (Graaf Folikülleri)

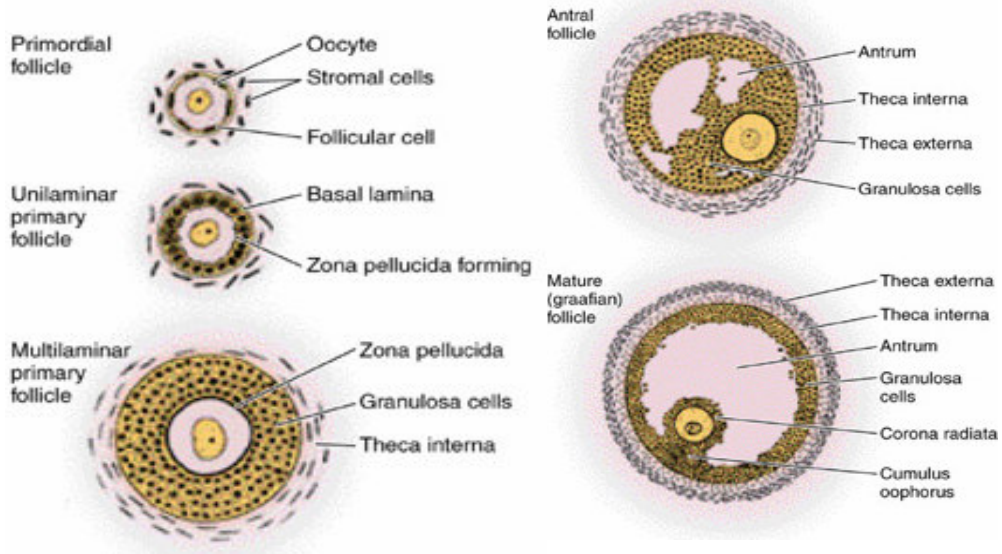
İnsanlarda, 10 mm veya daha büyük bir çapa ulaşan foliküller olgun folikül olarak adlandırılır. Oldukça büyük olan boyundan dolayı ovaryum korteksinin kalınlığı boyunca uzanarak bir miktar da ovaryumun dışına doğru çıkıntı yapar. Folikül maksimum boyuna erişirken granüloza hücrelerinin mitotik aktiviteleri de azalmaya başlar. Granüloza tabakasının kalınlığı azaldıkça antrum da genişler. COC' un, folikülün geri kalan kısmıyla bağlantısı gevşeyerek ovulasyona hazırlanır.

Teka tabakası daha göze çarpar hale gelir. Teka interna hücrelerinin içinde lipit damlacıkları birikerek bu hücelere tipik steroid sentezleyen hücre görünümü kazandırır. İnsanlarda LH, teka interna hücrelerinde androjen sentezini tetiklerler. Östrojen öncülleri olarak görev alan androjenler buradan granüloza hücrelerin düz endoplazmik retikulumlarına (ER) göç eder, FSH'ın etkisiyle östrojenlere dönüştürülürler. Artan östrojen seviyeleri granülozaların proliferasyonunu ve dolayısıyla da folikülün genişlemesini arttırır (25).



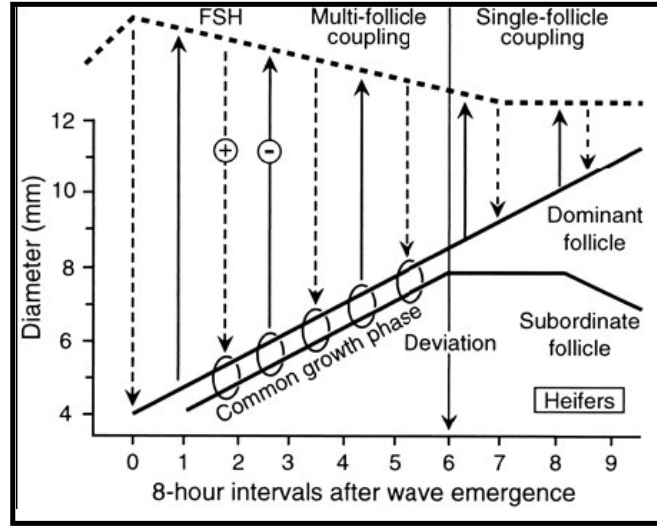
**Resim 5:** Olgun bir folikül (Graaf folikülü) (30).

Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce adenohipofizden LH salınımı tetiklenir. Kandaki LH hormonu seviyesinde meydana gelen aşırı yükselme (pik) sonucu granüloza hücrelerindeki LH reseptörleri hassasiyetlerini kaybeder ve LH'a yanıt olarak daha fazla östrojen üretemezler. Oositin ilk mayotik bölünmesi bu dalga ile tetiklenerek durakladığı yerden devam etmeye başlar. LH pikinden 12-24 saat kadar sonra gerçekleşen bu olay oositin mayoz I'ı tamamlayarak ilk kutup cisimciğini oluşturması (maturasyonu-olgunlaşması) ve ovulasyon ile sonuçlanır (25).



**Şekil 3:** Çeşitli gelişim aşamalarında ovaryum folikülleri (30).

Normalde her menstrual siklusta bir ovaryumdaki bir folikül gelişimini tamamlar ve içindeki sekonder oositi atar. Her siklusta overler arasında dönüşümlü gerçekleştirilen bu olay zaman zaman, kendiliğinden veya *clomiphene sitrat* içeren ilaçlar gibi kimi dış faktörler nedeniyle her iki ovaryumda aynı anda meydana gelebilir. Bu durumda eğer fertilizasyon gerçekleşirse çoklu gebelikler ortaya çıkabilir (25).



**Şekil 4:** Sığırlarda, FSH ile foliküllerin gelişimini karşılaştıran şematik diyagram. 0-9 arası rakamlar 8 saatlik zaman dilimlerini dikey eksen de folikül çapını göstermektedir. 6. aralığa kadar hep birlikte gelişen foliküller buradan sonra bir dominant folikül gelişimine devam ederken diğerleri atreziye giderek küçülmektedir (33).

## 2.2. Ovulasyon

Ovulasyon sekonder oositin Graaf folikülünden atılması işlemidir. Herhangi bir ovulasyonda atılacak olan folikül, pek çok primer folikül arasından, folikül gelişiminin daha ilk günlerinde belirlenir. Ovulasyon sırasında oosit, germinal epitel de dahil tüm folikül duvarını geçerek karın boşluğuna atılır. Menstrual döngünün tam ortası olan 14. günde gerçekleşen ovulasyon birtakım hormonal değişimlerin ve enzimatik reaksiyonların etkisiyle gerçekleşir. Bu olayları şöyle sıralayabiliriz:

- Glikozaminoglikanların, hormonal kontrolle, COC ile granüloza tabakası arasına yerleşmesi
- Folikül sıvısının artan hacmi ve iç basıncı
- Aktive olan plazminojen aracılığıyla folikül duvarının enzimatik proteolizi
- Prostaglandinler tarafından tetiklenen teka eksternadaki düz kasların kasılması.

Ovulasyondan hemen önce germinal epitelin preovulatuvar folikülle temasta olan kısmında kan akışı durur. Stigma adı verilen bu kısım bir çıkıntı yapar, ardından çatlayarak folikül içeriğinin karın boşluğuna dökülmesine olanak sağlar (25).

### 2.3. Oositin Gelişimi (Oogenezis)

4. hafta başlarından itibaren, vitellus kesesi endoderminden göç ederek gelen 10–100 kadar primordiyal germ hücresi ameboid hareketlerle, barsak tüpüne, oradan da mezenter boyunca göç ederek henüz farklılaşmamış gonadlardaki primer seks kordonları içine yerleşirler. Bu göç ve ardından gelen proliferasyon, bir tirozin kinaz reseptörü olan **c-kit** ile ona bağlanan **kök hücre faktörü** tarafından kontrol edilir. Her iki madde de göç sırasında PEH tarafından üretilir. Bu iki faktörden birinin eksikliği PEH açısından gonad yetersizliği ile sonuçlanır.

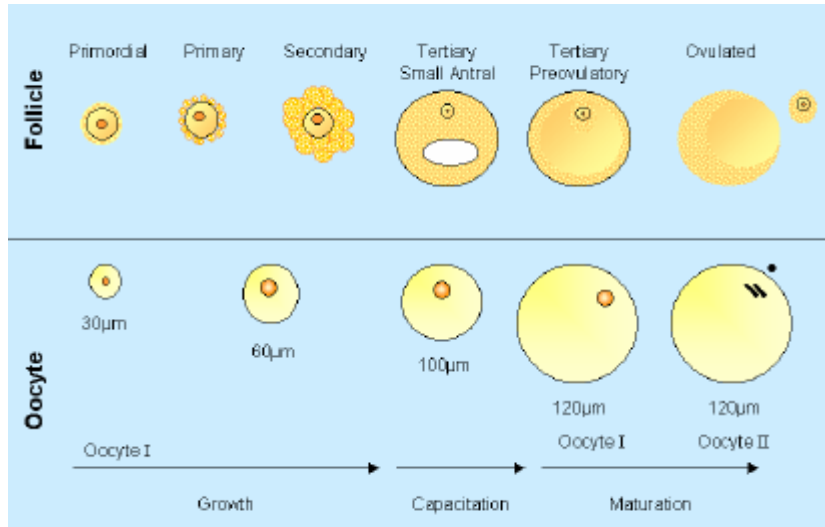
Primer seks kordonları 6. hafta dolaylarında dejenere olarak yerlerini sekonder seks kordonlarına bırakır. Sekonder kordonlar tarafından çevrelenen PEH, mitoz bölünme ile oogonyumlara dönüşürler.

Mitozla sayıları 7 milyona kadar ulaşan oogonyumlar, primer oosite dönüşerek mayoz bölünmeye girerler. Profaz I'de crossing over ile kardeş kromatid değişiminin ardından diplotende uzun yıllar sürecektir bir duraklama evresine girerler (32). **Mayotik arrest** olarak adlandırılan bu evre ovulasyonun hemen öncesine kadar tamamlanmaz ki bu 12–50 yıl kadar sürebilir. Oositlerin mayoz I'de beklediği süre ne kadar uzarsa dış etkenlere maruz kaldığı süre de



artacağından sonraki bölünmelerde trizomi 21 (Down Sendromu) gibi aksaklıklar meydana gelme olasılığı artar.

Puberteden sonra gelişmekte olan foliküllerde bulunan oositler, LH hormonunun salınımından yaklaşık 24–36 saat sonra ilk mayoz bölünmesini tamamlarlar. Sonrasında oluşan iki kardeş hücreden biri bölünme sırasında sitoplazmanın çoğunu alarak hacim olarak oldukça büyük olan sekonder oositi diğeri de sekonder oosite kıyasla oldukça küçük olan birinci kutup cisimciğini oluşturur. Primer oosit mayoz I'in tamamlanmasının hemen ardından mayoz II'ye geçer ancak bölünme bu kez de metafaz aşamasında kesintiye uğrar. Mayozun tamamlanması ancak fertilizasyon gerçekleşirse olur ve oosit mayoz bölünmesini tamamlamış, II. Kutup cisimciğini atmış ovum haline gelir. İnsanlarda birinci kutup cismi mayoz bölünmeye devam etmez. Bu nedenle mikroskop altında, ZP içinde bir kutup cisimciği gözlenen oositler maturasyonunu (Mayoz I'i) tamamlamış, iki kutup cisimciği gözlenen oositler ise mayoz bölünmesini tamamlamış dolayısıyla döllenmiş oositler olarak kabul edilir (25).



**Şekil 5:** Sığır oositlerinin, büyüme, kapasitasyon ve maturasyon aşamalarının folikülün gelişim durumu ile karşılaştırılması (33).

## 2.4. Oositlerin Sınıflandırılması

IVF için kullanılacak oositlerin hangi aşamada olduklarının bilinmesi çok önemlidir. Oositlere zarar vermeden incelemek için en uygun yöntem ışık mikroskobu ile incelemektir. Buradan elde edilen sonuçlar elektron mikroskobu bulgularıyla da paralellik göstermektedir. Bu sayede hem gerekli inkübasyon süresi belirlenmiş olur hem de spermle erken inseminasyon ile oluşabilecek maturasyon inhibisyonu önlenir. Uygun hormonal uyarımla ovaryumdaki foliküllerden elde edilebilecek oositler şu şekilde sınıflandırılabilir.

- **İmmatür / Profaz I (PI) / GV Oosit<sup>1</sup>:** Korona radyata hücreleri çok kalın ve yoğundur. Korona radyatanın dışında kümülüs hücreleri olmaz veya küçük ve yoğun olarak bulunur. GV ve belirgin nükleolus görülür. IVF öncesinde gereken inkübasyon süreleri uzundur (insanda 40–48 saat). Bu oositler henüz olgunlaşmamıştır.
- **Ara / Metafaz I (MI) İmmatür Oosit:** Korona radyata sıkı ve yoğun, kümülüs orta derecede yoğundur. Hem GV hem de I. Kutup cisimciği görülmez. Orta süreli inkübasyona ihtiyaç duyar (insanda 15–20 saat).
- **Ara / Metafaz I (MI) Matür Oosit:** Korona radyata ışınal ancak sıkıdır. Kümülüs geniş olup yer yer koyuluklar gözlenir. GV ve I. Kutup cisimciği görülmez. Previtellin aralık (oosit ile ZP arasındaki boşluk) seçilebilir.
- **Matür / Metafaz II (MII) Oosit:** İyi bir embriyo gelişimi ve gebelik oranı için oositlerin inseminasyon sırasında bu evrede olması gereklidir. Kümülüs geniş ve gevşek, korona radyata ışınaldır. Mikroskopta parlak olarak görülür. I. Kutup cisimciği seçilebilir. Kısa süreli (insanda 3–5 saat) inkübasyon önerilir.
- **Hafif Post Matür Metafaz II (MII) Oosit:** Oldukça gevşek ve koyulaşan renklere kümülüs ile az sayıda korona radyata hücrelerine sahiptir. Az sayıda spermle fazla bekletilmeden inseminasyon yapılmalıdır.
- **Post (Sür) Matür Metafaz II (MII) Oosit:** Oosit çevresinde çok az hücre bulunur. I. kutup cisimciği gözlenebilir ancak koyu renklidir. Fertilizasyon

---

<sup>1</sup> GV, Germinal Vezikül anlamına gelmektedir. Profaz I'deki oositin çekirdeğini ifade eder.

ve embriyo gelişim oranları bu tip oositlerde düşük olur. Böyle oositler fertilizasyonda kullanılmaz veya bir saat içinde işlemleri yapılır.

- **Dejenere (Atretik) Oosit:** Mayoz bölünmenin herhangi bir evresinde olabilirler. I. Kutup cisimciği bile görülebilir ancak kümülüs-korona hücrelerinin görünüşleri değişkendir. Kümüls hücreleri fragmente, oosit koyu renkte görülür.



**Resim 6:** Profaz I (PI), Metafaz I (MI) ve Metafaz II (MII) aşamalarındaki oositler (34).

Ovaryumlardan yukarıda sıralananların dışında morfolojileri düzgün olmayan oositler de elde edilebilir. Bu tip oositlerde ZP kalın ya da yer yer kalın, yer yer ince olabilir veya tüylü bir görünüm sergileyebilir. ZP'nin oval oositin yuvarlak şekilde görülmesi daha çok oositlerin aspirasyonundan dolayı gerçekleşen bir durumdur. Her ikisinin de oval gözükmeye ise uyarımdan kaynaklanan bir anormalliğe işaret eder. I. Kutup cisimciği sitoplazmik parçacıklara ayrılmış (fragmente polar body) veya oositten fazla miktarda sitoplazma olarak olması gerekenden daha büyük durumda bulunabilir. Bölünme sırasında düzgün olmayan organel dağılımları da koyu renkli bölgelere veya vakuollere sahip oositlerin meydana gelmesine neden olabilir. Böyle durumlarda organeller merkezde toplanarak koyu görünüm oluşturur veya düz ER sarnıçlarının bir arada kümeleşmesi vakuollerin oluşmasına hatta sitoplazmanın bir tarafa toplanmasına neden olur. Böyle oositler, embriyo gelişimleri için uygun olmayıp anöploid gibi gelişim anomalilerine neden olabilmektedir (1,35).

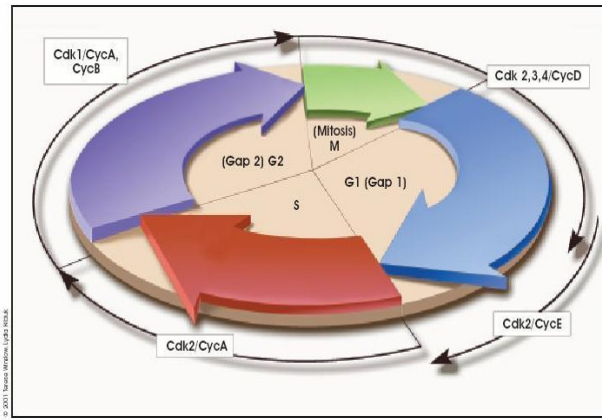
## 2.5. Hücre Döngüsü

**Hücre döngüsü (siklusu)**, iki yavru hücre oluşturmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık olarak tanımlanır. Hücre döngüsü temelde **interfaz** ve **mitoz** olarak ikiye ayrılır. **G<sub>1</sub>**, **S**, **G<sub>2</sub>** olarak üç evreden (fazdan) oluşan interfazın en belirgin olayı hücre çekirdeğindeki DNA'nın iki katına çıkmasıdır. G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> fazları hücreye bölünme için gerekli hazırlığı yapacak zamanı kazandırır. Hücre, G<sub>1</sub> evresinden sonra S fazına girmek yerine G<sub>0</sub> adlı farklı bir evreye girip burada uzun süreler boyunca bölünmeden bekleyebilir. Hücre döngüsü, belirli kontrol noktalarında, bir aksaklık olup olmadığı değerlendirilerek kontrol edilir. Hücre bir problem saptarsa döngü devam etmez .

Hücre döngüsünün kontrolü iki tip protein tarafından kontrol edilir, **siklinler** ve **siklin bağımlı (cyclin-dependent) protein kinazlar (Cdk)** (32,36). Cdk1, hücre bölünme döngüsünün (cell division cycle) kısaltması olan Cdc ile isimlendirilen geninin ürünüdür. Memelilerde Siklin B, hücre döngüsünün G<sub>2</sub> evresinde sentezlenir ve Cdk1 ile birleşerek kompleks oluşturur. Bu kompleks Maturation (Metaphase/Meiosis) Promoting Factor (MPF), olarak da adlandırılır. Buna karşılık Cdk1 hücre döngüsünün her aşamasında hücrede mevcuttur (12,33,37). MPF'ler oluştuğunda Cdk1 iki önemli noktadan fosforile olur. 161. treonin aminoasidinde meydana gelen fosforilasyon CDC1'in aktivasyonunu sağlar. İkinci fosforilasyon 15. aminoasit tirozinde olur. Omurgalılarda ek olarak 14. treonin aminoasidi de fosforlanır. 14 ve 15. aminoasitler fosforlanmış haldeyken MPF inaktiftir. Ancak bu aminoasitler defosforile edildiğinde siklin / Cdk1 kompleksi (MPF) aktif hale gelmiş olur (37). MPF mayoz ve mitozda hücre bölünmesini tetikleyen anahtar moleküldür (12). MPF bir kez aktif olduğunda M fazında meydana gelen pek çok reaksiyonu katalizler. Örnek olarak kromozom yoğunlaşması, çekirdek zarının yıkımı, golgi aygıtının fragmentasyonu ve mayotik ipliğin oluşumu verilebilir. Siklin B'nin yıkımı da yine MPF tarafından kontrol edildiğinden tekrar inaktif haline geri dönebilir (37).

İki önemli siklin-Cdk kompleksi vardır:

- $G_1$ 'de iş gören (başlatıcı kinaz olarak da bilinen)  **$G_1$ -siklin** kompleksi; S fazından önceki kontrol noktasından sonra aktive olarak, hücrenin S fazına girmesini tetikler.
- M-fazı uyarıcı faktör olarak da bilinen (mitotik) **siklin B-Cdk2** kompleksi; mitozu başlatmak için çok sayıda substratı aktive etmek üzere  $G_2$  fazında aşama aşama oluşur. Önce hücreleri bu fazdaki kontrol noktasından geçmeye zorlar, ardından da mitozu başlatır (32,36).



Şekil 6: Hücre Döngüsü (30).

## 2.6. Mayotik Yeterlilik

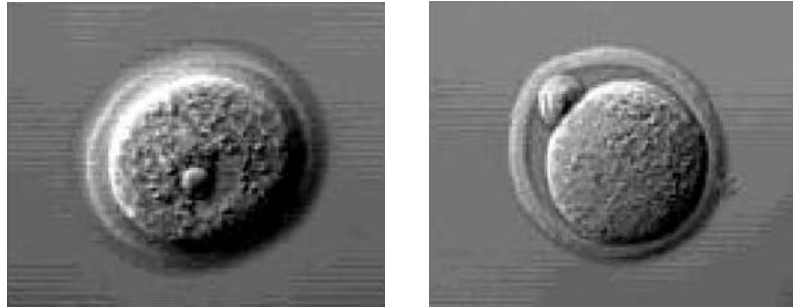
Oositin mayozu tamamlayabilme yeteneğine mayotik yeterlilik (meiotic competence) adı verilir. Mayotik yeterlilik antrum oluşumu sırasında dereceli olarak kazanılır (5,38). Oositler ilk olarak çekirdek zarını parçalayabilecek ve kromozom yoğunlaşmasını tamamlayabilecek özellikleri, ardından metafaz I'i tamamlayacak (33,38) ve son olarak kendisini metafaz II'ye ulaştıracak özellikleri kazanırlar (33,39). Mayotik yeterlilik oositin çapı diğer bir deyişle de folikülün büyüklüğüyle yakın olarak ilişkilidir (33). Oosit bir kez mayotik yeterliliğe ulaştı mı mayotik arresti devam ettirmek için bazı inhibe edici faktörlere ihtiyaç duyar (39). Bu faktörler ilerleyen kısımlarda ayrıntılı olarak incelenecektir.

## 2.7. Oosit Olgunlaşması

Puberteden itibaren küçük popülasyonlar halinde gelişen ovaryum folikülleri içinde bulunan oositler, LH etkisiyle maturasyonlarını tamamlarlar (3,4,5).

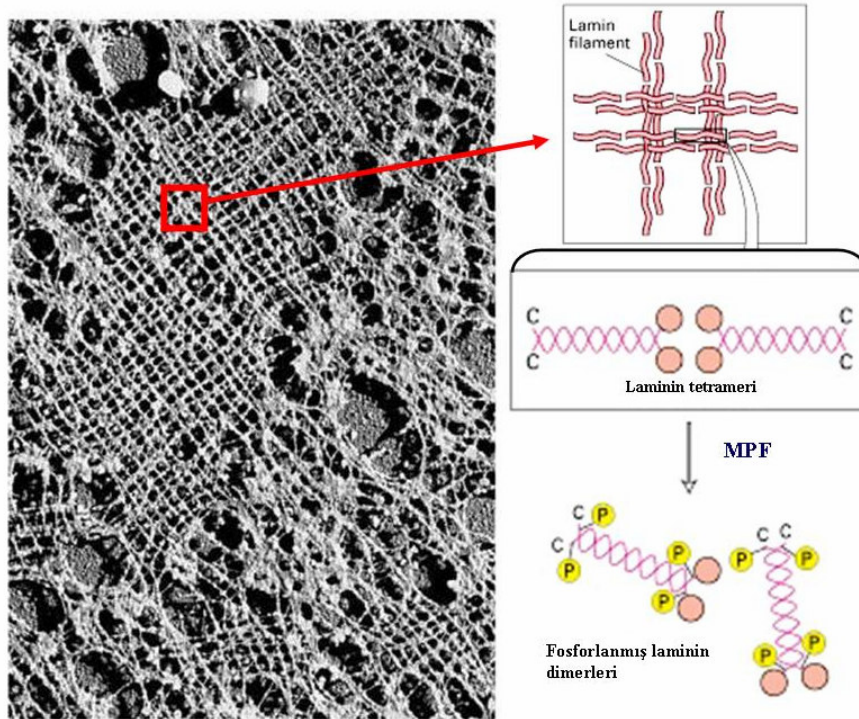
Oosit olgunlaşması çekirdek ve sitoplazmada gerçekleşen değişimleri tanımlamak üzere nükleer ve sitoplazmik olgunlaşma olarak ikiye ayrılabilir. Nükleer olgunlaşma oosit çekirdeğinin GV'den Metafaz II aşamasına geçişi olarak tanımlanabilir. Nükleer olgunlaşma; germinal vesikülün yıkılması, kromozom yoğunlaşması, Metafaz I içiğinin oluşumu, homolog kromozomların ayrılması, ilk kutup cisimciğinin atılması ve metafaz II deki bekleme kapsar (33,40). Sitoplazmik olgunlaşma bu sırada meydana gelen ince yapı düzeyindeki değişiklikleri tanımlar. Sitoplazmik olgunlaşma dolaylı olarak oositin olgun haldeyken normal fertilizasyon, bölünme ve blastosist gelişimini gerçekleştirebilmesini sağlar (33).

Olgunlaşmasını tamamlamış, fertilizasyona hazır bir oositin dişi üreme kanalındaki ömrü oldukça kısa olduğundan mayozda bekleme ve olgunlaşmanın zamanlaması çok sıkı şekilde düzenlenmelidir (5). Ovaryumdaki oositler, FSH ve LH folikül büyümesi ve gelişimini uyarıp mayozu tetikleyene kadar Mayozun Profaz I aşamasının diploten evresinde bekler ve bu uyarımdan sonra mayozu kaldığı yerden Metafaz II aşamasına kadar devam eder (3).



**Resim 7:** Profaz I'deki bir oosit (solda) ile metafaz II'deki bir oosit (sağda). Mayozu tamamlamamış oositteki çekirdek (GV) ile çekirdekçik ve mayozunu tamamlamış oositin birinci kutup cisimciği (polar body) net şekilde görülüyor (41).

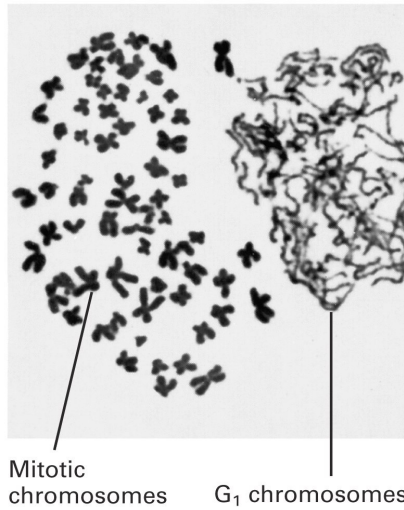
Olgunlaşma sırasında çekirdek zarı katlanmaya başlar, zardaki porlar kaybolur. Çekirdek zarı geride küçük keseler ve çift katlı zar parçacıkları bırakarak hızla ortadan kaybolur (42). Çekirdekçik de sitoplazmayla temas eder etmez ortadan kalkar. Bu olaylar **germinal vezikülün yıkımı (Germinal Vesicle Breakdown - GVBD)** olarak bilinir. GVBD mayozun devam etmeye başladığının gözle görülebilen ilk sinyalidir (40). Burada rol alan protein Cdk1'dir. Cdk1 aktive olduğunda çekirdek zarının iskeletini oluşturan laminin filamentlerini dimerlerine bölerek depolimerizasyonunu sağlar. Ayrıca çekirdek iç zarını ve çekirdek porlarını da fosforlayarak çekirdek zarını küçük parçalar halinde sitoplazmaya dağılmasını sağlar. Kanıtlar çekirdek zarı artıklarının endoplazmik retikulum aracılığıyla emilip kardeş hücreler arasında paylaştırıldığı yönündedir. Aynı kaderi işlevi Cdk1 tarafından durdurularak fragmentasyona giden Golgi aygıtı da paylaşır (37).



**Resim 8:** Çekirdek zarındaki laminin moleküllerinin parçalanması. Soldaki resim çekirdek zarının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile çekimli resmi. Sağ üstte laminin tetramerlerinin çekirdek zarında birbirine dik yerleşimi görülüyor. Sağ alta ise MPF etkisiyle tetramerlerin dimerlere parçalanması resmedilmiştir (43).

MPF'nin buradaki bir diğer fonksiyonu da kromozomların yoğunlaşmasını (kondensasyonunu) sağlamaktır. Sentez fazında DNA replikasyonunu takiben **kohezin** adlı moleküller kardeş kromatidleri birbirine tutturarak bir arada kalmalarını sağlar. Hücre M fazına girdiğinde kohezinler sentromer bölgesi dışında tüm kromozom boyunca ortadan kaybolarak yerini **kondensin** adı verilen proteinlere bırakır. Kromozomların yoğunlaşması tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen kondensinlerin bunda anahtar rol oynadıkları bilinmektedir. MPF aktive olduğunda kondensinleri fosforilayarak aktif hale getirir. Bu olaylar sonucu kromozomlar yoğunlaşarak kısalır ve metafaz plağında yerini alır (37).

MPF'nin ayrıca kromatin iplikleri oluşturan ve DNA'nın paketlenmesinde görev alan temel proteinlerden histonların fonksiyonunda da etkisi vardır. Histon H1, MPF tarafından fosforillenebilmektedir. H1'in de hücre bölünmesinde kromozom yoğunlaşmasında görev aldığına inanılmaktadır (44).



**Resim 9:** Yoğunlaşmış (mitotik) kromozomlar ile  $G_1$  evresindeki yoğunlaşmamış kromozomların karşılaştırılması (43).

Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi mayotik iğciğin oluşumunu da tetikler. Profazın başında Cdk1'in aktivasyonu, S fazında DNA gibi duplike olmuş sentrozomların birbirinden ayrılmasını sağlar. Maturasyon sırasında kutuplara göç

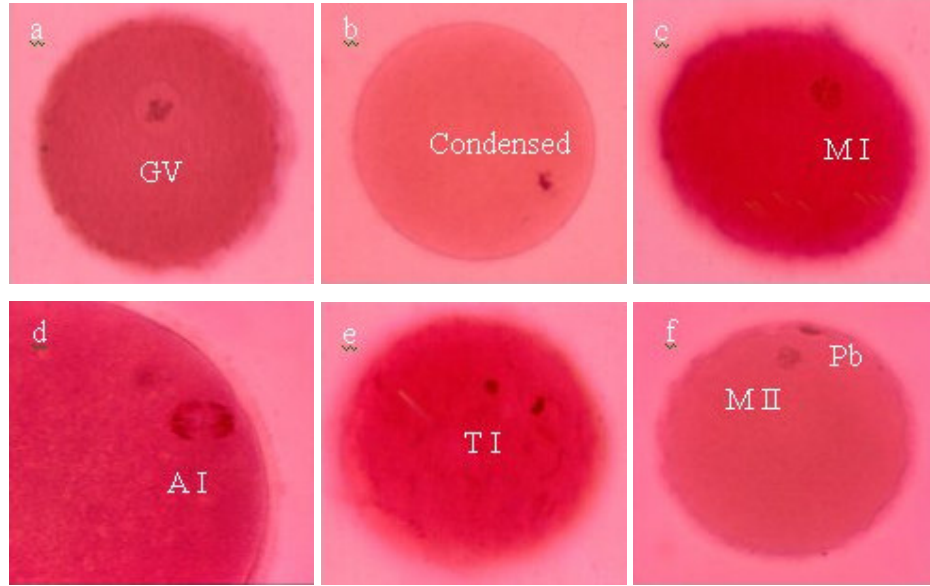


eden sentrozomlar bir yandan da içcik oluşumunda gerekli beta-tubulin ve diğer proteinleri düzenler. Mikrotübül yıkım hızı mitoz sırasında yaklaşık 5–10 kez artarken sentrozomlardaki mikrotübül sayısı da artar. Bu nedenle interfaza göre daha ince ve çok sayıda, radyal dizimli mikrotübüller meydana gelir. Bu işlemler Cdk1 ile Aurora ve Polo benzeri kinazlar tarafından sağlanır. GVBD, bazı mikrotübüllerin kromozomların kinetokorlarına tutunmalarını sağlar.

Kromozomlar metafaz plağında tam olarak aynı düzleme gelene dek mikrotübüllerce ileri geri çekilerek hizalanır. Kromozomların dizilimi bu aşamadaki bir kontrol noktasında kontrol edilir. Homolog kromozomların ayrılması ve kutuplara göçü anafaz I sırasında gerçekleşir. Mikrotübüller homolog kromozomlara bağlanarak birbirinden ayırır. Her kromozom çiftinden biri bir yavru hücreye gider. Kardeş kromatidler ise birbiriyle birleşik durumlarını sürdürür (37).

Telofaz I'de kromozomlar her iki kutupta ve çekirdek zarıyla çevreli durumdadır. İkinci mitotik bölünme kromozom replikasyonu olmadan hızlı bir şekilde gerçekleşir ve oosit Metafaz II'ye ulaşır. Burada oosit tekrar beklemeğe geçer. Bu bekleme aşamasına da Metafaz II (MII) arrest adı verilir. Mayozun tamamlanması ancak fertilizasyon gerçekleşirse mümkün olur. Mayoz tamamlandığında ikinci polar cisimcik atılır, dışı pronükleusu erkek pronükleus ile birleşmeye hazır hale gelir (25).

Nükleer olgunlaşma meydana gelirken aynı anda sitoplazmada da değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler oositi fertilizasyona hazırlar. Sitoplazmik maturasyonda meydana gelen değişikliklere örnek olarak fertilizasyondan sonra başka spermlerin oosit plazma zarına (oolemmaya) bağlanmasını önleyecek kortikal granüllerin sentezi ve periferde doğru göçü verilebilir (1,45). Ayrıca RNA ve protein sentezi için GER ve serbest ribozom sayıları artar. Artan golgi miktarlarıyla birlikte sitoplazmanın viskozitesi de yükselir. Telofaz evresinde viskozite tekrar düşerken işlevleri biten sentriyoller de ortadan kaybolur (1). Sitoplazmik olgunlaşma değerlendirirken kümülüs hücrelerinin ekspansiyonu, kutup cisimciğinin atılımı ve perivitellin aralığının artışı gibi morfolojik parametreleri de hesaba katmak gerekmektedir (33).

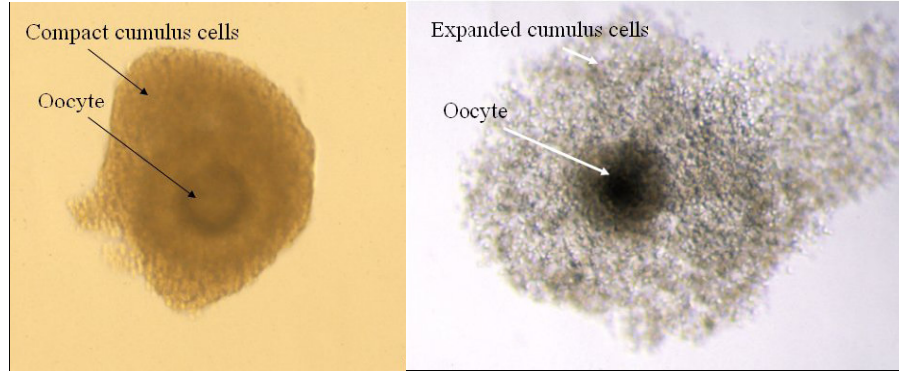


**Resim 10:** Sığır oositlerinde nükleer maturasyonun aşamaları (46).

**Tablo 1:** Sığır oositlerinde nükleer maturasyonun aşamaları (a-f arası harfler yukarıdaki resimleri belirtmektedir) (46).

Fotoğraf	Aşama	Saat
a	Germinal vezikül (GV)	0–6,6
	Germinal vezikülün yıkımı (GVBD)	6.6–8,0
b	Yoğunlaşmış kromozomlar	8.0–10,3
c	Metafaz I (M I)	10.3–15,4
d	Anafaz I (A I)	15.4–16,6
e	Telofaz I (T I)	16.6–18,0
f	Metafaz II (MII) oosit ve kutup cisimciği	18.0–24,0

Gonadotropinle indüklenmiş maturasyonda, oositle çevresindeki kümülüs hücreleri arasında bulunan oluklu bağlantıların sayısı azalır. Aynı sırada kümülüs hücreleri genişleme (expansion) gösterir ve **hiyaluronik asit (HA)** sentezler. Bu olaylar *in vitro* şartlarda, hormonal uyarımın ardından 3. saatte başlatıp 5–18. saatlere kadar sürebilmektedir. Hormonal uyarım yapılmayan maturasyonlarda HA oranının ancak %10'larda kaldığı ve kümülüs genişlemesinin gerçekleşmediği görülmüştür (47).



**Resim 11:** İki farklı kümülüs oosit kompleksi (COC). Solda immatür (Profaz I) bir oosit, çevresine sıkıca yerleşmiş kümülüs hücreleriyle birlikte görülüyor. Sağda ise maturasyonun tamamlanmış, kümülüs hücreleri genişlemiş bir COC görülüyor (46).

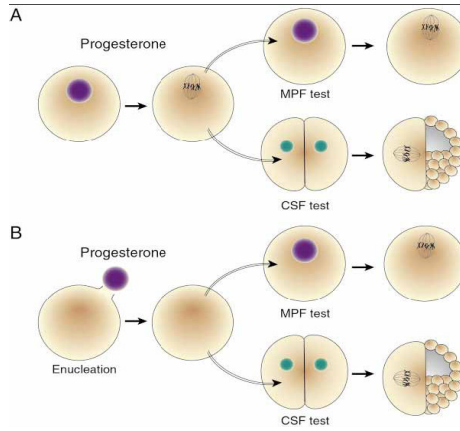
## 2.8. Metafaz II Arrest

Diplotende beklemekte olan oositlerin hormonlarla uyarımı öncelikle Cdk1'in aktivasyonunu tetikler. Uyarılan MPF, görevlerini yerine getirip mayoz I tamamlandığında fonksiyonlarında bir miktar azalma olur ancak mitozdaki aksine tamamen kaybetmez. Sitoplazma bölünmesinin (sitokinezin) ardından Cdk1 aktivitesinde yeniden artış olur ve oosit metafaz II'de beklediği sürece yüksek kalır (37).

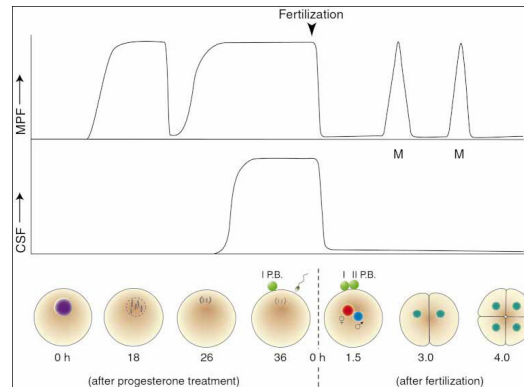
Oositin metafaz II'de beklemesinden sorumlu molekül ilk olarak Yoshio Masui ve Clement Markert tarafından 1971'de tesadüfen keşfedilmiştir. MPF üzerine çalışan Masui, GVBD'yi tamamlamış oositin bir miktar sitoplazmayı çekerek bölünmekte olan embriyonun blastomerlerinden birine transfer etmişler, Ancak enjeksiyon sonucunda, enjeksiyon yapılmayan blastomerlerin normal şekilde bölündüklerini, sitoplazma enjekte edilen blastomerin ise bölünmeye devam etmeyip metafaz aşamasında kaldığını gözlemlemişler.

Deneyleri bu kez de GVBD gerçekleşmemiş oositlerden aldıkları sitoplazmayla tekrarlayan ekip enjeksiyon yapılan blastomerin de yapılmayanlar gibi düzgün şekilde bölündüğünü tespit etmişlerdir. Böylece araştırmacılar metafaz II (MII) aşamasındaki oositlerin bölünmesini durduran inhibe edici bir

faktör bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Cyto-Static Factor (CSF) adı verilen bu faktörün oosit mayoz bölünmesinin değişik zamanlarında tekrar edilmesiyle araştırmacılar, CSF'nin oosit metafaz I (MI) aşamasından sonra ortaya çıktığını, zamanla giderek artarak oosit matür halde durdukça yüksek seviyelerde bulunmaya devam ettiğini ortaya koymuşlardır. CSF miktarı ancak fertilizasyon gerçekleşikten hemen sonra düşmektedir. Deneyi bu kez de çekirdeği çıkartılmış oositlerde gerçekleştiren Masui ve ark. aynı sonuçları elde ettiklerinden CSF aktivitesinin çekirdekten bağımsız olduğunu belirtmişlerdir (48).



**Şekil 7:** MPF ve CSF aktiviteleri. Matür bir oositin sitoplazmasının, immatür bir oosite veya gelişmekte olan iki hücreli bir embriyodaki blastomerlerden birine transferi, sitoplazmayı alan hücrenin MII aşamasında kalmasını sağlar. Sitoplazma alınan oositin çekirdekli veya çekirdeksiz olması durumunda sonucun değişmemesi, MPF ve CSF'nin çekirdekten bağımsız üretildiğini göstermektedir (48).



**Şekil 8:** MPF ve CSF aktivitelerinin oosit maturasyonu, yumurta aktivasyonu ve erken bölünme aşamalarındaki miktarları (48).

Daha yakın zamanlarda yapılan çalışmalar CSF'nin temel bileşenlerden birinin Mos olarak bilinen bir serin/threonin kinaz olduğunu göstermiştir. Mos'un özellikle mayoz I'in bitişine yakın sentezlendiği ve metafaz I-anafaz geçişi ile metafaz II arrestinde Cdk1/siklin B aktivitesinin korunması için gerekli olduğu ortaya koyulmuştur.

Mos, hücre sinyal mekanizmalarında merkezi rol oynayan MAP kinaz yolunu aktive ederek fonksiyon göstermektedir. Sinyal yolundaki proteinler Mos → MEK → ERK → Rsk şeklinde sıralanmaktadır. Rsk, iki yoldan MPF aktivitesini koruyarak fonksiyon göstermektedir. Bunlar; siklin B sentezinin uyarımı, ve siklin B yıkımının engellenmesidir. İkinci fonksiyonunu, anafaz tetikleyici bir protein kompleksi olan Mad/Bub proteinlerini, M fazı mayotik içcik kontrol noktasında gerçekleşene benzer şekilde inhibe ederek yerine getirmektedir. Böylece oosit metafaz II'den anafaz aşamasına geçemez. Bu aşamadaki oositler fertilizasyonu bekleyerek birkaç gün boyunca yaşamını devam ettirebilir (37).

## **2.9. Olgunlaşmada Etkili Mekanizmalar**

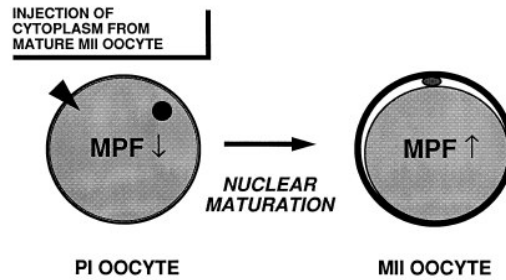
Oosit maturasyonu, pek çok hücre içi ve hücre dışı faktörün etkileşimiyle meydana gelen oldukça karmaşık bir mekanizmadır. Bu, oositi mayozda bekleten ve olgunlaşmasını tetikleyen faktörler arasındaki hassas dengeler sayesinde gerçekleşmektedir (3). Bu faktörler aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

### **2.9.1. MPF**

Maturasyonda en etkili molekül olan MPF, ilk olarak 1971 yılında Yale Üniversitesi'nden Yoshio Masui ve Clement Markert tarafından keşfedilmiştir.

Önceki çalışmalarında progesteronun kurbağa oositlerine dışardan verildiğinde maturasyonu başlattığını ancak oosit içine enjekte edildiğinde aynı etkiyi yaratmadığını gözlemleyen araştırmacılar, progesteronun yalnızca hücre yüzeyine yakın bölgede tanınabileceği sonucunu çıkarmışlardır. Bunun da hücre içinde bir sinyal yaratabileceği fikrinden yola çıkan Masui ve arkadaşları, progesteronla muamele edilmiş matür oositlerden aldıkları 10–20µl kadar sitoplazmayı henüz olgunlaşmamış kurbağa oositlerine enjekte etmişlerdir. Sonuç olarak sitoplazmayı alan oositin bir hormon muamelesi olmadan maturasyona gittiğini gözlemlemişlerdir. Böylece sitoplazmada, hormonal uyarımdan sonra maturasyonu başlatan bir faktör olduğunu ortaya koyan araştırmacılar bunu **Maturasyon Uyarıcı Faktör (Maturation Promoting Factor - MPF)** adını vermişlerdir. (37,48)

Birkaç yıl sonrasında MPF *Xenopus* cinsi kurbağalarda da bulunmuş ancak 1976'dan sonra çeşitli türlerden amfibi olmayan canlılarda da varlığı gösterilebilmiştir (48). Daha sonraki çalışmalar MPF'nin yalnız üreme hücrelerinde değil somatik hücrelerde de bulunduğunu ve G<sub>2</sub>-M geçişini tetiklediğini ortaya koymuştur. Buna göre MPF, M fazında genel bir düzenleyici olarak rol oynamaktadır (37).



**Şekil 9:** İmmatür bir oosite sitoplazma enjeksiyonu. Matür bir oositten sitoplazma alan immatür oosit maturasyonunu tamamlayarak MII aşamasına geçiyor (44)

Günümüzde MPF'nin, Cdk1 ve Siklin B moleküllerinin birleşmesinden meydana geldiği bilinmektedir. Ayrıntılı çalışmalar, her iki molekülün de geniş bir protein ailesinin üyeleri olduğunu, farklı siklinler ve Cdk1 ilişkili kinazların da farklı türlerin farklı hücrelerde ve hücre döngüsünün değişik aşamalarında MPF

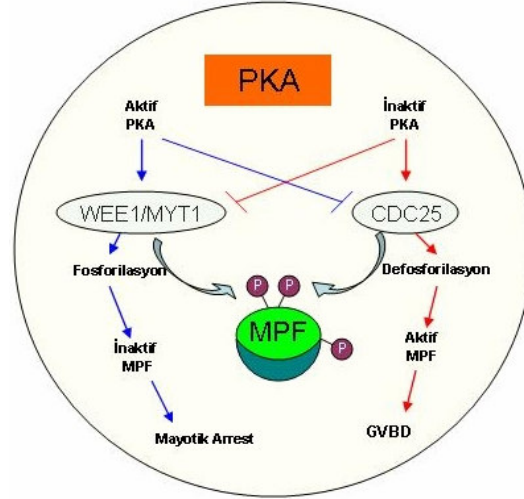
ile analog fonksiyon gösterdiklerini ortaya koymuştur. Bu nedenle MPF daha sonra M fazı uyarıcı faktör olarak isimlendirilmiştir (37).

Gelişmekte olan preantral bir folikülde henüz oosit içinde yeterli miktarda aktif MPF bulunmadığı için mayotik yeterliliğe ulaşamadığından diploten aşamasında beklemektedir (49). Oositin mayotik yeterlilik kazanması CDK1 ve siklin gibi maturasyon tetikleyici proteinlerin miktarlarının eşik değerlerinin üzerine çıkmasını sağlar. Böyle bir oosit matür hale geçebilecek potansiyele sahip olmasına rağmen LH piki oluşuncaya kadar profaz I'de beklemeye devam etmektedir. Bunun için de MPF'nin inaktif halde tutulması gerekmektedir (5).

### 2.9.2. PKA

1970'lerde pek çok canlı türünde GVBD için yeni protein sentezine hatta sentezi başlatacak bir moleküle bile gerek olmadığı gösterilmiş, MPF'nin aktivitesinin mevcut proteinlerin modifikasyonu sonucu değiştiği fikri benimsenmiştir (48). 1977 yılında Maller ve Krebs, PKA'nın spesifik bir inhibitörünün GVBD'yi tetiklediğini belirleyerek PKA'nın maturasyondaki rolünü ortaya çıkarmışlardır. Daha sonraki çalışmalar, PKA'nın MPF'nin inaktif halde tutulmasında dolaylı yoldan etkileri olduğunu göstermiştir (48). Günümüzde MPF aktivitesinin, protein kinaz A (PKA) tarafından, kontrol edildiği bilinmektedir (5,32,48).

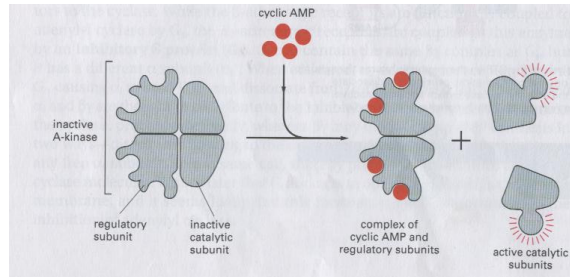
PKA, tam olarak belirlenememiş birtakım aşamalardan sonra fosfataz CDC25 ve kinaz WEE1/MYT1 aktivitelerini düzenler (5). Bu moleküllerden CDC25, CDK1'in 14 ve 15. aminoasitlerini defosforile ederken WEE1/MYT1, fosforile eder. Başka bir deyişle WEE1/MYT1 aktif iken MPF inaktif haldedir; oosit mayozu sürdüremez (mayotik arrest). Cdc25b aktif halde iken MPF aktiftir; oosit mayozu devam eder (5,37).



Şekil 10: Protein Kinaz A'nın MPF'ye etki mekanizmaları (Hakan DARICI, 2007).

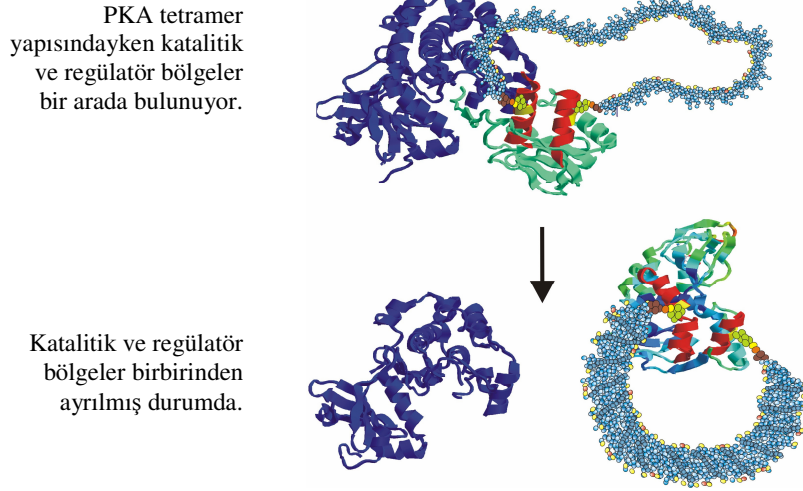
Lincoln ve arkadaşları CDC25b geni bulunmayan farelerin maturasyonu devam ettiremediği gözlemleyerek bu fosfatazın önemini belirtmişlerdir. WEE1/MYT1 için benzer knockout çalışmaları henüz yapılmamıştır (5).

İlk kez 1968 yılında Walsh ve Krebs tarafından keşfedilen Protein kinaz A (A kinaz) inaktif halde iki katalitik ve iki regülatör alt ünitelerden oluşan tetramer yapıda bir moleküldür. Üzerinde **halkasal adenozin mono fosfat (cAMP)** molekülleri için dört adet bağlanma bölgesi içerir (37,50). Regülatör bölgelere ikişer adet cAMP bağlanması PKA'nın yapısını değiştirerek katalitik ve regülatör bölgelerin birbirinden ayrılmasına neden olur. Katalitik bölgeler ATP'den bir fosfat kopararak hedef proteinin serin veya threonin rezidülerini, fosforlar (5,33).



Şekil 11: PKA'nın aktivasyonu. 4 adet cAMP molekülü, inaktif haldeki PKA'ya bağlanıp katalitik ve regülatör bölgeleri birbirinden ayırarak PKA'nın aktif hale gelmesine yol açıyor (50).



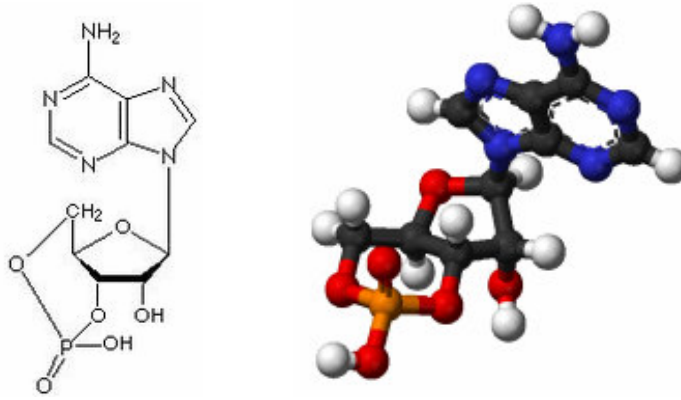


**Resim 12:** PKA'ya cAMP bağlanması sonucu yapısında meydana gelen değişiklik (51).

### 2.9.3. cAMP

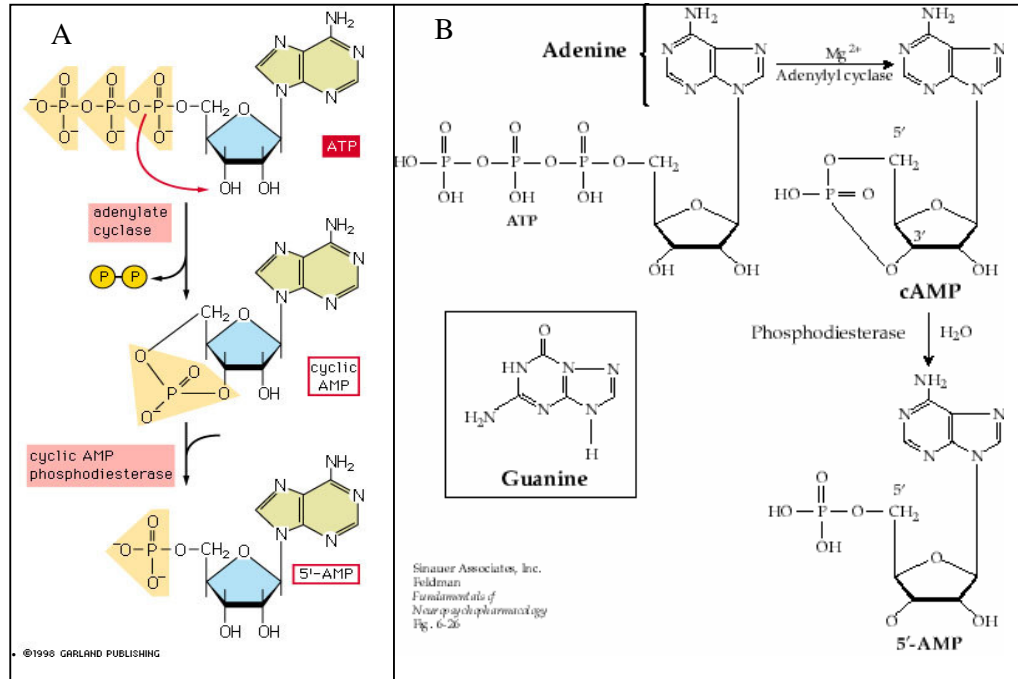
cAMP, oosit olgunlaşmasını düzenleyen anahtar moleküldür (4). 1958 yılında Sutherland tarafından, hormonal uyarımın ardından işlev gören ikinci mesajcı olarak görev aldığı belirlenmiştir. cAMP, üç farklı mekanizma ile hücre içi reaksiyonları düzenlemektedir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

1. cAMP bağımlı protein kinazı (PKA) aktive ederek başka hedef bir proteinin aktivitesini düzenleyebilir.
2. PKA aracılığıyla cAMP yanıt elementi (cAMP respons element, CRE) adlı protein ile etkileşip spesifik bir genin transkripsiyonunu başlatarak,
3. Direkt olarak iyon kanallarını açıp kapatarak (37,52).



Şekil 12: cAMP'nin 2 ve 3 boyutlu yapısı (53,54).

cAMP'nin sentezinde hammadde olarak ATP kullanılmaktadır. Bunun için ATP'den **adenilil siklaz (AC)** enzimi aracılığıyla iki fosfat koparılır ve geride kalan fosfat, riboz halkasının 3. ve 5. karbon atomlarına halkasal bir şekilde bağlanır (50). cAMP, görevini tamamladıktan sonra hızla ortadan kaldırılır. Burada görevli enzimlere **halkasal AMP fosfodiesterazları (PDE)** adı verilmektedir. PDE'ler cAMP'nin 3. karbon atomundaki bağı hidrolizleyerek biyolojik inaktif formu 5'-monofosfata (5'-AMP) dönüştürmektedir (55).



Şekil 13: ATP'den cAMP sentezi ve 28P'nin AMP'ye dönüştürülmesi A (50) B (56).

cAMP'nin maturasyon üzerine etkisinde en önemli rolü PKA oynamaktadır (5). PKA, ATP'nin en ucundaki fosfatın, hedef proteindeki serin, treonin veya tirozin rezidülerine transferini katalizler. Fosfatın (P) hedef proteine kovalent bağlanması o proteinin aktivitesini düzenler (57).

Yüksek cAMP düzeyleri PKA'yı aktif (regülatörden bağımsız) halde tutarak tam olarak bilinmeyen bazı proteinlerin fosfatlanmasını sağlamaktadır (49). Bu mekanizma sonucu WEE1/MYT1 ve Cdc25 proteinlerinin fonksiyonları düzenlenerek MPF inaktif halde tutulmaktadır (5).

Oosit içi yüksek cAMP düzeylerinin fare oositlerinde maturasyonu engellediği ilk olarak 1974 yılında Cho ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş, daha sonra denizyıldızı, *Xenopus* ve diğer memeli türlerinde de aynı etki gözlenmiştir (58,49). 1983 yılında, Bornslaeger ve Schultz, oosit içindeki cAMP düzeyleri yüksek tutularak maturasyonun engellenebileceğini göstermiştir (58).

Hücre zarından geçebilen cAMP türevleri *dibütiril cAMP (dbcAMP)* veya *8-bromo-39,59-cAMP (8-Br-cAMP)* medyuma eklendiğinde mayozun devam etmesi engellenmektedir (55). cAMP düzeylerini arttıracak farmakolojik ajanların kültür ortamına verilmesiyle de benzer bulgular raporlanmıştır (49). Buna yönelik çalışmalarda, oositler, adenilil siklaz üretiminden sorumlu enzim AC aktivatörü *forskolin* içeren medyumda bekletilerek hücre içi cAMP oranını 5-10 kat arttırılmış ve oositin maturasyona devam etmediği gözlenmiştir (59). cAMP yıkımından sorumlu enzim PDE3A'yı inhibe edici *isobutylmethoxyxanthine (IBMX)* kültür medyumuna eklendiğinde de aynı sonuçlar elde edilmiştir (58).

PKI olarak bilinen protein kinaz inhibitörünün veya PKA'nın katalitik alt ünitelerinin oositlere enjeksiyonu ile gerçekleştirilen klasik çalışmalar da cAMP'nin PKA ile etkileşimi sonucu maturasyonu düzenlemesiyle ilgili verileri desteklemektedir (49).

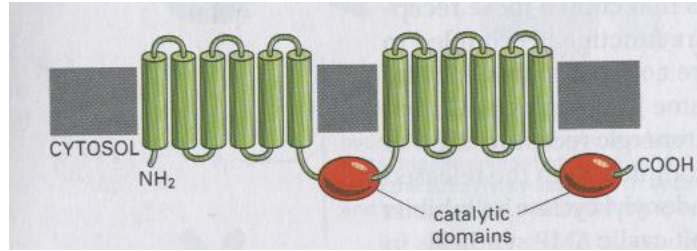
Folikül gelişiminin erken dönemlerinden itibaren oosit ve çevresindeki somatik hücreler (granüloza hücreleri), aralarındaki oluklu bağlantılar sayesinde birbirleriyle yakın ilişki içerisinde bulunmaktadır (60). Oluklu bağlantılar; kümülüs hücrelerini birbirleriyle ve en içteki kümülüs tabakasını da oositin hücre zarıyla (oolemma) bağlayarak, sinyal molekülleri ve besin maddeleri gibi küçük moleküllerin transferine izin vermektedirler (47,60).

Mayotik arrest süresince yüksek olan cAMP düzeylerinin maturasyonun erken dönemlerinde düştüğü bilinmektedir (5). Memelilerde maturasyonun, oosite sıkı sıkıya bağlı kümülüs hücrelerinin oosit çevresinden uzaklaştırılmasıyla da kendiliğinden tetiklendiği bilinmektedir (47,61,62). Bu nedenle, uzun süre boyunca cAMP'nin, çevredeki granüloza hücrelerinden, oluklu bağlantılar (gap junctionlar) aracılığıyla oosite aktarıldığı düşüncesi benimsenmiştir (5,59). Bu düşüncüyü destekleyen bir diğer olgu da maturasyon sırasında kümülüs hücreleri ile oosit arasındaki bağlantıların sayısının azalmasıdır (47). Bu bulgudan köken alan bir düşünce, LH'ın oosit ile kümülüs hücreleri arasındaki oluklu bağlantıları kopararak oosite cAMP geçişini önlediği ve düşen cAMP seviyelerinin maturasyonu başlattığı şeklindeydi (63). Fakat bağlantıların maturasyondan sonra yine de devam ettiğine dair bulgular da mevcuttur (61). 2002 yılında Webb ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada cAMP seviyesini ölçmek için florasan boyalarla işaretli PKA kullanmışlardır. PKA'nın katalitik alt ünitelerini *fluorescein* ile regülatör alt ünitelerini de *rhodamine* ile işaretleyen araştırmacılar iki boyanın ışımaya miktarındaki değişiklikleri kıyaslayarak PKA'nın bütün halde olup olmadığını dolayısıyla cAMP'nin ortamda bulunarak PKA'ya bağlanma oranını incelemişlerdir. Daha önceki çalışmalarda cAMP oranını ölçmede hep *radioimmunoassay (RIA)* metodunu kullanmıştır. Araştırmada RIA'da ölçüm yapılırken PDE'lerin inhibe edilmesi gerektiğinden sonuçların tam olarak gerçeği yansıtmayabileceği, kendi ölçüm yöntemlerinin PDE'den bağımsız olduğu için daha doğru sonuçlar vereceği vurgulanmıştır. Çalışma sonucunda FSH'ın oosit cAMP seviyesinde artışa neden olduğu, bu artışın, ortamda oluklu bağlantıları bloklayan *carbenoxolon* varken gerçekleşmediğini ortaya konulmuştur. Ayrıca PKA'nın lokalizasyonu incelenmiş ve cAMP ile aktivasyonundan sonra regülatör bölge olduğu yerde kalırken katalitik bölgenin sitoplazma ve GV'ye doğru difüze olduğu belirlenmiştir. Fakat cAMP'nin kaynağının yalnızca kümülüs hücreleri olmadığı da belirtilmektedir. Çünkü granülozalardaki FSH kaynaklı cAMP artışı oosite ancak birkaç dakika sonra gerçekleşmekte ve artışın miktarı arada geçen süreden bağımsız olmaktadır. Bu sonuçlar cAMP'nin oluklu bağlantılardan geçişinin oositi içi yüksek düzeylerini açıklamaya yetmeyeceğini ancak oluklu bağlantıların yine de cAMP düzeylerine etkisi olduğunu ortaya koymuştur.

Araştırmacılar elde edilen sonuçlara göre, kümülıs hücrelerinin cAMP'nin arttırılması için uyarıcı bir sinyal yollayabileceğini ve maturasyonda bu sinyalin inhibe ediliyor olabileceğini belirtmişlerdir (63).

#### 2.9.4. Adenilil Siklaz

Kaynağı hangi hücre olursa olsun, cAMP üretimi hücre membranına bağlı, adenilil siklaz (AC) adı verilen bir enzim tarafından sağlanmaktadır. Omurgalılarda yaklaşık 1100 aminoasitten içeren AC, her birinde altı segment bulunan iki transmembran bölge ile birbirine benzer iki sitoplazmik katalitik üniteden oluşmaktadır (50).



şekil 14: Adenilil siklazın yapısı (50).

Bilinen 10 farklı AC formu bulunmaktadır. Sığırlarda yapılan bir çalışma bunlardan AC 1 izoformunun yalnız kümülıs hücrelerinde AC 8'in yalnız mural granüloza hücrelerinde, AC 3, 4, 6 ve 9'un ise her iki tip hücrede de bulunduğunu göstermiştir (13). Fare ve sıçanlarda yapılan analizlere göre de oositlerde; AC1, AC3 ve AC9 izoformlarının mevcut olduğu; genetik olarak AC3 izoformundan yoksun farelerde oositlerin ovaryum folikülleri içindeyken bile maturasyona gittiği gözlemlenmiştir (5).

cAMP'nin çevredeki kümülıs hücrelerinden oosite geçmekte olduğu hipotezine alternatif olarak geliştirilen başka bir teori de oositin kendi cAMP'sini

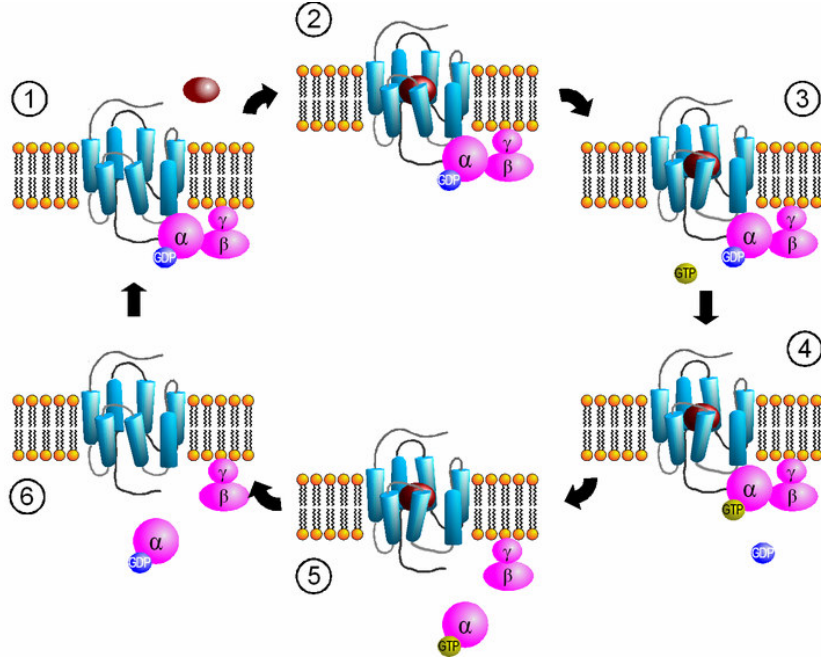
kendisinin ürettiğidir. Bu teoriye göre oosit, plazma membranında bulunan bir G protein reseptörü, bu reseptör aracılığıyla aktive edilen G proteini ve G proteinince aktive edilen AC'yi kullanarak cAMP sentezlemektedir. Dayanak olarak da oositin üretim için gerekli olan tüm bileşenlere (G proteini, G protein reseptörü, AC) sahip olması gösterilmektedir. Ayrıca, izole oositlerin AC aktivatörü forskolin ile kültüre edilmesi sonucunda GVBD'nin gecikmesi ve yine izole oositlerde PDE inhibitörü IBMX ile kültürün oosit içi cAMP düzeyinde artışa neden olduğu gösterilmektedir (5,15,58,62,64-68).

### 2.9.5. G proteinleri

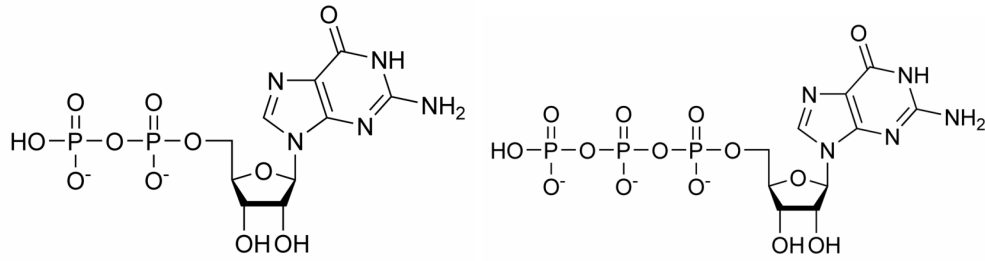
1970'lerde Rodbell ve arkadaşları GTP'nin adenilil siklazın aktivasyonu için gerekli olduğunu belirlemişlerdir. Bu buluş, guanin nükleotidi bağlayıcı proteinin (kısaca G proteini) bu aktivasyonda aracı olduğunun keşfedilmesine yol açmıştır. O zamandan beri G proteinlerinin, çeşitli hücre içi hedef moleküllerinin hücre dışı sinyallere cevabını düzenleyerek pek çok fizyolojik olayda başlatıcı veya bitirici fonksiyonları olduğu ortaya konmuştur (37).

G proteinleri  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olarak 3 alt birimden oluşmaktadır. Diğer guanin bağlayıcı proteinlerle karıştırılmaları için çoğunlukla heterotrimerik G proteinleri olarak adlandırılırlar. Ras gibi GTP ilişkili proteinler monomerik G proteinleri olarak isimlendirilmektedir.

G proteinin  $\alpha$  alt ünitesi, guanin nükleotidini bağlayarak G proteininin aktivitesini düzenler. Dinlenme durumunda  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  üniteleri bir arada bulunmakta,  $\alpha$  alt ünitesine bir adet de guanozin difosfat (GDP) molekülü bağlıdır. G protein reseptörüne yapılan bir uyarım reseptörün proteini uyarmasına,  $\alpha$  alt ünitesinin de GDP'yi bırakarak yerine GTP bağlamasına yol açar. Böylece aktive olan  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ 'dan ayrılır. Hem ayrılan GTP- $\alpha$  kompleksi hem be bir arada kalan  $\beta\gamma$  kompleksi farklı reaksiyonları başlatabilme yeteneğindedir. Görevini tamamlayan  $\alpha$  alt ünitesindeki GTP, GDP'ye dönüştürülerek  $\alpha$ 'nın tekrar  $\beta\gamma$  ile kompleks oluşturması sağlanır (37,50).



**Resim 13:** G proteininin bir ligand aracılığıyla uyarılması (69).



**Şekil 15:** GDP ve GTP'nin biyokimyasal yapısı (70,71).

Memeli genomunda  $\alpha$  için 20,  $\beta$  için 5 ve  $\gamma$  için 12 farklı tip belirlenmiştir. Bu çeşitlilik sayesinde G proteinleri değişik hücre içi fonksiyonları kontrol edebilmektedirler. Örnek olarak epinefrin reseptörüne bağlı G proteini  $G_s$  ( $G_{stimulatory}$ ) olarak isimlendirilmektedir çünkü  $\alpha$  alt ünitesi AC'yi aktive edebilmektedir.  $G_i$  ( $G_{inhibitory}$ ) olarak adlandırılan G proteini de AC'yi inhibe ederek hücre içi cAMP miktarını düşürebilmektedir. Bunu hem  $\alpha_i$  alt ünitesiyle AC'yi inhibe ederek hem de  $\beta\gamma$  alt üniteleriyle sitoplazmadaki serbest  $\alpha_s$  alt ünitelerine bağlanıp etkisizleştirerek gerçekleştirir. Benzer şekilde iyon kanallarını açıp kapatan G proteini tipleri de bulunmaktadır (37,72).

**Tablo 2:** Temel G protein aileleri (72).

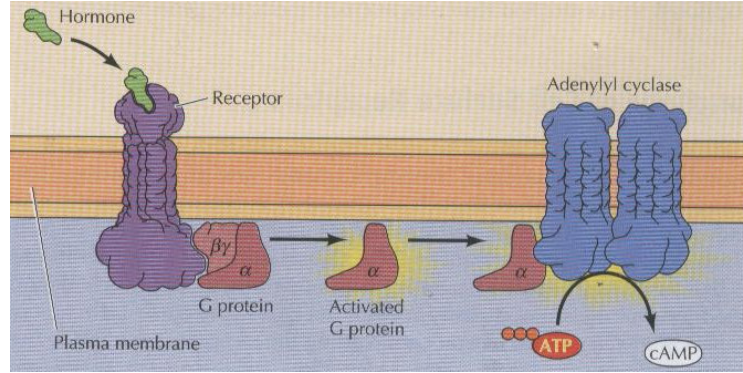
Aile	Üyeler	Aracı alt ünite	Fonksiyonu
I	Gs	$\alpha$	Adenilil siklazı ve $Ca^{2+}$ kanalını aktive eder
	Gi	$\alpha$ $\beta\gamma$	Adenilil siklazı inhibe eder K <sup>+</sup> kanalını aktive eder
II	Go	$\beta\gamma$	K <sup>+</sup> kanalını aktive eder, $Ca^{2+}$ kanalını inhibe eder
		$\alpha$ ve $\beta\gamma$	Fosfolipaz C- $\beta'$ 'yi aktive eder
	Gt	$\alpha$	halkasal GMP fosfodiesterazı aktive eder
III	Gq	$\alpha$	Fosfolipaz C- $\beta'$ 'yi aktive eder

Oosit içinde yüksek düzeylerdeki cAMP'nin kaynağı son yıllara kadar tam olarak bilinmemekteydi. 2002 yılından sonraki çalışmalar bu kaynağın büyük ölçüde oositin kendisi olduğunu ortaya koymuştur. Science'da yayınlanan bir makalede, Mehlmann ve arkadaşları yeni bir teknik kullanarak, Gs'nin  $\alpha$  alt ünitesini inhibe eden bir antikoru antral folikül içindeki GV aşamasında oosite enjekte etmişler ve oositin folikül içindeyken maturasyonunu tamamladığını gözlemlemişlerdir (68). 2004 yılında Kalinowski ve arkadaşları, yine Mehlmann önderliğinde bir çalışmada G<sub>s</sub>'nin dominant negatif bir formunu oositlere enjekte etmiş ve aynı sonuçları almıştır (67).

### 2.9.6. G Proteini Reseptörleri

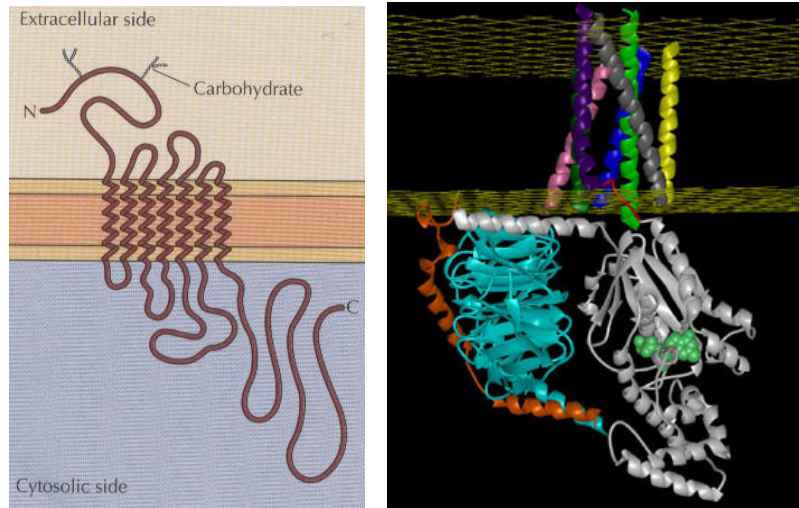
G proteinlerinin aktivitesi, kendisiyle yakın temas içinde bulunan geniş bir reseptör grubu tarafından kontrol edilmektedir. Hücre yüzey reseptörleri içinde en geniş aileyi bu gruptaki reseptörler oluşturmaktadır. G proteini bağlantılı reseptör (G protein coupled receptor, GPCR) adı verilen bu reseptörler pek çok peptid hormon, nörotransmitter ve nöropeptid için reseptör görevi yapar. Binden fazla tipi tanımlanan GPCR'ler ayrıca görme, koklama ve tad almada da görev yapmaktadırlar (37,72).





Şekil 16: GPCR aracılığıyla AC'nin aktivasyonu (37).

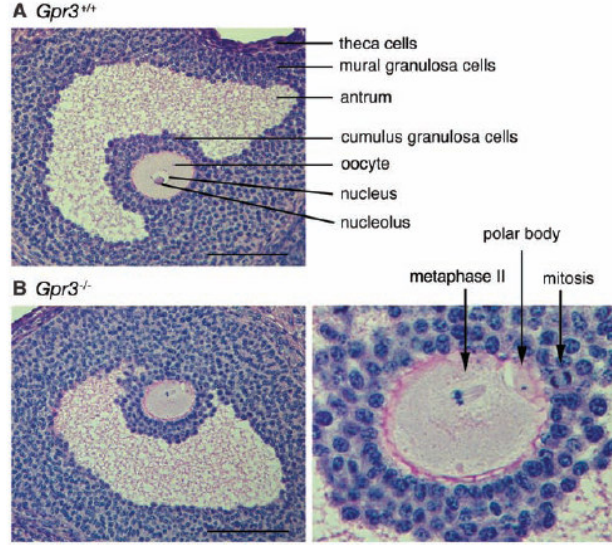
GPCR'ler yedi transmembran  $\alpha$  heliksten oluşmaktadır. Zincir, hücre dışında  $\text{NH}_2$  ile hücre içinde  $\text{COOH}$  ile sonlanmaktadır. Ekstraselüler kısmına ligand bağlanması, hücre içindeki kısmında, G proteininin bağlanmasına olanak sağlayacak yapı değişikliğine yol açar. Bu bağlanma G proteinini etkileyerek sinyalin hücre içindeki hedefine iletilmesini başlatmış olur (36,37,50).



Şekil 17: G proteini bağlı reseptör (GPCR) solda şematik olarak (37), sağda G-proteinine bağlanmış şekilde 3 boyutlu olarak (73) gösteriliyor.

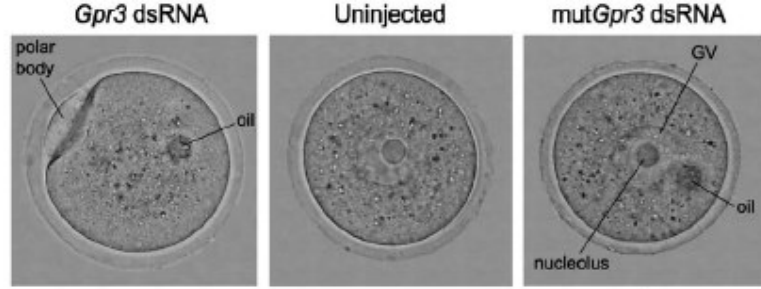
Mehlmann ve ekip arkadaşları 2004 yine Science'da yayımlanan bir çalışmada oositlerde bulunan  $G_s$  bağımlı reseptörlerden **GPR3** knockout

(*Gpr3<sup>-/-</sup>*) farelerde oositlerin maturasyonlarını daha antral folikül aşamasındayken tamamladıklarını göstererek immatür oositlerdeki cAMP'nin kaynağının büyük ölçüde oositin kendisi olduğu yolundaki teorilerini doğrulamışlardır (62).



**Resim 14:** (A) *Gpr3<sup>+/+</sup>* farelerdeki normal antral folikül ve içindeki GV oosit. (B) *Gpr3<sup>-/-</sup>* farelerde antral foliküldeki bir oositin MI'i tamamlayıp polar cisimciği attığı ve metafaz plağını oluşturduğu gözlenmiştir (62).

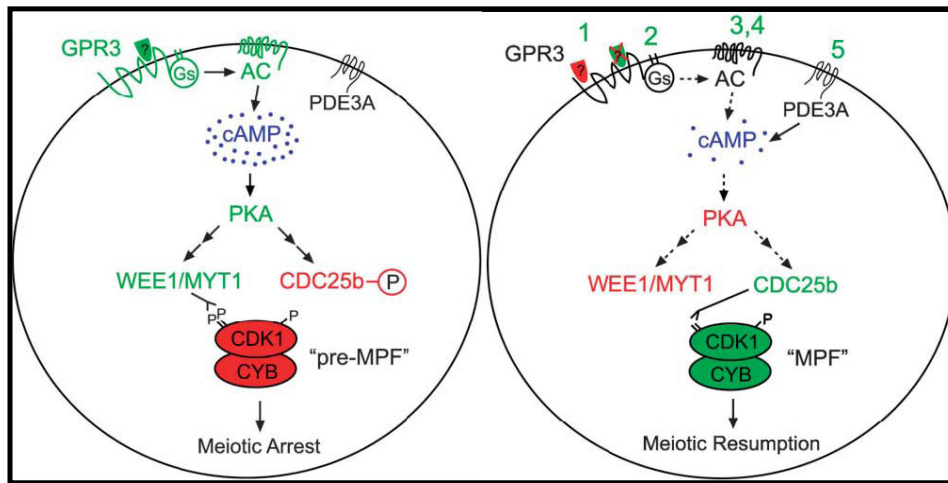
Lisa Mehlmann, 2005 yılında, G proteinlerinin fonksiyonunu bu kez RNAi (RNA interference) tekniğini kullanarak antral folikül içerisindeki oositlere GPCR'nin sentezini baskılayacak GPCR mRNA'larına özgü siRNA (small interfering RNA) enjekte ederek araştırmıştır. Oositler 72 saatlik kültürün ardından izole edilerek incelenmiş, uygun GPR3 dsRNA'lar (çift zincirli) enjekte edilen oositlerin foliküller içerisinde maturasyonunu tamamladığı, mutant dsRNA enjekte edilen veya hiç enjeksiyon yapılmayan gruplardaki oositlerin ise GV aşamasında kaldığı gözlemlenmiştir (74).



**Resim 15:** GPR3 için RNAi enjekte edilen oosit, MII (solda), enjeksiyon yapılmamış oosit (ortada) ve mutant GPR3 için RNAi enjekte edilmiş oosit (sağda) PI aşamasında görülüyor (74).

Bu alanda yapılan benzer çalışmalardan Ferduson ve arkadaşlarının sıçan ile fare oositlerini karşılaştırdıkları araştırmada, farelerdeki GPR3 reseptörüne karşılık sıçanlarda GPR12'nin analog fonksiyon gösterdiğini belirlemişlerdir (66).

cAMP'nin oosite çevredeki granüloza hücrelerinden oluklu bağlantılar aracılığıyla girdiği düşüncesi yaygınken LH'nin mayozu tetiklemek için oluklu bağlantıların cAMP geçirgenliğinde azaltma meydana getirdiği düşünülüyordu. Oositin, mayotik arresti devam ettirebilmek için yeterli cAMP üretebiliyor olduğunun ortaya çıkarılmasından sonra bu kez de LH'nin oluklu bağlantıların cAMP geçirgenliğinde artışa neden olarak oosit içindeki cAMP'nin kümülüs hücrelerine geçişine olanak tanıyor olabileceği de akla gelmiştir (15).



**Şekil 18:** GPR3'e bir ligand bağlanmasıyla gerçekleşen cAMP üretimi ve MPF inhibisyonu soldaki şekilde gösterilmiştir. Sağdaki şekilde 1'den 5'e kadar numaralanan moleküller oosit maturasyonunu tetikleyebilecek olası moleküller arasında görülmektedir (5).

$G_s$  proteinlerinin GV aşamasının korunmasında görev alması yine G proteinlerinin maturasyonun başlatılmasında görevi olabileceği düşüncesini akla getirmiştir (5,15).

$G_i$  proteinleri, içinde oositteki hakim AC formu, AC3'ün bulunduğu pek çok AC formunu inhibe etmekte ve ek olarak PDE'leri de uyarmaktadır. Denizyıldızı ve balıklarda profaz-metafaz geçişinde hormonal uyarımın  $G_i$  proteinlerine ihtiyaç duyduğu bilinmekteydi. Çalışmalarını bu yönde ilerleten Mehlmann ve arkadaşları  $G_i$  proteinin AC'yi inhibe etmesinden yola çıkarak bu proteinin fonksiyonunu incelemişlerdir. Farelerde yapılan testler sonucunda  $G_i$  proteinini inhibe eden pertussis toksini enjekte edilen oositlerde, baskılamının maturasyon üzerine etkisi olmadığını, dolayısıyla cAMP düzeylerinin azalarak maturasyonun başlamasında  $G_i$  proteinlerinin görev almadığını tespit etmişlerdir (15).

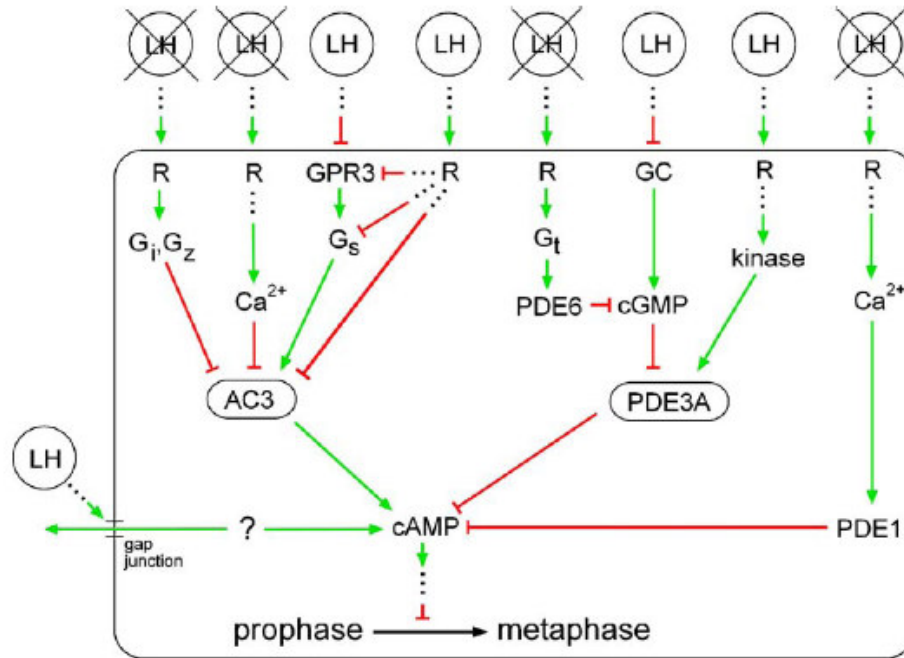
### 2.9.7. Kalsiyum

Kemirgen oositlerinde bulunan üç tip AC izoformu da kalsiyum iyonu ( $Ca^{2+}$ ) tarafından baskılanabilmektedir. Kalsiyumun LH uyarımının ardından AC'yi inhibe ederek maturasyonu başlatabileceği düşünülmüştür (5).

Webb ve arkadaşları, kümülüs hücrelerinde sağlanan hücre içi kalsiyum artışının oositte de  $Ca^{2+}$  iyonlarının artmasına yol açtığını ve bu etkinin aradaki oluklu bağlantılar işlevsel kaldığı sürece devam ettiğini göstermişlerdir (61). Koyunlarda COC'lara LH uygulandığında  $Ca^{2+}$  düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir. Fakat aynı etki EGF uygulanması sonucunda görülmemektedir. Hücre içi kalsiyumu arttıran ajanlardan Quin 2-AM'nin kendiliğinden gerçekleşen maturasyonu engellediği bildirilmiş ancak daha sonra bu ajanın toksik etkileri ortaya çıkarılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda yine kalsiyum miktarını arttırıcı ajanlardan BAPTA-AM'nin maturasyonu engellemediği gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalarda etken maddeler kültür medyumuna verilmiş ve ajanların  $Ca^{2+}$  arttırıcı etkileri hem kümülüs hem de oositlerde gerçekleşmiştir. Bu konuda da kendi

geliştirdikleri enjeksiyon tekniğini kullanan Mehlmann ve ekip arkadaşları, oosit içine EGTA enjekte ederek etkisini incelemiş ve sonuç olarak hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeylerinin oosit maturasyonu ile ilgili olmadığı sonucu elde edilmiştir (15).

Aşağıdaki resimde de gösterildiği gibi maturasyonu tetikleyebileceği düşünülen mekanizmaların bir kısmı çeşitli çalışmalarla olasılık dâhilinden kaldırılmış, bazı teoriler ise hala varlığını sürdürmüştür. Bu olasılıklara göre, henüz oositte fonksiyonu belirlenememiş reseptörler, kinazlar, Gs, Gt gibi farklı G proteinleri, gap junctionlar, guanilil siklaz, halkasal guanozin monofosfat ve PDE'ler gibi farklı enzim ve moleküller görev alıyor olabilir (5,15).



**Şekil 19:** Oosit maturasyonunu tetikleyebilecek mekanizmalar sırasıyla gösterilmiştir. 2007 yılına gelindiğinde hala geçerliliğini koruyan olası mekanizmalar LH simgesiyle, elenmiş olan olası mekanizmalar ise LH simgesinin üzerinde X ile gösterilmektedir. Yeşil oklar aktivasyonu, kırmızı oklar ise inhibisyonu temsil etmektedir. R=reseptör; GPR3=G protein reseptörü 3; AC3=adenilil siklaz 3; GC=guanilil siklaz; Gi, Gz, Gs, Gt=G proteininin izoformları; PDE1, PDE3A,PDE6=halkasal nükleotid fosfodiesteraz izoformları (15).

LH maturasyonu başlatırken cAMP sentezini bloklayacak ya da hidrolizini arttıracak mekanizmalardan birini kullanıyor olabilir. Bunu da yukarıda belirttiğimiz moleküllerden bir veya birkaçına etki ederek sağlayabilir.

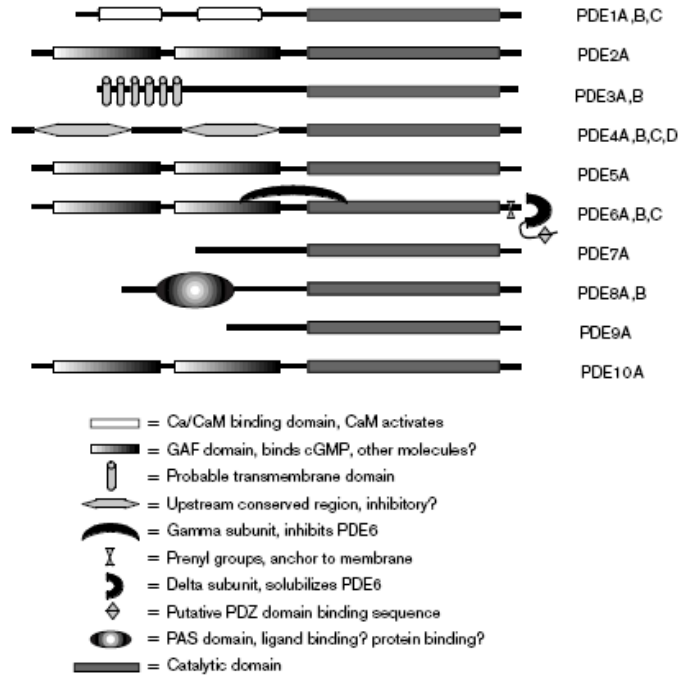
LH'ın fare oositlerinde  $G_s$  veya AC aktivitesinde bir azaltma meydana getirip getirmediği bilinmemektedir. Ancak LH, ters bir agonist kullanarak bu yolaktaki proteinleri inhibe ediyor olabilir.  $\beta$ -arrestin, GRK'lar ve RGS2 gibi proteinlerin bu yolu baskıladıkları bilinmektedir (15).

### 2.9.8. Fosfodiesterazlar

Maturasyonun gerçekleşmesiyle ilgili bir başka çekici hipotez de LH uyarımının oosit PDE'lerini aktive ederek cAMP hidrolizini arttırmasıdır (5).

Halkasal nükleotit fosfodiesterazlar (PDE'ler), halkasal nükleotidlerin (cAMP ve cGMP) indirgenmesinden sorumlu enzimlerdir (4). Karşılaştırmalı, yapısal ve fonksiyonel çalışmalar PDE'lerin modüler yapıda olduklarını ortaya koymuştur. Buna göre PDE'ler proksimalden karboksil uca doğru uzanan iyi korunmuş katalitik bir bölge ile regülatör bölgeden oluşmaktadır.

PDE süper ailesi 19 farklı gene sahip 10 aileyi kapsamaktadır ve muhtemelen bunlara daha da eklenecektir. Halkasal nükleotidler hücrelerde çok çeşitli fonksiyonları yerine getirmekle görevli olduklarından bunlarla ilişkili fosfodiesterazların da çok çeşitli olmaları beklenen bir sonuçtur. Her aile birbirinden enzimatik özellikleri, aktivatörleri ve inhibitörleri ile her aile içindeki genler de spesifik doku ve hücrelerde bulunuşu hücre hatta hücre içi yerleşimleriyle birbirlerinden ayrılmaktadır. Bu farklılıklar nedeniyle bir hücrenin birincil mesajcıya vereceği yanıtı belirlemede PDE'lerin etkisi büyüktür (75).



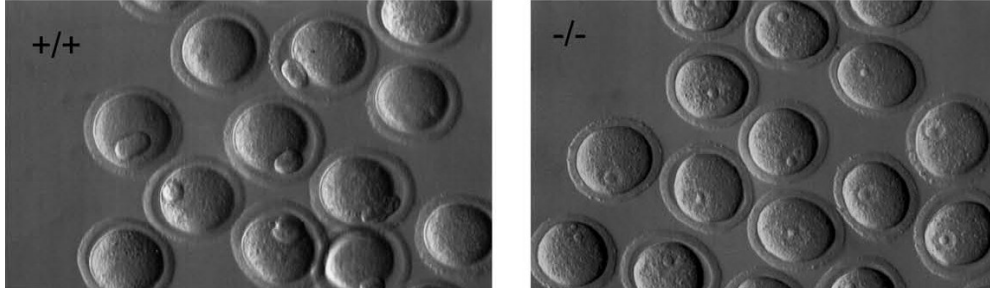
**Şekil 20:** Çeşitli PDE izoformlarının şematik yapıları. PDE3 formları, bir katalitik bölge ile dikey silindirlerle belirtilmiş transmembran bölge olduğu sanılan iki kısımdan oluşmaktadır (75).

PDE3 ailesi genetik olarak iki tipe sahiptir PDE3A ve PDE3B. PDE4 ailesi ise en az dört farklı genden sentezlenen, PDE4A, B, C, D formlarına sahiptir ve onların da çeşitli splice varyantları bulunmaktadır. Hypoxanthine (4,5), Cilostamide ve Milrinon spesifik PDE3, Rolipram ise spesifik PDE4 inhibitörüdür (55). IBMX ise PDE8 ve PDE9 dışında tüm PDE'leri nonspesifik olarak inhibe etmektedir (75). Oositlerin, spesifik PDE3 veya nonspesifik PDE inhibitörleri ile inkübasyonu mayozu geciktirmektedir (4,5).

**Tablo 3:** 3 farklı PDE formu için değişik inhibitörlerin mM cinsinden IC50 değerleri (7).

İnhibitör	PDE1 (Kalmodulin (CaM) ile düzenlenen)	PDE3 (cGMP ile baskılanan)	PDE4 (cAMP-spesifik)
IBMX	15	10	12
Cilostamide	>1000	0.1	40
Milrinone	>200	0.5	13
ORG 9935	>1000	0.1	10
Rolipram	>1000	>100	0.5

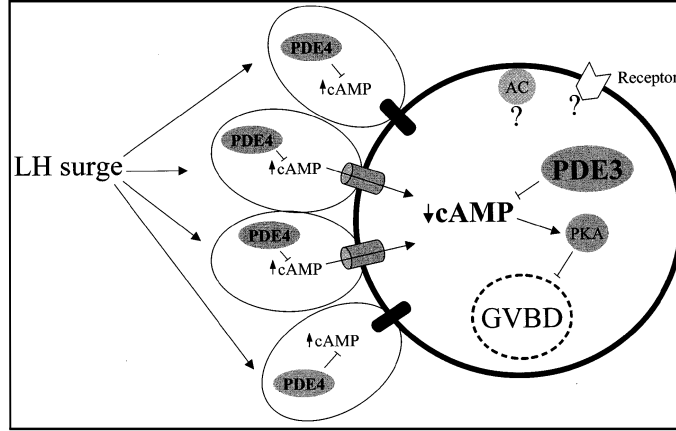
Farmakolojik ve *in situ* analizler PDE3'ün oositlerde bulunduğunu ancak çevredeki somatik hücrelerde bulunmadığını göstermiştir (76). Farelerde PDE3A'nın aktivitesinin, COC'larda LH reseptörlerinin uyarımından sonra arttığı gözlenmiş ancak bu durum izole oositlerde veya izole kümülüslerde denendiğinde aynı etki gözlenmemiştir (4). PDE3A homolog negatif (PDE3A<sup>-/-</sup>), fare oositlerinde yapılan çalışmalar bu oositlerin normal folikül gelişimi ve ovulasyona rağmen mayoz II'ye geçemeyip Profaz I 'de kaldığını, izole kültüre edilmiş oositlerin de kendiliğinden maturasyona gitmediğini göstermiştir (41). Bu çalışmalar PDE3 aktivitesinin maturasyon için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (4).



**Resim 16:** 20 saat kültürün ardından Pde3a<sup>+/+</sup> (solda) ve Pde3a<sup>-/-</sup> (sağda) oositler. Pde3a<sup>-/-</sup> oositler kümülüs hücrelerinden uzaklaştırılmalarına rağmen GVBD veya kutup cisimciği atılımı göstermemişlerdir (41).

Oosite komşu granüloza hücrelerindeki hakim PDE formu PDE4D'dir. PDE4D bulunmayan dişi sıçanlarda düşük fertilité gözlenirken aynı etki erkeklerde saptanmamıştır. Bu tip dişi farelerden elde edilen oositlerin %50'den fazlasında degradasyon ve fregmentasyon açıkça gözlenmiştir. Yine bu tip farelere gözlenen ilginç bir durum da FSH uygulamasının ardından, kümülüs hücrelerinde, normal adenilil siklaz uyarımına rağmen cAMP artışı meydana gelmemiştir. Düşük PDE oranı göz önüne alındığında bu durum beklenenin tam tersidir (75).





**Şekil 21:** Oosit ve çevreleyen kümülüs hücrelerinde cAMP düzenlenmesinin şematik gösterimi. LH dalgasının ardından granüloza hücrelerinde cAMP düzeyleri artarken oositte düşmektedir. Hücreler arasındaki oluklu bağlantılardan olası cAMP geçişi ve cAMP düzeyini etkileyebilecek faktörlerden AC, PDE'ler ve bir reseptör gösterilmiştir. Şekil GPCR'lerin oositteki fonksiyonları henüz keşfedilmemiş olduğu 1998 yılına ait olduğundan cAMP'nin oosite oluklu bağlantılar aracılığıyla geçtiği üzerinde durulmuştur (7).

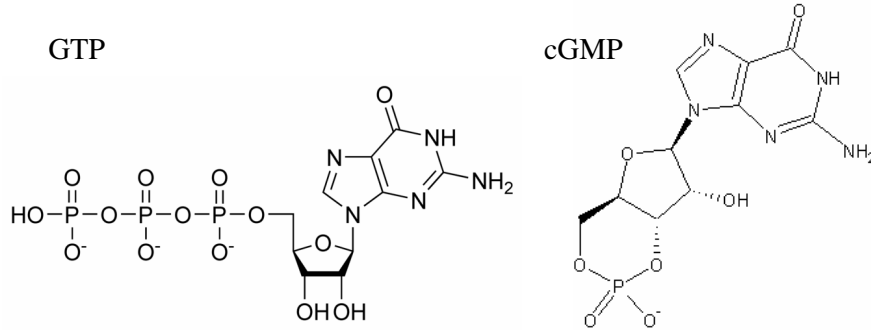
### 2.9.9. cGMP

PDE3 ailesi cAMP için yüksek afinite gösterir. Fakat yine PDE3 için cAMP gibi bir substrat olan cGMP, PDE'ye sıkı bir şekilde bağlanıp yavaş hidroliz olduğundan, mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) konsantrasyonlarda bile PDE3 için inhibitör fonksiyonu göstermektedir. cAMP spesifik PDE olarak da bilinen PDE'ler ise cGMP tarafından baskılanmazlar (13-19,55).

PDE3'ün cGMP ile inhibisyonunun cAMP düzeyini ve PKA aktivitesini arttırdığı bilinmektedir (14,16,18,20). cGMP'nin PDE aktivitesini baskıladığı 1984 yılında, fare oositlerinde gösterilmiştir (5). Sıçan oositlerinde, izole edilmelerinin ardından PDE aktivitesinde bir düşüş meydana geldiği ve buna cGMP seviyelerinde düşüşün de eşlik ettiği 2001 yılında Richard ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır (4).

cGMP, hücre içindeki işlevleri cAMP kadar anlaşılammış olsa da önemli bir ikinci mesajcı olarak kabul edilmektedir. cAMP'nin, ATP'den adenilil siklaz aracılığıyla üretilmesine oldukça benzer şekilde cGMP, GTP'den guanilil siklaz tarafından üretilmekte ve yine fosfodiesterazlar tarafından GMP'ye

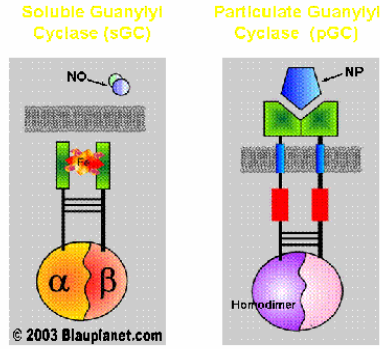
dönüştürülmektedir. Guanilil siklazın uyarımı, hücre içi cGMP miktarını arttırarak biyolojik yanıtı başlatır. cAMP'nin protein kinaz A üzerinden fonksiyon görmesi gibi, cGMP de çoğunlukla cGMP bağımlı protein kinaz (PKG) aracılığıyla fonksiyon görür. Bunun dışında cGMP'nin iyon kanallarını ve PDE'lerin aktivitesini düzenleme fonksiyonları da bulunmaktadır. cGMP'nin fonksiyonlarına örnek olarak GC uyarımından sonra meydana gelen kan damarlarında genişleme verilebilir. Ayrıca, gözde, rhodopsin adlı bir GPCR'nin ışıqla uyarılarak G<sub>t</sub>'yi aktive etmesi ve G proteininin de cGMP fosfodiesterazını uyararak hücre içi cGMP düzeylerinin azaltması, cGMP'nin iyi bilinen fonksiyonlarından biridir (37).



Şekil 22: GTP (solda) ve cGMP'nin (sağda) kimyasal yapıları (77).

### 2.9.10. Guanilil Siklaz

GC, sitoplazmada serbest olarak bulunabilir. Bu tip GC'ye çözünebilir (soluble) guanilil siklaz (sGC) adı verilmektedir. GC, bazen de hücre yüzeyinde bir reseptöre bağlı, olarak bulunabilir. Bu tipe de particulate GC (pGC) denmektedir. Enzim bağımlı reseptörler grubundaki bu proteinin tek bir  $\alpha$  heliksten oluşan transmembran kısmı hücre dışı reseptör görevi görürken hücre içi kısmındaki GC katalitik görev üstlenir. Reseptöre ligand bağlanmasıyla GC uyarılarak cGMP sentezini başlatır (37,77,78).



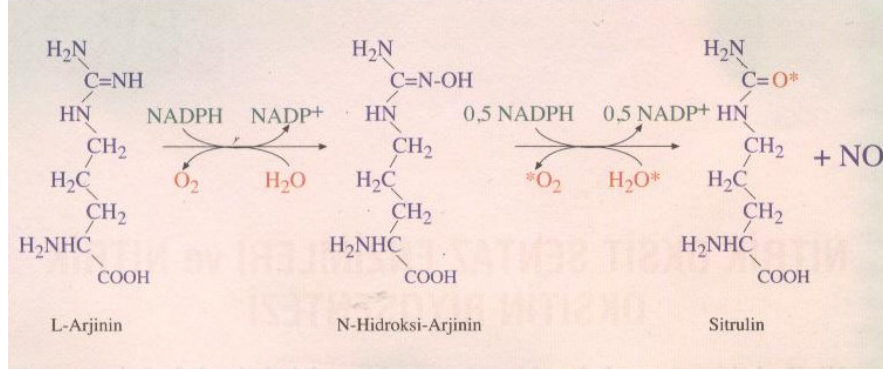
**Şekil 23:** Guanilil siklazların şematik yapısı. Solda çözünebilir (sGC) sağda membran bağlı (pGC) formu görülüyor. Enzimleri aktive edici ajan olarak sGC için nitrik oksit (NO) pGC için ise bir nöropeptid (NP) örnek verilmiş (78).

### 2.9.11. Nitrik Oksit

GC'nin iyi bilinen aktivatörlerinden biri de nitrik oksittir (NO) (19,20,22). NO, GC'nin aktif bölgesindeki *heme* grubuna bağlanarak ikincil mesajcı molekül cGMP'nin sentezini başlatır. Hücre zarından kolaylıkla geçebilen NO, zarda reseptörlerle birleşik halde de bulunan GC yerine sitoplazmada serbest bulunan formu tercih etmektedir (37).

Bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO) yüksek derecede difüze olabilen, lipofilik bir gaz olup hücrede çok çeşitli fonksiyonları gerçekleştiren, sinir sistemi, immün sistem ve dolaşım sisteminde en önemli parakrin fonksiyona sahip sinyal molekülüdür (21,37). NO, memeliler, kuşlar, balıklar omurgasızlar hatta bitkiler ve bakterilerde bile sentezlenmekte ve biyolojik etkileri için kullanılmaktadır. NO, steroid hormonlar gibi, plazma zarından direkt olarak geçebilir. NO'nun moleküler çalışma prensibi, steroid hormonlardan farklı olarak, transkripsiyonu aktive eden bir reseptöre bağlanmaktan çok hücre içi hedef enzimlerin aktivitesini değiştirmektir.

NO, arjinin aminoasidinden sentezlenir. Sentezden hemen sonra hücreden dışarı difüze olan NO, yakındaki hücreleri lokal olarak etkileyebilir. NO, stabil olmayan yapısından dolayı ancak birkaç saniye olan yarı ömrü nedeniyle kısa etki süresine sahiptir (37).



**Resim 17:** L-arjininin L-sitrüline dönüşümü sırasında nitrik oksit oluşması (79).

Nitrik oksidin, cGMP aracılığıyla PDE3'ü baskılayarak, hücre içi cAMP miktarını yükselttiği, kalsiyum metabolizasyonunu arttırdığı ve bunlara bağlı olarak kalp atışını hızlandırdığı kalp kası hücrelerinde çalışmıştır (80,81).

### 2.9.12. Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından sentezlenmektedir. NOS enzimleri temel olarak, yapısal (constitutive) NOS (cNOS) ve indüklenebilir (inducible) NOS (iNOS, NOS II) olarak iki gruba ayrılır. Yapısal NOS denmesinin nedeni bu tip NOS enzimlerinin hücrede normalde bulunuyor olması ve uyarana yanıt vermesi için yeni bir protein sentezine ihtiyaç duymamasıdır. cNOS da kendi içinde endotelial NOS (eNOS NOS III) ve nöronal NOS (nNOS, NOS I) olarak ikiye ayrılır. nNOS sinir sisteminde mesajcı fonksiyon görürken eNOS daha çok damar endotelinde gevşeme faktörü olarak fonksiyon göstermektedir. cNOS formları Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin bağımlıdır. Alt birimlerinden biri kalmodulin (CaM) olmasına rağmen, iNOS, cNOS formlarından farklı olarak aktivitesi için kalsiyuma ihtiyaç duymaz. Normal hücre içi Ca<sup>2+</sup> derişimi iNOS aktivitesi için yeterlidir. Enzimlerin dokulardaki dağılımı normal ve patolojik durumlarda

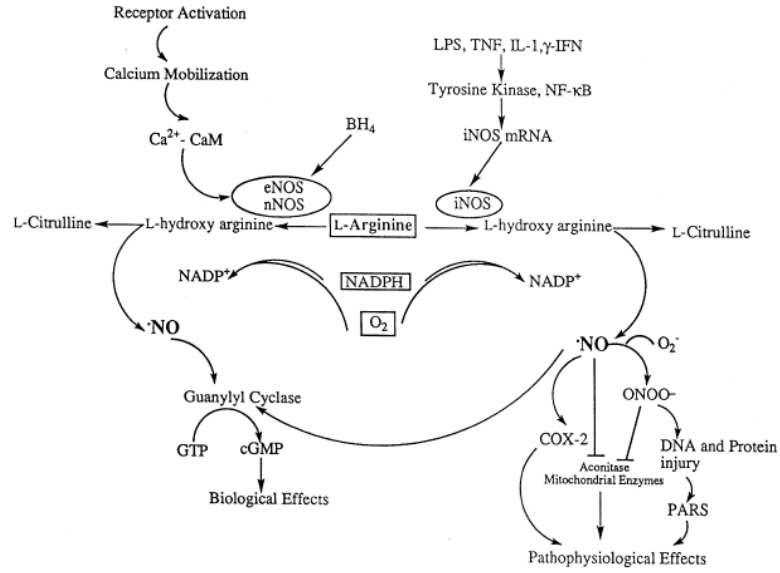
değişebilmektedir. Her üç NOS tipi de L-arjinin analogları tarafından inhibe edilebilmektedir (79).

NOS enzimleri birbirinin aynı iki alt birimden oluşur ve ancak alt birimler bir araya gelip dimer oluşturduklarında katalitik etki gösterirler. Aktivite göstermeleri tamamen koenzime bağlıdır. Aktiviteleri ayrıca CaM, Ca<sup>2+</sup>/CaM, yağ asitleri ve fosforilasyon-defosforilasyon ile de kontrol edilebilmektedir (79).

**Tablo 4:** Üç NOS izoformunun karşılaştırması (79).

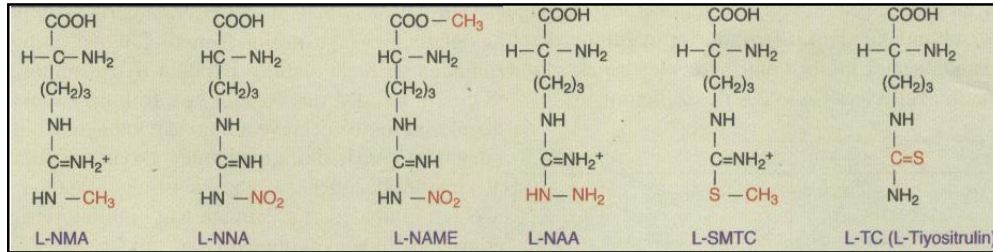
iNOS	eNOS	nNOS
Tip II NOS	Tip III NOS	Tip I NOS
İndüklenebilir	Yapısal	Yapısal
Ca <sup>2+</sup> /CaM bağımsız	Ca <sup>2+</sup> /CaM bağımlı	Ca <sup>2+</sup> /CaM bağımlı
Aktivitesi yüksektir	Aktivitesi düşüktür	Aktivitesi düşüktür
Aktiviteleri glukokortikoidler tarafından engellenebilir	Aktiviteleri glukokortikoidler tarafından engellenmez	Aktiviteleri glukokortikoidler tarafından engellenmez
Aktivitesi transkripsiyonla belirlenir	Hücrelerde normal şartlarda da bulunmaktadır	Hücrelerde normal şartlarda da bulunmaktadır
Genellikle sitoplazmada bulunur	Hücre zarında bulunur	Genellikle sitoplazmada bulunur
Makrofajlar, nötrofiller, fibroblastlar, mast hücreleri, hepatositler gibi pek çok hücre tipinde sentezlenebilir	Mast hücrelerinde, plateletlerde, pankreasın β-hücrelerinde, damar düz kas hücreleri ve endotelinde bulunurlar	Sinir sistemi, adrenal bez, nonadrenerjik-nonkolinerjik nöronlar ve astrositlerde bulunurlar
LPS, IFN-γ, TNF-α, TNF-β, IL-1, IL-2, lipoteikoik asit ve pikolinik asit tarafından aktive edilebilir	Serotonin ve trombin tarafından aktive edilebilir	Ca <sup>2+</sup> iyonları, Asetil kolin, bradikinin, histamin, lökotrinler ve PAF tarafından aktive edilebilir
7. kromozomdan transkribe edilir	12. kromozomdan transkribe edilir	17. kromozomdan transkribe edilir

NOS enzimlerinin N-terminal bölgesi sitokrom P450 oksidaza benzerdir. Bu bölge hem-grubu ve arjinin bağlanma bölgesi içerir. Bu bölge ayrıca alt birimler arası etkileşimi de sağladığından dimerizasyondan da sorumludur. Karboksil ucu ise P450 redüktaza benzerdir. Bu bölgede ise NADPH, FAD ve FMN koenzimleri için bağlanma bölgeleri bulunur. CaM ise NOS enzimlerine redüktaz ve oksidaz bölgelerinin arasından bağlanır. CaM bağlanması iki bölgenin uygun şekli olarak aktif hale gelmelerini sağlar. Bu bağlanmada, eNOS ve nNOS için Ca<sup>2+</sup> gerekirken, iNOS'ta Ca<sup>2+</sup>'a ihtiyaç duyulmadan gerçekleşmektedir (79).



Şekil 24: NOS enzimlerinin aktivasyonunun ve üretilen NO'nun etkilerinin şematik gösterimi (82)

Her üç NOS tipi de L-arjinin analogları tarafından inhibe edilebilmektedir. Arjinin aminoasidinin guanido grubuna küçük kimyasal gruplarını eklenmesiyle hazırlanan analoglar, en geniş NOS inhibitör grubunu oluştururlar. Bunların dışında daha büyük alkil grupları içeren analoglar da bulunmaktadır. Bu inhibitörlerden bazıları spesifik bir NOS tipini inhibe ederken bazıları her üç tipi de inhibe etmektedirler (79).

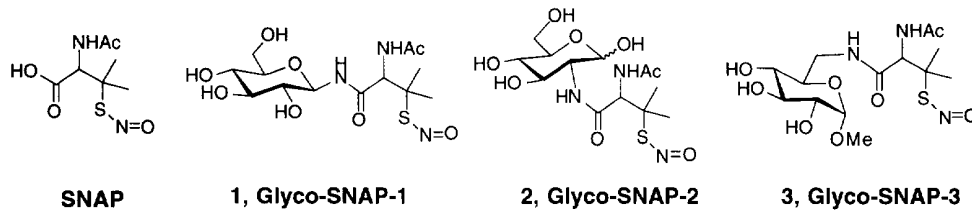


Resim 18: NOS inhibitörleri olarak tanımlanan bazı arjinin analogları L-NMA: L-N-Metil-arjinin L-NNA: L-N-Nitro-arjinin, L-NAME: L-N-Nitro-arjinin-metil ester, L-NAA: N-Amino-arjinin, L-SMTC: S-Metil-L-tiyositrülin (79).

NOS inhibitörleri arasında en çok çalışılan L-NMA'dır. Yüksek sıcaklıklara, asidik ve bazik pH'a dayanıklı olan bu enzim suda yüksek derecede çözünür olup toksisitesi de azdır. Protein sentezine de etkisi olmadığından kullanımı güvenlidir. L-NNA ile L-NAME de L-NMA gibi arjininle rekabete girerek NOS'u inhibe eder. L-NAME'nin NOS'a karşı afinitesi L-NNA'dan daha fazladır. L-NMA'nın alkil homologlarından Nomega-inometil-L-ornitin (L-NIO) ise spesifik olarak iNOS'u inhibe etmektedir (79).

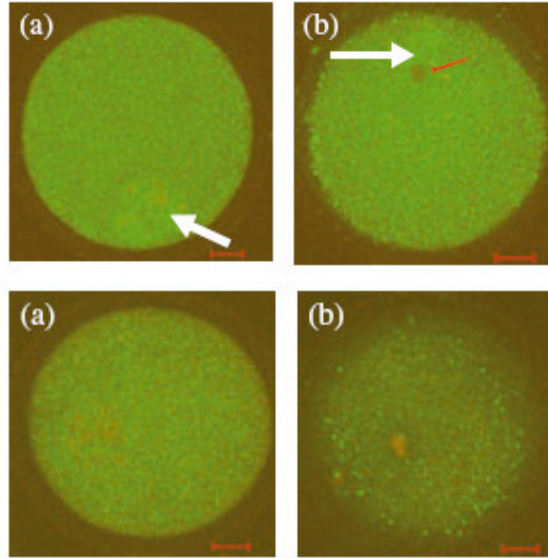
Belli fizyolojik şartlar altında, belli bir süre boyunca NO salan kimyasal ajanlar uzun süredir klinik kardiyovasküler rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bileşikler, vücutta, pek çok farklı mekanizma ile yapılarını değiştirirken NO açığa çıkmasını sağladıklarından dolayı, **NO donörü** olarak adlandırılmaktadırlar (82,83).

*Sodyum nitroprusside* (SNP, *sodium pentacyanonitrosyl ferrate(II)*), bu ajanlar arasında en çok kullanılanıdır. SNP, hipertansiyondan kaynaklanan acil durumlarda kan basıncını düşürmek amacıyla kullanılmaktadır. NO donörlerinden S-nitrosothiol grubu olanların, pek çok çalışmada NO ile aynı etkileri gösterdiği belirlenmiştir. Genelde kısa ömürlü ve dayanıksız olan bu bileşiklerin, saflaştırılıp toz haline getirilmiş bir tanesi de S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) adıyla bilinmektedir (82). SNAP, diğer nitroso bileşikleri ile karşılaştırıldığında daha dayanıklıdır. 1996'da Ramirez tarafından geliştirilen Glyco-SNAP formları ise 28,5–30 saat yarı ömrü ile SNAP'a göre çok daha dayanıklıdır (82,84,85).



**Şekil 25:** SNAP (S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine) ve Glyco-SNAP türlerinin kimyasal yapısı (82,85)

NO sentezinden sorumlu olan üç enzimden ikisinin (eNOS ve iNOS) ovaryumlarda sentezlendiği immünohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir. Her iki NOS formunun da oosit olgunlaşmasında rol aldığı düşünülmektedir (20-22). Yapılan araştırmalara göre, eNOS sentezi daha çok teka hücre tabakasında, iNOS sentezi ise daha çok granülozalarda meydana gelmektedir (23). Sığırlarda, mRNA ile yapılan analizlerde de her iki enzimin de hem matür hem immatür oositlerde sentezlendiği gösterilmiş, yalnızca immatür oositlerde olmak kaydıyla, nNOS'un da sentezlendiği ortaya konulmuştur (86).



**Resim 19:** eNOS (üstte) ve iNOS (altta) enzimlerinin oositlerdeki yerleşimi immünflorasan yöntemi ile görüntülenmiş. Okların ucundaki kırmızı bölgeler enzimlerin bulunduğu bölgeleri işaret ediyor. İmmatür oositler (a) ile, matür oositler (b) ile gösterilmiş. Kırmızı çizgi 20µm'yi temsil ediyor (86).

Nitrik oksidin oosit maturasyonundaki rolünün araştırılması ilk olarak 1998 yılında Jablonka-Shariff ve Olson tarafından ortaya konmuştur. eNOS geni silinmiş (eNOS knock out) farelerle yaptıkları çalışmada bu tip farelerde metafaz II'ye geçen oosit sayısının, normal farelerdekilere kıyasla daha az olduğunu ve oositlerin çoğunun metafaz I'de kaldığını görmüşlerdir. Ayrıca pek çok oosit de şekil bozukluğu göstermiş ve hücre ölümüne gittiklerinin sinyallerini vermiştir



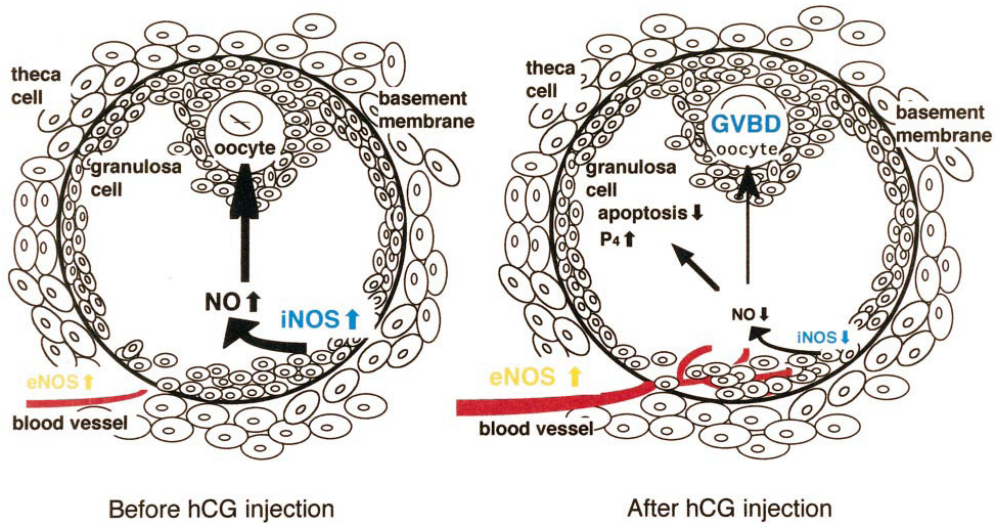
(22). Benzer sonuçlar aynı ekip tarafından bu kez sıçanlarda NOS inhibitörleri L-NAME ve L-NIL kullanılmasıyla da ortaya konulmuştur (87).

2000 yılında yine Jablonka-Shariff ve Olson, hem eNOS knock-out hem de normal genotipli farelerden elde edilen COC'ları, normal ve L-NAME'li medyumla kültüre etmiştir. Hem knock-out farelerden izole edilen hem de normal genotipli farelerden izole edilip L-NAME ile kültüre edilen oositlerin ancak bir kısmı MII aşamasına geçebilmiş, çoğunluğu MI'de kalmıştır. Yine bu oositlerin çoğu anormal morfoloji göstermiş ve uzun süre canlı kalamamışlardır. Ekip elde ettikleri sonuçlar ışığında; eNOS enziminin bulunmaması veya baskılanması sonucu NO üretiminin gerçekleşmemesi durumunda oositlerin mayozu normal şekilde tamamlamalarında problemler ortaya çıktığını ve NO'nun optimal mayotik maturasyon için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (88).

2002 yılında Nakamura ve arkadaşları, FSH analogu, *gebe kısırak serum gonadotropini (Pregnant Mare Serum Gonadotropine=PMSG)* (sinonimi *eCG=equine Chorionic Gonadotropine*) ile folikül uyarımı yapılmış sıçanların ovaryumlarını çıkartarak her birini birkaç parçaya ayırıp değişik şartlar altında kültüre etmişlerdir. Kültür ortamına NO donörü olarak SNAP, ve iNOS inhibitörü *aminoguanidine (AG)* ile maturasyonu tetiklediği bilinen, LH analogu, hCG (*human Chorionic Gonadotropine*) eklemişlerdir. Elde edilen sonuçlarda oositler hCG veya AG ile kültüre edildiklerinde maturasyonlarını tamamladıkları gözlenmiş, ortama SNAP ilave edildiğinde ise bu tetikleyici etkinin ortadan kalktığı gözlenmiştir. 5 saatlik inkübasyonun ardından folikül içi cGMP seviyeleri ölçülmüş, AG verilen grupta kontrollerle karşılaştırıldığında daha düşük cGMP seviyelerine rastlanmıştır. SNAP verilen foliküllerdeki cGMP seviyeleri ise tamamen kontroldeki seviyelerine dönmüştür.

Ekip aynı prosedürü kullanarak süperovule hale getirilen sıçanlardan ayrıca izole oosit de çıkartarak SNAP ve hCG'nin etkilerini incelemiş, SNAP verilen grupta doz arttıkça GVBD için gereken sürenin arttığını saptamışlardır. SNAP, hCG ile birlikte verildiğinde ise bu etkinin ortadan kalktığını görmüşlerdir. Nakamura ve arkadaşları sonuç olarak NO donörleri verilmesiyle artan cGMP oranlarını da göstererek, maturasyonda iNOS-NO-cGMP yolunun önemli bir görevi olduğunu ortaya koymuştur.

Bulgularını Jablonka-Shariff ve arkadaşlarının çalışmaları ile karşılaştıran ekip, NOS enzimlerinin yerleşimlerini de göz önüne alarak eNOS bulunmaması durumunda teka tabakasındaki kanlanmanın az olmasından dolayı oositlerin gelişiminin ve maturasyonlarının engelleniyor olabileceğini belirtmişlerdir. Nitekim Nakamura ve arkadaşları, önceki çalışmalarında, hCG enjeksiyonundan sonra eNOS enziminin aktivitesinde belirgin bir değişiklik olmazken iNOS aktivitesinde önemli bir düşüş meydana geldiğini göstermişlerdir (23).



**Şekil 26:** Nakamura ve arkadaşlarının bulgularına göre hCG enjeksiyonundan önce (solda) ve sonra (sağda), folikül içi NOS enzimlerinin miktarında meydana gelen değişimler. Küçük puntuyla yazılan isimler düşük enzim aktivitesini/madde miktarını, büyük punto ile yazılanlar ise tersi durumu göstermektedir. Araştırmacılara göre hCG uyarımı ile eNOS aktivitesi bir miktar artarak foliküle giren kan miktarını arttırmakta, iNOS aktivitesi ise önemli miktarda azalarak oosit maturasyonunu tetiklemektedir (23).

2004 yılında, Çin’de, Bu ve arkadaşları, fare COC’larını 1mM konsantrasyonda SNP ile kültüre etmiş ve ilk 5 saatte GVBD’nin geciktiğini 24 saat sonunda da I. Kutup cisimciğinin atılmadığını gözlemlemiştir. Fakat oositler, 10µM SNP ile kültüre edildiklerinde, PDE’ler hipoksantin (HX) ile inhibe ediliyor olsa bile maturasyonun gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Yine HX varlığında, oositler GC inhibitörleri ile kültüre edildiklerinde, yüksek doz SNP’nin maturasyonu tetikleyici etkisinin ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. Ekip, araştırmalarında, hücre zarından geçebilen cGMP analogu 8-Br-cGMP, PDE

inhibitörü *HX* ve AC aktivatörü *forskolin* gibi kimyasallarla tek tek kültüre ettikleri oositlerin de yüksek doz SNP verdikleri duruma benzer şekilde GVBD'nin geciktiğini göstermişlerdir. İlginç olarak araştırmacılar kümülüs hücrelerinde bulunan PDE izoformu PDE4 inhibitörü *rolipram* ile kültür yaptıklarında oositlerin yine maturasyonu tamamlayamadıklarını görmüşlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak SNP'nin maturasyonu tetikleyen ve engelleyen iki farklı yoldan fonksiyon gördüğünü öne sürmüşlerdir. Araştırmada bir önemli nokta maturasyonun kontrollerinin yalnızca 3,5 ve 24. saatlerde yapılmasıdır. Ancak araştırmada yapılan analizler, GVBD'nin ne kadar süreyle geciktiğini ortaya koymamıştır. Aynı şekilde, 24 saatin sonunda yapılan gözlemlerde, tüm gruplarda GVBD'nin tamamlandığı ancak birinci kutup cisimciğini hepsinde atılmadığı görülmüş fakat yine tam süreler belirtilmemiştir (89).

2006 yılında Viana ve arkadaşları aynı dozlarda SNP kullanarak 24 ve 48. saatlerde elde ettiği sonuçlarla, Bu ve arkadaşlarınca öne sürülen, SNP'nin iki yönlü etkisi olduğu yönündeki bulguları desteklemiştir (45).

Yukarıda sıralanan çalışmalardan da anlaşılacağı gibi 2007'ye gelindiğinde oosit maturasyonunu tetikleyen mekanizmalar halen baştan sona aydınlatılmış değildir. Bu konuda yapılan çeşitli araştırmalarla elde edilen parçalar şeklindeki bilgiler de henüz tam olarak bir araya getirilmemiştir.

Maturasyonun tetiklenmesinde etkili olduğu düşünülen en büyük adaylardan  $G_i$  proteinlerinin de elenmesi ve NO ile NOS'un maturasyonda çeşitli etkilerinin olduğu belirlenmesi nitrik oksidi maturasyonda önemli bir ajan haline getirmiştir.

Çalışmamızda L-NAME ile COC'larda nitrik oksit sentezini inhibe ederek maturasyonun tetiklenip tetiklenmeyeceğini araştırmayı amaçladık. Hipoksantin deneylerde maturasyonu engelleyici olarak kullanılarak hem deney öncesi oosit toplama işlemlerinde maturasyonun başlamasını engelleyecek hem de kullanacağımız kimyasalların etkilerini karşılaştırmada kolaylık sağlayacaktır. Ayrıca oositlerin kültürü süresince yapılacak ayrıntılı gözlemler, maturasyonun ne zaman başlayıp ne zaman bittiğini belirlemede oldukça yararlı olacaktır.

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Deney Hayvanları**

Deneylerde SDÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından elde edilen 21–28 günlük, 5 adet Swiss cinsi dişi albino fareler kullanılmıştır. Fareler 14 saat aydınlık/10 saat karanlık periyodunda, oda ısısında, yiyecek ve suya sınırsız erişim şartlarında üretilmiştir.

##### **3.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzeme**

Deneyde folikül gelişimini uyarmak için PMSG (Sigma) kullanılmıştır. Piyasada maturasyon süresini kısaltan sentetik besiyerleri (medyum-vasat) mevcut olmasına rağmen daha önceki çalışmalarımızda daha verimli bulduğumuz MEM- $\alpha$  (Minimum Essential Medium-alpha) (Biological Industries) medyumunu tercih ettik. Besiyeri eklentileri olarak da antibiyotik solüsyon (Penisilin-Streptomisin) ve fetal bovine serum (FBS) (Biological Industries) kullanılmıştır. Medyumun üzerini örterek oositleri korumak için de mineral yağı (Sigma) kullanılmıştır. Hipoxanthine (6-Hydroxypurine) ve L-NAME (Fluka) ile kültürde kullanılan kimyasallar üreticinin belirttiği saklama koşullarına göre oda ısısında, +4°C veya -20°C’de saklanmıştır. Deneylerde sarf malzeme olarak, pipet uçları (Corning), 6 ve 35 mm’lik petri kapları, 24 ve 96 kuyucuklu petripler (TPP) kullanılmıştır. Oositleri toplamak için 50  $\mu$ l’lik mikropipetler (Drummond) ve IVF mikropipetleri (Humagen) kullanılmıştır.

### 3.1.3. Cihazlar

Deneilerin gerçekleştirildiği laboratuvar ortamı, her gün çalışma öncesinde 30 dk süresince ultraviyole ışık ile steril edildi. Deneilerde, ovaryumdan oositlerin elde edilmesinde Olympus marka stereo mikroskop, kültürdeki oositlerin gözlenmesi için yine Olympus marka inverted mikroskop, kültür işlemlerinde ise Heal Force marka CO<sub>2</sub>'li inkübatör kullanılmıştır. İnkübatör ortamı, deneyler süresince 37°C, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 nem olacak şekilde tutulmuştur. Steril ortam gerektiren işlemlerde Class II laminar air flow kullanılmıştır. Stereo mikroskop da yine laminar air flow içine monte edilerek kullanılmıştır. Kültürdeki oositlerin resimleri, inverted mikroskoba eklenen Olymos marka Camedia C-4000 dijital fotoğraf makinesi ile çekilmiştir.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Deney Planı

Deneilerde kullanılacak rutin oosit kültür medyumu ikisi deney biri kontrol olarak üçe bölünmüştür. Kontrol grubundaki medyuma ekstra bir kimyasal eklenmemiştir. Diğer iki medyumdan birine, 1 mM konsantrasyon oluşturacak nonselektif NOS inhibitörü L-NAME (67,90) değerine de PDE3'ü inhibe ederek maturasyonu engelleyen 4 mM olacak şekilde hipoksantin (21,88) eklenmiştir. Üçüncü bir deney grubu olarak da L-NAME ve hipoksantin içeren medyumlar birebir oranda karıştırılarak elde edilen medyum kullanılmıştır. Toplamda üç deney ve bir kontrol medyumu hazırlanmıştır.

### 3.2.1. Kültür Medyumlarının Hazırlanması

Deneyleerde kullanılacak medyumlar ve diğer çözeltiler Laminar air flow altında hazırlandı ve küçük kaplara bölündü. Kontrol medyumunu (KO) hazırlanırken her 100 ml için 89 ml MEM- $\alpha$  üzerine 10 ml FBS ile 1 ml antibiyotik/antimikotik solüsyon veya penisilin/streptomisin solüsyonu eklendi. İnkübatör dışında gerçekleştirilen izolasyon ve yıkama çalışmalarında kullanılan medyum, pH dengesini sabit tutmak için medyum 10 mM HEPES ile tamponlandı. Medyumlar, kullanımdan bir saat veya bir gece öncesinden 37°C sıcaklığa ulaşması için inkübatöre konuldu. HEPES’li medyumlar ise ancak kapağı sıkıca kapatılmış flasklar ile hava teması kesilerek inkübatöre kaldırıldı. Oosit içeren petripler inkübatöre kaldırılırken, HEPES içermeyen medyum kullanıldı.

Oositlerin birkaç saat sürebilen izolasyon işlemleri sırasında kendiliğinden maturasyona gitmemesi ve deneylerin eş zamanlı başlaması için izolasyon medyumuna 4mM HX eklendi (15,67). L-NAME ve HX içeren deney medyumları HEPES kullanılmadan hazırlandı.

Kimyasallar medyumlarda çözüldükten sonra 0,2  $\mu$ m’lik şırınga filtrelerinden geçirilerek steril edildi ve stok medyum olarak, üreticinin tarifine göre -20 veya +4 °C’ye kaldırıldı. Deneyleerden bir süre önce, stoklardan kullanılacak kadarı alınıp istenen ısıya getirildi.

Deneyleer sırasında kullanılan medyumlar ve içerikleri aşağıda sıralanmıştır.

- **Kontrol medyumunu (KONT):** 89 ml MEM- $\alpha$  + 10 ml FBS + 1 ml antibiyotik solüsyonu
- **Deney Medyumları:**
  - **HX medyum (HX):** KONT + 4 mM Hipoksantin
  - **L-NAME Medyumunu (LN):** KONT + 1mM LN
  - **L-NAME + Hipoksantin (LN+HX):** Daha önce hazırlanan LN ve HX medyumları 1:1 oranında karıştırıldı.
- **İzolasyon medyumunu (İZO):** KONT + 10mM HEPES + 4 mM HX

Deneyde kullanılan kimyasallar, Mol Sayısı = Ağırlık / Molekül Ağırlığı formülüne göre uygun gramajlarda tartılarak istenen molariteler elde edilmiştir. Kimyasalların molekül ağırlıkları ve istenen molariteler için kullanılan miktarlar aşağıda belirtilmiştir.

**Tablo 5:** İstenen molaritelerde kimyasallar elde etmek için kullanılacak miktarlar.

Kimyasal	İstenen Miktar	Molekül Ağırlığı	Kullanılan Miktar	Çözülen Medyum Miktarı
Hipoksantin	4 mM	136,11	55 mg	100 ml
L-NAME	1mM	269,69	27 mg	100 ml
HEPES	10mM	238,3	238,3 mg	100 ml*

\* İzolasyonda kullanılacak her 100 ml medyum için 238,3 mg HEPES, 4mM Hipoksantin içeren medyumda çözüdü.

### 3.2.3. Süperovulasyon ve Ovaryumun Çıkarılması

Deneylerde kullanılacak fareler, ovulasyona hazır folikül sayısını arttırmak (süperovulasyon) amacıyla FSH analogu verilerek foliküler uyarıma tabi tutuldular. Bu amaçla farelere her fare için 5 IU PMSG (eCG), toplam hacim 0,1 ml olacak şekilde serum fizyolojik (SF) ile seyreltilerek intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Hayvanlar enjeksiyondan 40–48 saat sonra servikal dislokasyonla öldürüldü. Karın bölgesi antiseptik solüsyon ile silinen hayvanların karın derisi ve periton steril bir neşter ile kesilerek açıldı. Bağırsak dokusu bir pens ile kenara alınarak uterus ve ovaryum ortaya çıkarıldı. Uterus takip edilerek ulaşılan ovaryumlar, tuba uterinanın bulunduğu kısımdan kesilerek 37°C’de SF içeren bir petriye alındı. Başka bir steril neşter ile ovaryumlar çevresindeki yağ dokular uzaklaştırılarak kan ve diğer dokulardan arındırıldıktan sonra, yine SF içeren, steril ikinci bir petriye aktarıldı. Bu petri bekletilmeden kültür laboratuvarına taşınarak oosit izolasyon işlemine alındı (15).

### 3.2.4. Oositlerin Elde Edilmesi

Kültür laboratuvarına getirilen ovaryum steril SF içeren üçüncü bir petride yıkandıktan sonra Laminar air flow altında HEPES içeren izolasyon medyumuna alındı (Resim 20). İzolasyon işlemleri laminar kabini içinde bulunan alttan aydınlatmalı stereo mikroskop yardımıyla gerçekleştirildi.

Ovaryumlardaki çapları yaklaşık 300 µm ve üzerinde olan, şeffaf görünümlü foliküller belirlendi. Bu foliküller 26 Gauge'luk steril iki enjektör (insülin enjektörü) yardımıyla patlatılarak folikül içeriğinin medyuma akması sağlandı. Bu şekilde elde edilen kümülüs kompleksleri (COC'lar) ve kümülüs hücresi bulunmayan izole oositler (Resim 21), ağız kontrollü toplama pipeti aracılığıyla ovaryumun bulunduğu petriden alınarak, başka bir petrideki izolasyon medyumuna aktarıldı. Her ovaryum için toplama işlemi 30–40 dk kadar sürdü ve over başına 20–40 arası oosit/COC elde edildi. İkinci kaptaki toplanan COC'lar içinden iyi görünümlü, sıkı korona ve kümülüs tabakalarına sahip olanlar seçilerek öncelikle kontrol medyumunda birkaç kez yıkanıp ardından deney ve kontrol medyumlarını içeren petrilere, rastgele olarak dağıtılmıştır.

Normalde, FSH uyarımının ardından 48. saatte, LH analogları kullanılarak uygulanması gereken ovulasyon indüksiyonu uygulanmadığı ve ovaryumlar FSH uygulamasının ardından 40–48 saat içinde çıkarıldıkları için oositlerin hepsinin immatür, PI oositler olması beklenmektedir (1). Bu durum izolasyon sırasında pipetleme nedeniyle kümülüs hücrelerinden uzaklaşan oositler incelenerek de denenmiş, deney öncesinde oositlerin hepsinin PI aşamasında, görünür GV'ye sahip immatür oositler olduğu doğrulanmıştır.

### 3.2.5. Oositlerin Kültürü ve İncelenmesi

Oositlerin deney gruplarına ait medyumlara aktarıldığı saat 0 kabul edilmiştir. COC'lar bu saatten itibaren 4, 6, 8, 10, 20 ve 24. saatlerde incelenerek



maturasyon durumları değerlendirilmiştir. İnceleme sırasında her grupta kaç oositin PI (GV) kaçının, MI ve kaçının MII aşamasında olduğu olduğu not edilmiştir. Değerlendirme yapılırken, kümülüs genişlemesi, korona hücrelerinin durumu ve kutup cisimcikleri dikkate alınmıştır. Dejenerasyon değerlendirilirken zonanın bütünlüğü, sitoplazmanın durumu ve oosit ile granulozaların morfolojisi değerlendirilmiştir.

- Kümülüs hücreleri henüz genişlememiş, sıkı korona ile kümülüs tabakaları olan ve GV hala görünür olan COC'lar **immatür (PI)** kabul edilmiştir.
- Kümülüs hücreleri hafif genişlemiş, korona sıkı veya ışınsal olan ancak hem GV hem de kutup cisimciği görülmeyen oositler GVBD'yi tamamlamış ancak olgunlaşmasını henüz tamamlamamış, immatür (**MI**) oositler olarak kabul edildi.
- Kümülüs genişlemesi gerçekleşmiş, korona radyatası ışınsal olan ve I. kutup cisimciği atılmış oositler, olgunlaşmasını tamamlamış, **matür (MII)** oositler olarak kabul edilmiştir.
- Sitoplazması koyu renkte veya siyah görülen veya çevredeki granuloza hücrelerinin yarıdan fazlasının sitoplazmaları koyu renkte olan oositler dejenere olarak kabul edilmiştir. Ayrıca oosit sitoplazması aşırı granüllü bir yapı kazanmış veya sitoplazma ile ZP arası boşluk (perivitellin aralık) artmışsa, bu tip oositler de dejenere kabul edilmiştir. Partenogenetik bölünmeye giden oositler de dejenere olarak kabul edilmiştir.

### 3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Tüm deney 3 kez tekrarlandıktan sonra sonuçlar toplanarak değerlendirildi. Ölçüm yapılan her saat için, her grupta bulunan PI, MI ve MII aşamalarındaki oositlerin sayıları belirlenerek gruptaki toplam oosit sayısına göre yüzde olarak hesaplanmıştır. Oositlerin maturasyon durumlarında ölçüm yapılan zamanlara göre meydana gelen değişiklik ve gruplar arası farklılıklar birbiriyle karşılaştırılarak istatistiksel analizleri yapıldı. Analizlerde SPSS 15.0 ile GraphPad InStat programları kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırma yapılırken iki kuyruklu Kikare testi yapıldı. 0,05'ten küçük sonuçlar anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Ardışık üç tekrar sonucunda toplam 123 sağlıklı oosit elde edilmiş ve deneylerde kullanılmıştır. İzolasyon sırasında meydana gelebilen hasarlar sonucu sağlıklı görünümlerini kaybeden oositler, deney medyumlarına alınmış olsa bile değerlendirme sırasında gruplara dahil edilmemiştir. Buna göre HX grubu için 38, LN grubu için 28, HX+LN grubu için 24 ve kontrol grubu için toplam 33 oosit kullanılmıştır. Deney sırasında her saat için gruplara göre oositlerin mayozun hangi aşamasında oldukları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

**Tablo 6:** 2. Saatte gruplara göre oositlerin durumları

No	Grup	Oositlerin Durumu								
		PI		MI		MII		Dejenere		Top
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
1	HX	36	95	0	0	0	0	2	5	38
2	LN	22	79	5	18	0	0	1	3	28
3	HX+LN	23	96	0	0	0	0	1	4	24
4	KONT	27	82	4	12	0	0	2	6	33
Toplam		108		9		0		6		123

**Tablo 7:** 4. Saatte gruplara göre oositlerin durumları

No	Grup	Oositlerin Durumu								
		PI		MI		MII		Dejenere		Top
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
1	HX	35	92	0	0	0	0	3	8	38
2	LN	15	54	9	32	0	0	4	14	28
3	HX+LN	21	88	0	0	0	0	3	13	24
4	KONT	20	61	10	30	0	0	3	9	33
Toplam		91		19		0		13		123

**Tablo 8:** 6. Saatte gruplara göre oositlerin durumları

No	Grup	Oositlerin Durumu								
		PI		MI		MII		Dejenere		Top
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
1	HX	35	92	0	0	0	0	3	0	38
2	LN	14	50	6	21	3	11	5	18	28
3	HX+LN	19	79	0	0	0	0	5	25	24
4	KONT	13	39	13	39	3	19	4	12	33
Toplam		81		19		6		17		123

**Tablo 9:** 8. Saatte gruplara göre oositlerin durumları

No	Grup	Oositlerin Durumu								
		PI		MI		MII		Dejenere		Top
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
1	HX	35	92	0	0	0	0	3	8	38
2	LN	13	46	7	25	3	11	5	18	28
3	HX+LN	14	58	4	17	0	0	6	21	24
4	KONT	7	21	15	45	6	19	5	15	33
Toplam		69		26		9		19		123

**Tablo 10:** 10. Saatte gruplara göre oositlerin durumları

No	Grup	Oositlerin Durumu								
		PI		MI		MII		Dejenere		Top
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
1	HX	35	92	0	0	0	0	3	8	38
2	LN	13	46	5	18	4	14	6	25	28
3	HX+LN	10	42	7	29	0	0	7	29	24
4	KONT	7	21	9	27	12	37	5	15	33
Toplam		65		21		16		21		123

**Tablo 11:** 20. Saatte gruplara göre oositlerin durumları

No	Grup	Oositlerin Durumu								
		PI		MI		MII		Dejenere		Top
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
1	HX	32	84	1	3	2	5	3	8	38
2	LN	6	21	2	7	10	36	10	36	28
3	HX+LN	5	21	1	4	11	46	7	29	24
4	KONT	5	15	5	15	17	45	5	15	33
Toplam		48		9		40		25		123

**Tablo 12:** 24. Saatte gruplara göre oositlerin durumları

No	Grup	Oositlerin Durumu								
		PI		MI		MII		Dejenere		Top
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
1	HX	32	84	0	0	3	8	3	8	38
2	LN	6	21	1	4	11	39	10	36	28
3	HX+LN	4	17	1	4	12	50	7	29	24
4	KONT	5	15	4	12	19	58	5	15	33
Toplam		47		6		45		25		123

Deney sırasında saatlere göre oosit durumları her grup için aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir.

**Tablo 13:** Hipoksantin (HX) grubunda saatlere göre oositlerin durumları

Saat	Oositlerin Durumu								
	PI		MI		MII		Dejenere		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
2	36	95	0	0	0	0	2	5	38
4	35	92	0	0	0	0	3	8	38
6	35	92	0	0	0	0	3	0	38
8	35	92	0	0	0	0	3	8	38
10	35	92	0	0	0	0	3	8	38
20	32	84	1	3	2	5	3	8	38
24	32	84	0	0	3	8	3	8	38

**Tablo 14:** L-NAME (LN) grubunda saatlere göre oositlerin durumları

Saat	Oositlerin Durumu								
	PI		MI		MII		Dejenere		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
2	22	79	5	18	0	0	1	3	28
4	15	54	9	32	0	0	4	14	28
6	14	50	6	21	3	11	5	18	28
8	13	46	7	25	3	11	5	18	28
10	13	46	5	18	4	14	6	25	28
20	6	21	2	7	10	36	10	36	28
24	6	21	1	4	11	39	10	36	28

**Tablo 15:** Hipoksantin + L-NAME (HX+LN) grubunda saatlere göre oositlerin durumları

Saat	Oositlerin Durumu								
	PI		MI		MII		Dejenere		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
2	23	96	0	0	0	0	1	4	24
4	21	88	0	0	0	0	3	13	24
6	19	79	0	0	0	0	5	25	24
8	14	58	4	17	0	0	6	21	24
10	10	42	7	29	0	0	7	29	24
20	5	21	1	4	11	46	7	29	24
24	4	17	1	4	12	50	7	29	24

**Tablo 16:** Kontrol (KO) grubunda saatlere göre oositlerin durumları

Saat	Oositlerin Durumu								
	PI		MI		MII		Dejenere		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
2	27	82	4	12	0	0	2	6	33
4	20	61	10	30	0	0	3	9	33
6	13	39	13	39	3	19	4	12	33
8	7	21	15	45	6	19	5	15	33
10	7	21	9	27	12	37	5	15	33
20	5	15	5	15	17	45	5	15	33
24	5	15	4	12	19	58	5	15	33

Oositler, mayozun aşamalarına göre sınıflandırıldıklarında, her grupta saatlere göre oosit oranları aşağıdaki tablolarda verilmiştir. Farklı harf ile belirtilmiş gruplar birbirlerinden o saat için istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıdır ( $P<0,05$ ).

**Tablo 17:** Saatlere göre GVBD'yi tamamlamış (MI ve MII) oositlerin oranları (%).

Saat	Gruplar			
	HX	LN	HX+LN	KO
2	0 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>
4	0 <sup>a</sup>	32 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	30 <sup>b</sup>
6	0 <sup>a</sup>	32 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	45 <sup>b</sup>
8	0 <sup>a</sup>	36 <sup>b</sup>	17 <sup>c</sup>	64 <sup>d</sup>
10	0 <sup>a</sup>	32 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	64 <sup>c</sup>
20	8 <sup>a</sup>	43 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	67 <sup>c</sup>
24	8 <sup>a</sup>	43 <sup>b</sup>	54 <sup>b</sup>	70 <sup>c</sup>

**Tablo 18 :** Saatlere göre gruplar arasında Metafaz II'ye ulaşma oranları (%).

Saat	Gruplar			
	HX	LN	HX+LN	KO
2	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
4	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
6	0 <sup>a</sup>	11 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	19 <sup>b</sup>
8	0 <sup>a</sup>	11 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	19 <sup>b</sup>
10	0 <sup>a</sup>	14 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	37 <sup>c</sup>
20	5 <sup>a</sup>	36 <sup>b</sup>	46 <sup>bc</sup>	52 <sup>c</sup>
24	8 <sup>a</sup>	39 <sup>b</sup>	50 <sup>bc</sup>	58 <sup>c</sup>

**Tablo 19:** Saatlere göre gruplar arasında dejenerasyon oranları (%).

Saat	Gruplar			
	HX	LN	HX+LN	KO
2	5 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>
4	8 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>
6	8 <sup>a</sup>	18 <sup>ab</sup>	21 <sup>b</sup>	12 <sup>ab</sup>
8	8 <sup>a</sup>	18 <sup>ab</sup>	25 <sup>b</sup>	15 <sup>ab</sup>
10	8 <sup>a</sup>	21 <sup>bc</sup>	29 <sup>c</sup>	15 <sup>ab</sup>
20	8 <sup>a</sup>	36 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	15 <sup>a</sup>
24	8 <sup>a</sup>	36 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	15 <sup>a</sup>

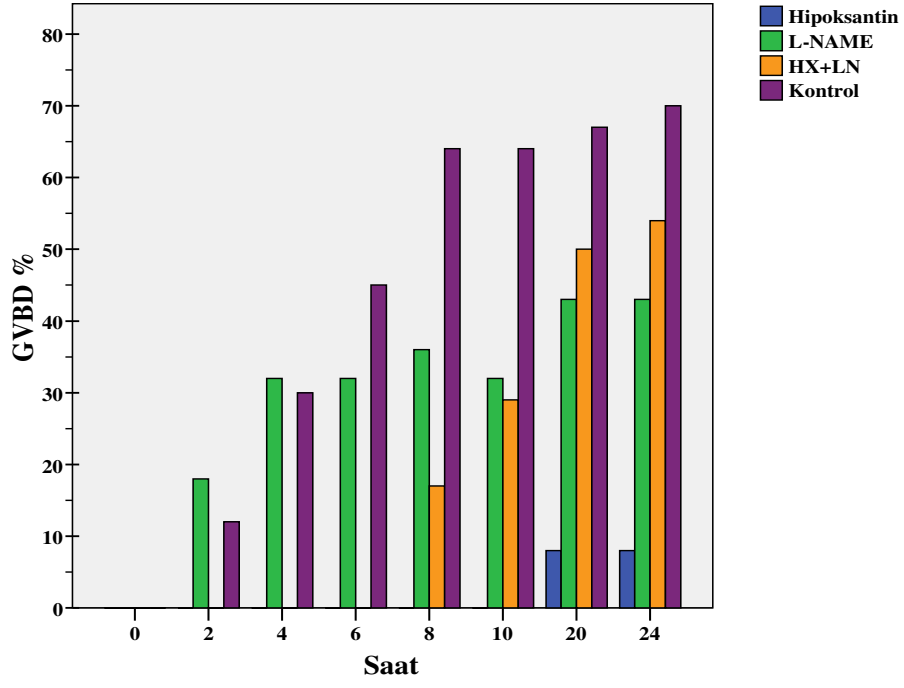
### **GVBD oranları**

Kontrol grubundaki oositler, neredeyse sabit bir ivmeyle GVBD'yi tamamlayarak, 8. saat civarında diğer gruplarla en büyük farkı yakalamıştır (Şekil 28). Kontrol grubu 8. ve 24. saatlerde (Tablo 17)tüm gruplardan anlamlı ölçüde farklı sonuç vermiştir (8. saat: HX  $P<0,0001$ , LN  $P<0,002$ , HX+LN  $P<0,0001$ ) (24. saat: HX  $P<0,0001$ , LN  $P<0,0002$ , HX+LN  $P<0,03$ ). Deney sonunda da en yüksek GVBD yüzdesini kontrol grubu elde etmiştir (Resim 27).

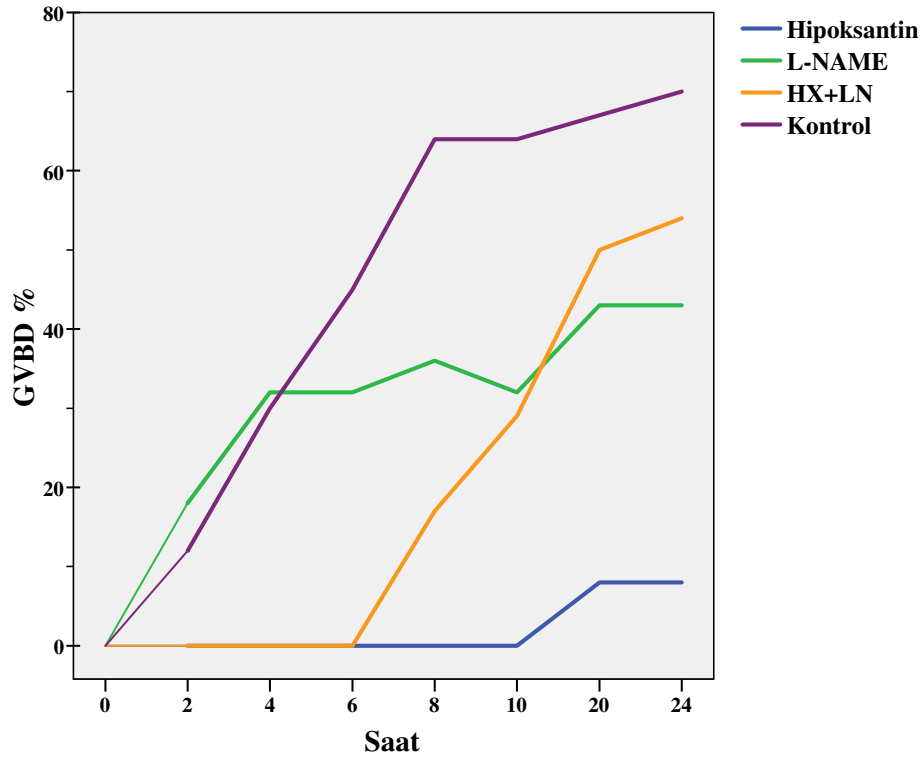
Hipoksantin grubu deney süresince en az GVBD yüzdelere sahip olan gruptur. Deney sonucunda bile GVBD %8 oranında kalmıştır (Tablo 17, Resim 24,26). HX grubu LN ve kontrol grubu ile 2. saatten itibaren HX+LN grubu ile de 8. saatten itibaren farklı sonuçlar vererek istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük kalmıştır ( $P<0,0011$ ).

L-NAME grubu maturasyona, kontrol grubu ile aynı zaman dilimlerinde başlamıştır. Dördüncü saate kadar %30 civarında gerçekleşmiş olan GVBD, bu saatten sonra hızını yitirerek deney sonunda %50'lerde kalmıştır (Şekil 28, Resim 25). Deney başlangıcında kontrol grubuyla kıyaslandığında, yakın yüzdelere GVBD'yi gerçekleştiren LN grubunda, 8. saate kadar kontrol grubuyla anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 17). LN grubunun diğer gruplarla en belirgin farkı 8. saatte görüldü. Bu saatte tüm gruplardan anlamlı olarak farklı sonuç veren LN grubu (HX  $P<0,0001$ , HX+LN  $P<0,004$ , KO  $P<0,002$ ) 24. saatte sadece HX ve kontrol gruplarından istatistiksel olarak farklıydı ( $P <0,0001$ ,  $P<0,0002$ ).

L-NAME ve Hipoksantin içeren medyumlarının karıştırılarak kullanıldığı HX+LN grubunda 6. saate kadar, tıpkı HX grubundaki gibi hiç GVBD gerçekleşmezken (Resim 22), bu saatten sonra kontrol ve HX gruplarına benzer bir artışla (Şekil 28) GVBD oranı artmaya başlamıştır. HX+LN grubu, 10. saatten sonra LN grubunu yakalayarak anlamlı ölçüde olmasa da bir miktar geçmiştir (Şekil 27,28, Resim23). Altıncı saatte, LN+HX grubu, tıpkı HX grubu gibi LN ve kontrol gruplarından istatistiksel olarak farklı sonuç verirken ( $P<0,0001$ ), 10 saatte, kontrol ve HX gruplarından anlamlı ölçüde farklı değer almıştır ( $P<0,0001$ ). 24. saatte de aynı gruplarla farklılık bulunmuştur (sırasıyla,  $P<0,03$ ,  $P<0,0001$ ).



Şekil 27: Saatlere göre GVBD oranları



Şekil 28: Saatlere göre GVBD oranlarındaki değişim

### Metafaz II oranları

Deneyler sırasında oositlerin Metafaz II'ye giriş zamanlarının, GVBD'den en az 3 saat sonra olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 17,18). Oositler çoğunlukla gözlem yapmadığımız 10 ile 20. saatler arasında MII aşamasına geçmiş olduklarından (Şekil 29,30) MII için tam zaman dilimini belirlemek mümkün olmamıştır. Elde ettiğimiz veriler, genel olarak 24 saatlik inkübasyon süresinin, kontrol grubundaki oositlerin en az yarısının maturasyonu tamamlaması için yeterli olduğunu göstermiştir (Tablo 18).

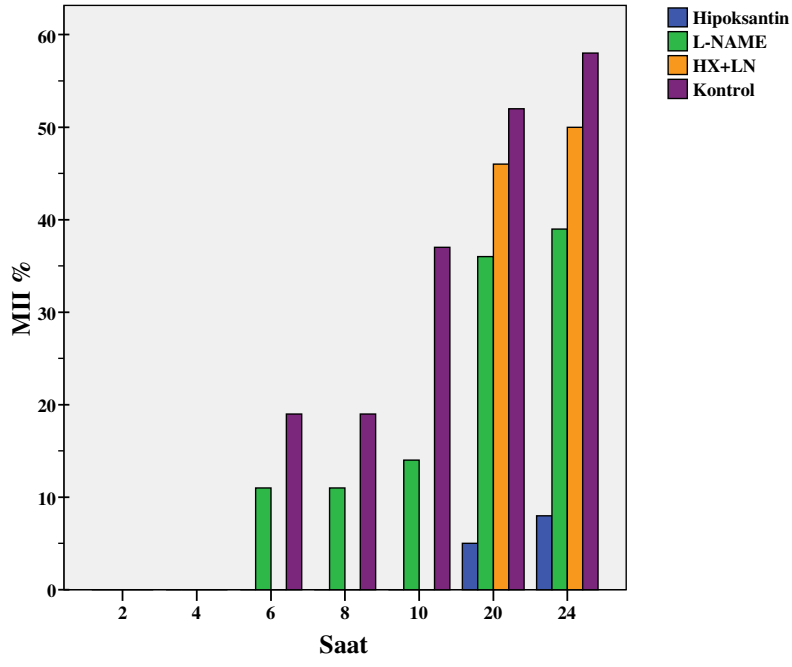
Gruplara göre MII oranlarını değerlendirdiğimizde yine en yüksek oranın kontrol grubunda olduğunu belirledik (Tablo 18). Deney sonunda HX ve LN gruplarından anlamlı ölçüde yüksek olan (sırasıyla  $P<0,0001$ ,  $P<0,01$ ) kontrol grubunda, HX+LN grubu ile anlamlı bir fark bulunamamıştır. Deney sonunda, LN grubu HX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek değerler almışken ( $P<0,0001$ ). LN+HX grubu yalnızca HX grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $P<0,0001$ ). HX+LN grubundaki oositler, HX grubunda olduğu gibi ancak 10. saatten sonra MII aşamasına geçebilmişlerdir (Resim 23). Onuncu saate kadar her iki grup da %0 MII oranına sahipken kontrol ile LN grupları anlamlı şekilde yüksek değerler almıştır ( $P<0,0001$ ,  $P<0,0003$ ). Deney sonunda, HX grubu tüm diğer gruplardan farklı değerler almıştır ( $P<0,0001$ ). Kontrol grubu HX ve LN gruplarından anlamlı ölçüde yüksek değer almış ( $P<0,01$ ), HX+LN ile arasında önemli bir fark belirlenememiştir.

Deney sonunda GVBD'yi tamamlayan oositlerden MII aşamasına geçiş oranları incelendiğinde, HX grubu diğerlerinden anlamlı derecede yüksek iken diğer gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır.

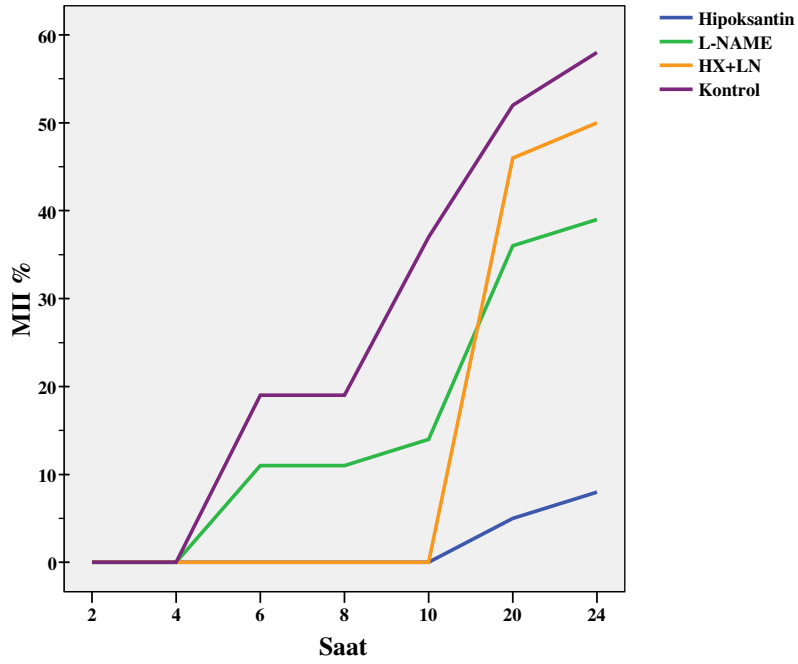
**Tablo 20:** Deney sonunda GVBD'yi tamamlamış oositlerin MII aşamasına geçme oranları (%). Farklı harf ile belirtilmiş gruplar birbirlerinden anlamlı ölçüde farklıdır ( $P<0,05$ ).

Aşama	Gruplar			
	HX	LN	HX+LN	KO
GVBD	8 <sup>a</sup>	43 <sup>b</sup>	54 <sup>b</sup>	70 <sup>c</sup>
MIİ	8 <sup>a</sup>	39 <sup>b</sup>	50 <sup>bc</sup>	58 <sup>c</sup>
Geçiş	100 <sup>a</sup>	91 <sup>b</sup>	93 <sup>b</sup>	83 <sup>b</sup>





Şekil 29: Saatlere göre MII oositlerin oranları



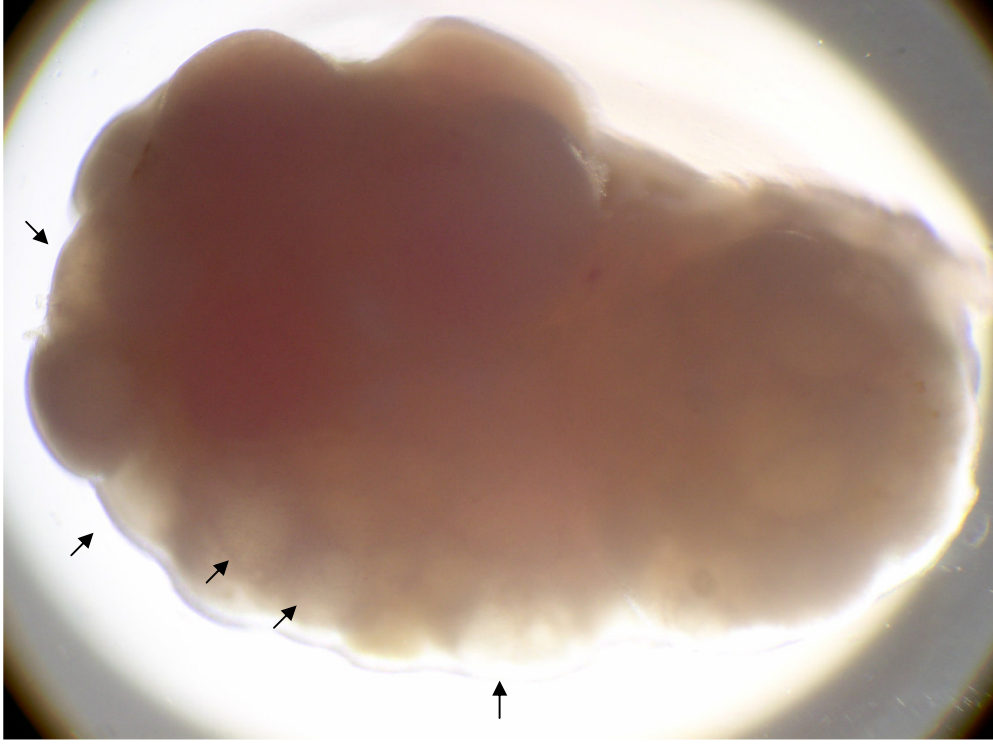
Şekil 30: Saatlere göre MII oranlarındaki değişim

### **Dejenerasyon oranları**

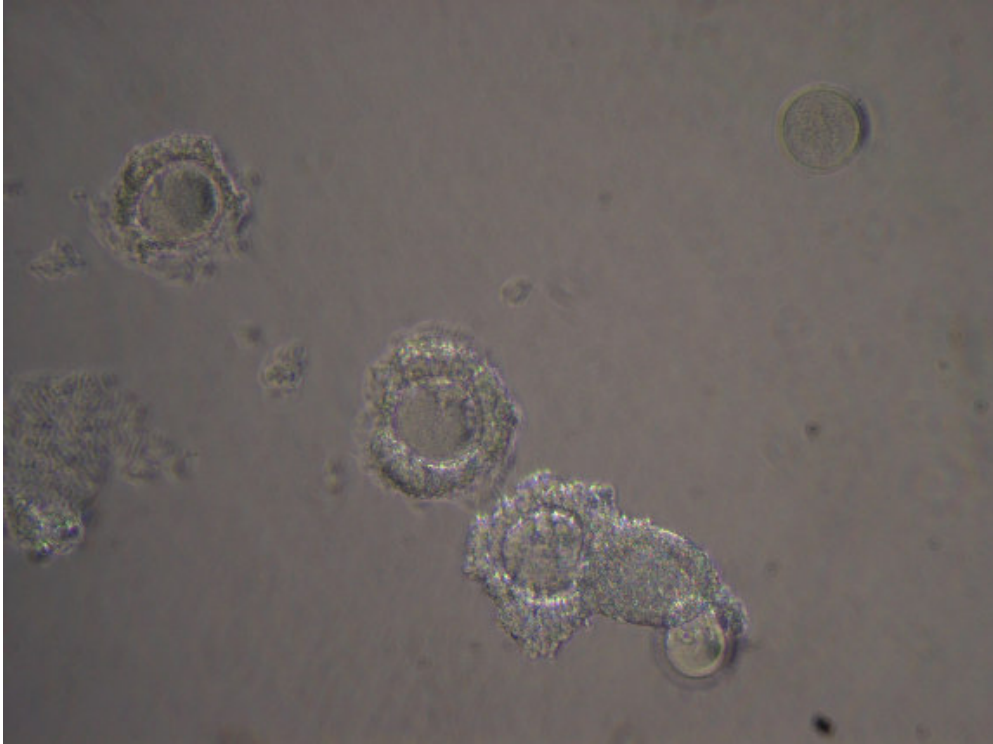
Kültüre alınan oositlerin bazılarında, kültür sırasında zamanla ortaya çıkan dejenerasyonlar gözlenmiştir. Dejenere oositler genelde; koyu renkli, granüllü görünüşleri ve zaman zaman da büzüşmüş veya azalmış bir sitoplazma ile kendilerini belli etmişlerdir. Deneş süresince partenogenetik bölünmeye uğramış oosite ise hiç rastlanmamıştır. Dejeneratif oositler değerlendirilirken deney başlangıcında sağlıklı olmalarına dikkat edilmiştir. Deneş medyumları içinde nadiren zonası hasar görmüş oositlere rastlansa da böyle durumlar genelde izolasyon sırasında meydana geldiği için başlangıçta değerlendirmeye alınmamıştır. Çapı istenen seviyenin altında olan oosit ve COC'lar da, deneş medyumlarına aktarılmış olsa bile değerlendirme dışında tutulmuştur.

Gruplar arasında dejenerasyon oranını karşılaştırdığımızda deney sonunda bulunan en yüksek oranın LN grubunda en düşükün de HX grubunda olduğunu gördük (Tablo 19). İstatistiksel analizler sonucunda HX ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, LN ve HX+LN grupları HX'e göre anlamlı ölçüde yüksek sonuç vermiştir ( $P<0,0001$ ,  $P<0,0003$ ). LN ile LN+HX grupları dejenerasyon açısından değerlendirildiğinde aralarında fark bulunmazken kontrol ile LN ( $P<0,0012$ ) ve HX+LN arasında ( $P<0,03$ ) anlamlı fark bulunmuştur.

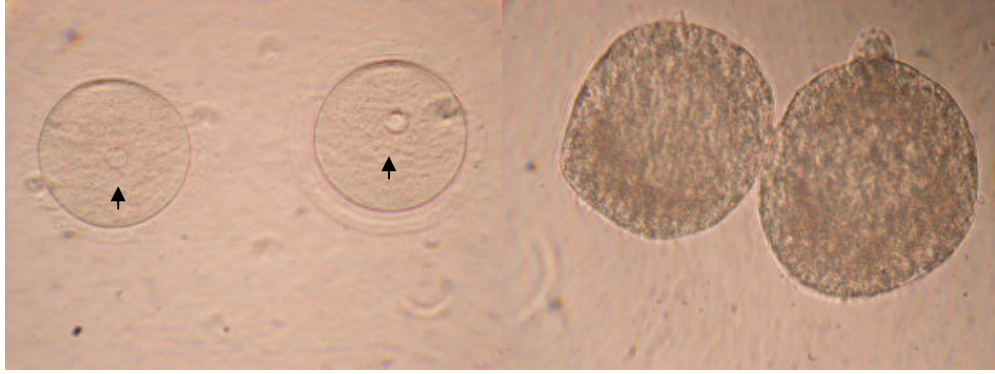
İncelemeler sırasında değerlendirmeye alınmasa da, göze çarpan bir nokta da, MII aşamasına geçmiş oositlerde oluşan kutup cisimciklerinin anormal morfolojide veya fragmente olmalarıdır. Bu durum en çok LN grubunda gözlenmiş olmasına karşın (Resim 25,28) çalışmamızda bu durumu inceleyen bir ölçüm yapılmamıştır.



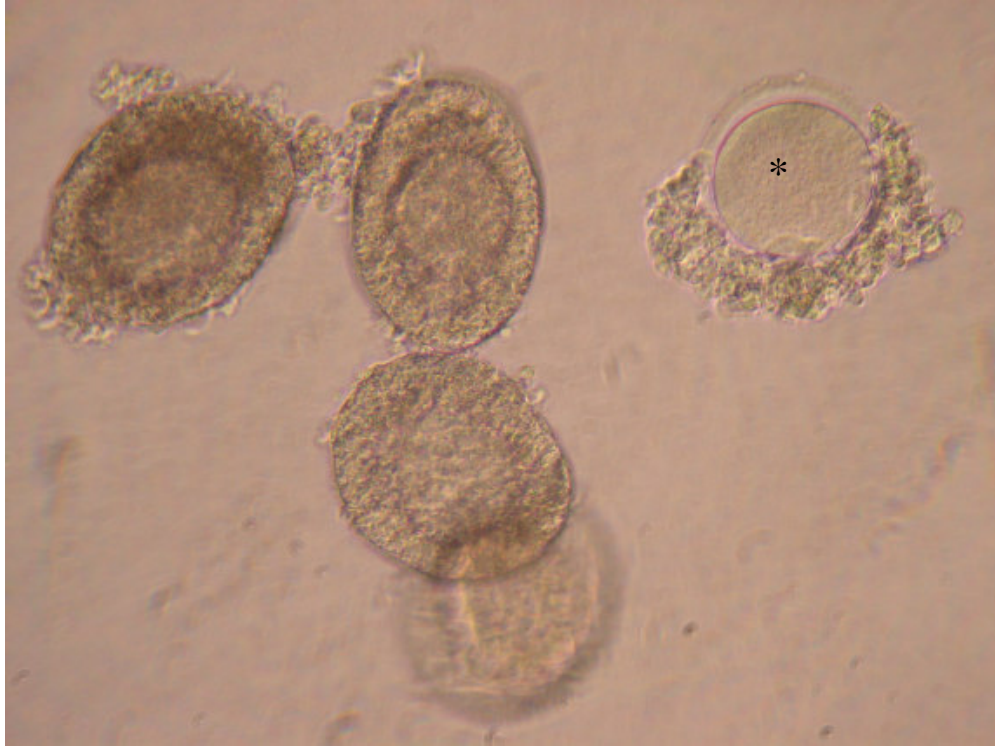
**Resim 20:** Fareden çıkarılmış, henüz folikülleri patlatılmamış ovaryum. Olgun foliküller, iri ve şeffaf şekilde görülmekte (OKlar) (Büyütme x12).



**Resim 21:** Deney Başlangıcında GV aşamasındaki oositler ve COC'lar (x120).

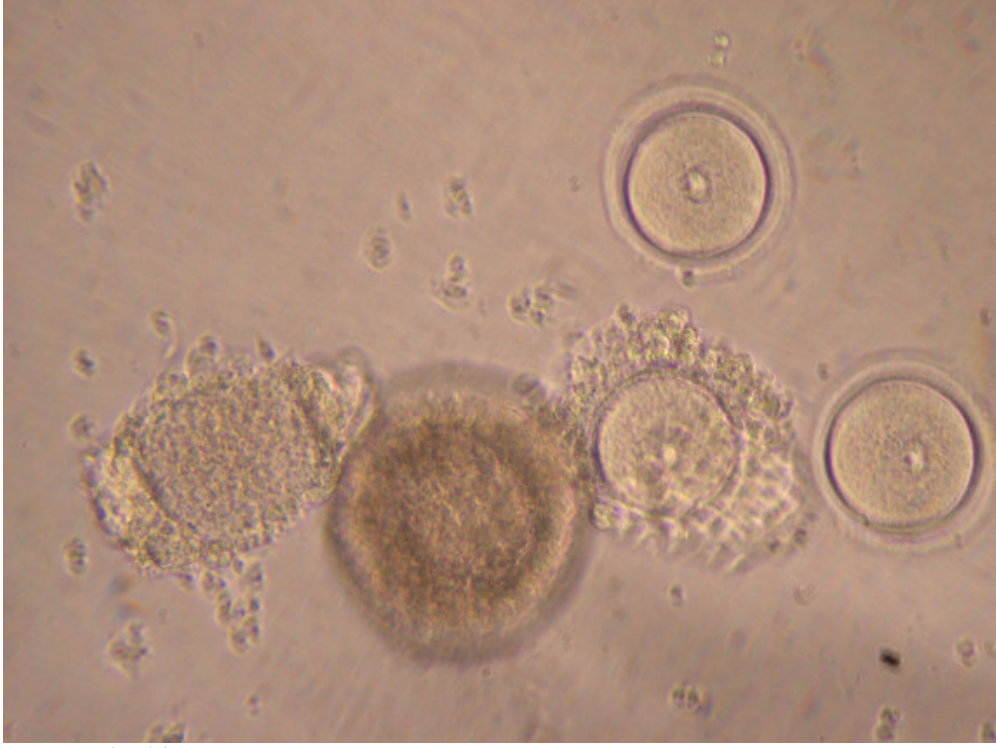


**Resim 22:** 6 saatte HX+LN grubundan izole oositler (solda) ve COC'lar (sağda) görüntülenmiş. Germinal veziküller (GV) ok ile gösterilmiş (x240).

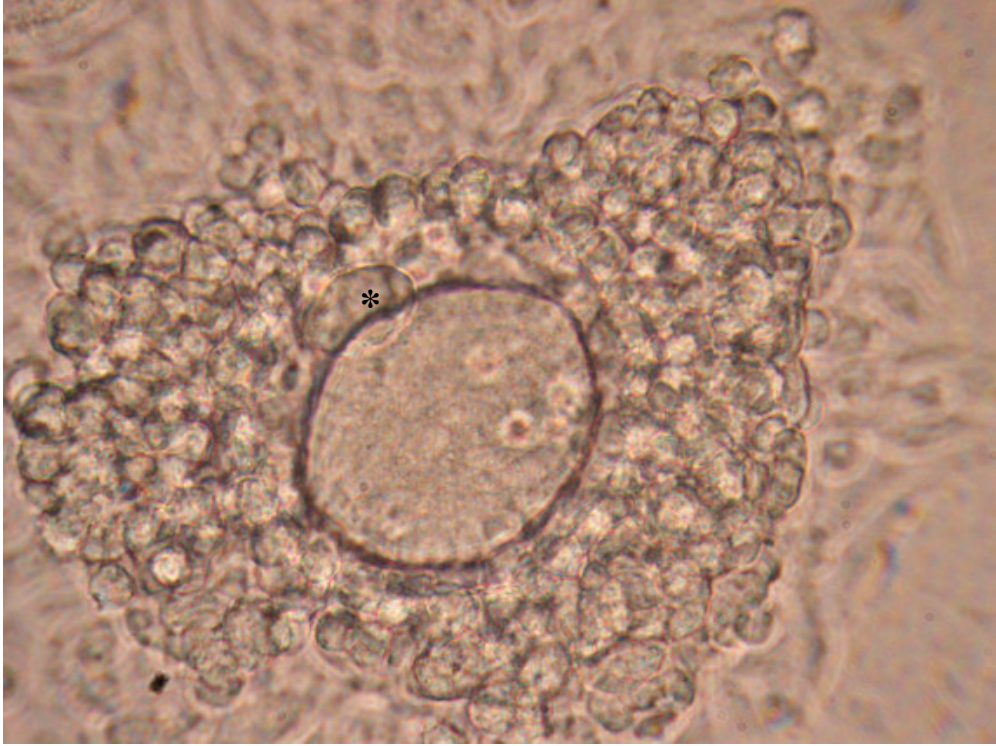


**Resim 23:** 10. saatte HX+LN grubundan izole bir oosit ile 4 adet COC görülüyor. Oositlerden biri (\*) Metafaz I aşamasında (x240).

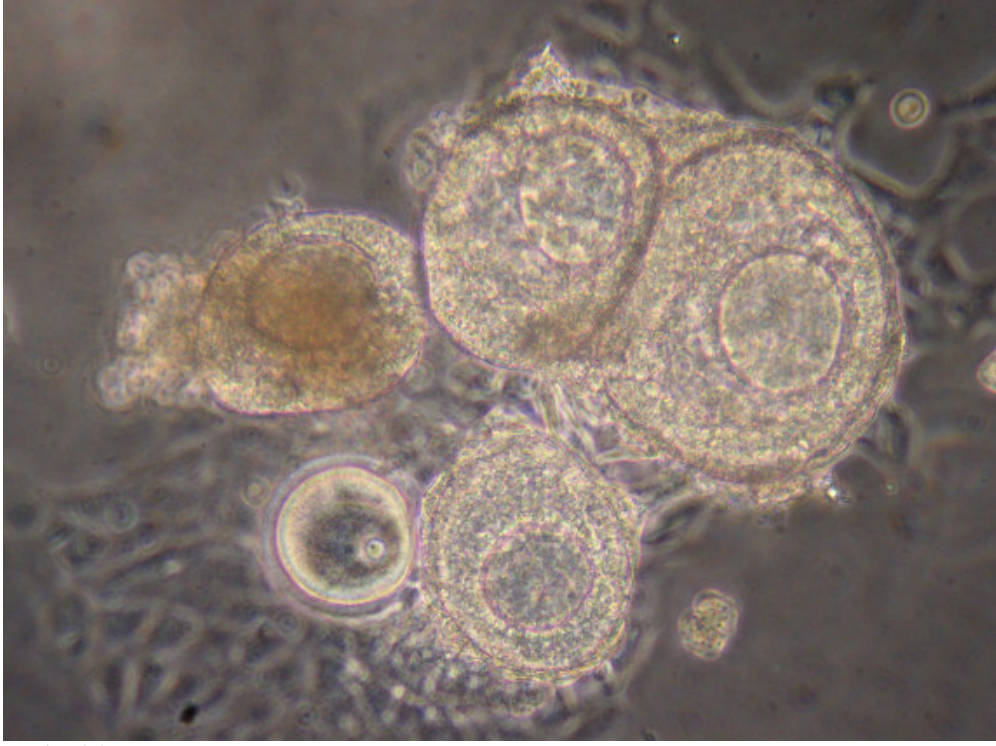




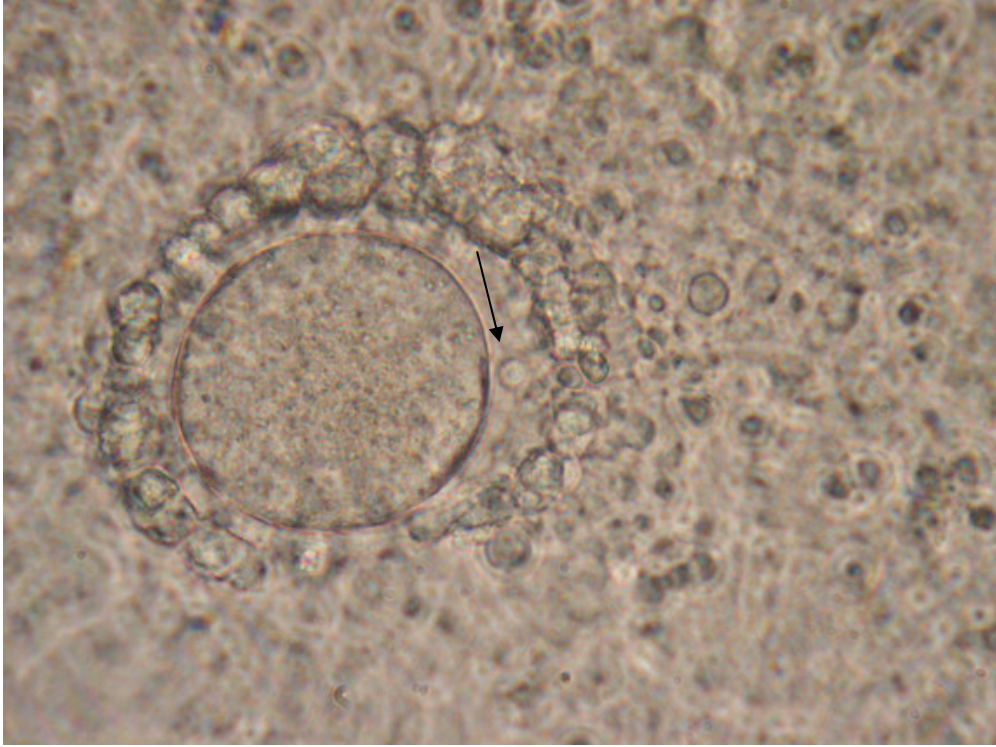
**Resim 24:** 10. saatte HX grubundaki oositler ve COC'lar. Hepsi GV aşamasında (x240).



**Resim 25:** 10. saatte LN grubundan bir COC, kümülüs genişlemesi gerçekleşirken, iri bir kutup cisimciğiyle (\*) birlikte görülüyor (x480).

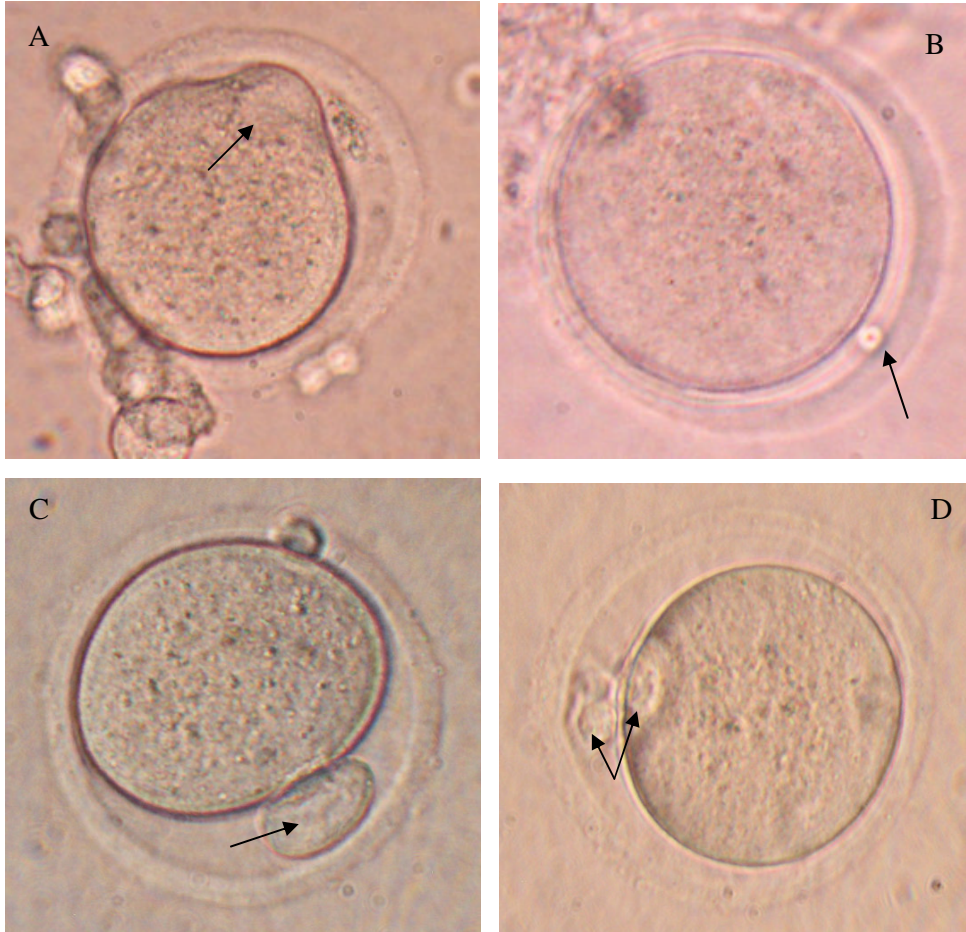


**Resim 26:** 24. saatte HX grubundaki oosit ve COC'lar. Hepsi GV aşamasında beklemekte (x240).



**Resim 27:** 24. saatte kontrol grubundan bir oosit. Kümüls genişlemesi gerçekleşmiş, normal kutup cisimciğine sahip (ok) bir oosit görülüyor (x480).





**Resim 28:** 20. saatte LN grubundaki oositler. A'da kutup cisimciği ayrılmakta olan bir oosit gör÷l÷yor. Kutup cisimciği B'de normal boyutlarda, C'de ise normalden daha büyük sitoplazmaya sahip. D'de ise fragmente kutup cisimciğine sahip bir oosit gör÷l÷yor (Kutup cisimcikleri ok ile gösterilmiş) (x480).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Dişi üreme hücreleri olan oositler, erken embriyonal dönemde gelişmeye başlar. Gelişmekte olan gonadlarda mitoz ile çoğalıp sayılarını arttırmaları. Sonrasında zamanla atreziye uğrayarak azalır. Mayoz bölünmesine embriyonal dönemde başlayan oositler mayozun ilk aşamasından öteye gidemezler. Bu bekleme (mayotik arrest) 12 -50 yıl kadar sürebilir.

Puberteden sonra küçük gruplar halinde olgunlaşmaya başlayan foliküllerden yalnızca biri gelişimini tamamlayarak ovulasyonla atılacak hale gelir. Menstrual döngünün ortalarında meydana gelen LH hormonundaki aşırı yükselme ile mayotik arresti sağlayan mekanizmalar ortadan kaldırılır ve oosit maturasyonunu tamamlayarak sekonder oosit haline gelir ancak Mayoz II'nin metafaz aşamasında yine beklemeye geçer.

Oosit maturasyonu, oositi mayozda bekleten ve olgunlaşmasını tetikleyen faktörler arasındaki hassas dengeler sayesinde gerçekleşmektedir (3). MPF, mayoz ve mitozda hücre bölünmesini tetikleyen en önemli moleküllerden biridir (12). MPF, PKA tarafından, fosforile edilerek inaktif halde tutulmaktadır (5,14). PKA hücre içi ikincil mesajcı moleküllerden bir olan cAMP tarafından aktive edilmektedir (5). cAMP, oosit maturasyonunu düzenleyen en önemli moleküllerden biridir (4). Oosit içindeki yüksek cAMP düzeyleri cAMP/PKA/MPF yolu ile maturasyonu engellemektedir (3,4,5,12,13).

PDE'ler halkasal nükleotidlerin (cAMP ve cGMP) indirgenmesinden sorumlu enzimlerdir (4). Oositte, PDE izoformlarından PDE3A hakim haldeyken oositi çevreleyen granüloza hücrelerinde PDE4D hakim durumda bulunmaktadır (75,76). cGMP, PDE4D ile etkileşmezken, PDE3A ile yüksek oranda etkileşmektedir. Ancak PDE3A'da, cGMP'nin hidrolizasyonu cAMP'ye göre çok yavaş gerçekleşir. Bu nedenle cGMP, PDE3A için inhibitör gibi fonksiyon göstermektedir (13-19). PDE3'ün cGMP ile baskılanması cAMP düzeyini ve dolayısıyla PKA aktivitesini arttırmaktadır (14,16,18-20).



NO, cGMP sentezinden sorumlu olan Guanilil Siklazın (GC) iyi bilinen bir aktivatörüdür (19-22). Oosit ve çevresindeki granüloza hücrelerinde NO sentezini gerçekleştiren NOS enzimleri bulunduğu için NO'nun cGMP aracılığıyla maturasyonu engelliyor olabileceği hipotezini araştırmayı amaçladık. Hipotezimize göre LH sinyali gelene kadar, oosit içinde sürekli sentezlenen NO tarafından yüksek halde tutulan cGMP maturasyonu engellemektedir. Bu durumda oosit içi NO oranlarını düşürdüğümüzde maturasyonun gerçekleşmesini bekleriz.

Hipotezimizi kanıtlanmak için henüz olgunluğa erişmemiş dişi farelere, folikül gelişimini tetikleyen FSH analogu PMSG verdik. 40-48 saat sonra, ovulasyonun hemen öncesinde ovaryumları çıkardık. Ovaryumlardan oositleri çevrelerinde kümülüs hücreleriyle birlikte izole ederek hücre kültüründe yaşattık.

Gruplara ayırdığımız kültür medyumlarından birine hücre içi NO sentezini engelleyecek nonspesifik NOS inhibitörü L-NAME'yi 1 mM konsantrasyon oluşturacak şekilde ekledik. Bir diğer medyuma spesifik olarak PDE3'leri inhibe eden hipoksantinden 4 mM konsantrasyonda ekledik. NO yokluğunda PDE3 baskılanırsa neler olacağını görmek için de iki kimyasalın kültür medyumlarını birebir oranda da içeren üçüncü bir medyum kullandık. Oositleri 2,4,6,8,10,20 ve 24. saatlerde inverted mikroskop altında, mayozun aşamaları ve dejenerasyon açısından gözlemledik.

Bulgular değerlendirildiğinde, HX grubunda maturasyonun çok düşük oranlarda gerçekleştiği görüldü. Oosit içi cAMP'nin maturasyonu engelleyen en önemli moleküllerden biri olduğu düşünüldüğünde, cAMP'yi hidrolizleyen enzimi baskılayarak maturasyonun engellenebileceği uzun yıllardır biliniyordu (3,4,5,12,13). Nitekim elde ettiğimiz veriler de bunu doğruluyordu. Hipoksantin, PDE3'ü inhibe ederek kültürdeki oositlerde cAMP'nin indirgenmesini engellemiş, dolayısıyla hücre içi cAMP'nin yüksek kalmasını sağlamıştır. Yüksek cAMP seviyesi de PKA aracılığıyla MPF'yi inaktif halde tutarak maturasyonu engellemiştir. Bu nedenle 24 saatin sonunda bile HX grubundaki GVBD oranları (%8) diğer gruplara göre de anlamlı ölçüde düşüktü.

Kültüre nonspesifik NOS inhibitörü L-NAME verdiğimizde hücre içi NO seviyelerinin düştüğü; NO oranları düştüğü için, GC uyarımı azaldığından, cGMP miktarlarının da düştüğü bilinmektedir (20,23). cGMP, PDE3A'nın bir inhibitörü

olduğundan, cGMP miktarı düştüğünde PDE3A üzerindeki baskılayıcı etkinin ortadan kalkarak oositlerin maturasyona girişlerinin başlamasını bekliyorduk. Deneilerde, L-NAME verilen grupta oositlerin, kontrol grubuyla yakın oranlarda maturasyona başladığını belirledik. İlk saatlerde elde edilen veriler kontrol grubuna göre hafif yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Dördüncü saatten sonra LN grubundaki GVBD oranı fazla değişmemesine rağmen kontrol grubu artmaya devam etti. Buna rağmen 8. saate kadar belirgin bir istatistiksel farklılık ortaya çıkmadı. LN grubu ancak 8. saatte kontrole göre anlamlı ölçüde düşük değerler almışken, HX ve HX+LN gruplarından da anlamlı ölçüde yüksek değerlere ulaşmıştır. Deney sonunda LN grubu kontrol grubunun ulaştığı değerlere ulaşamayarak anlamlı ölçüde düşük, HX grubundan ise anlamlı şekilde yüksek sonuç almış olmasına rağmen HX+LN grubuyla istatistiksel olarak farklı değerler almamıştır.

Hipotezimizde azalan NO oranlarının maturasyonun önündeki engellerden PDE3A'yı baskılayarak maturasyonu tetikleyeceğini öngörmüştük. Dördüncü saate kadar kontrol grubuyla kıyasladığımızda hemen hemen aynı sonuçları alan LN grubu ancak 8. saatte kontrol grubundan ayrılmıştı. Kontrol grubunun kendiliğinden maturasyona başladığı göz önüne alındığında LN grubunun da benzer sonuçlar vermesi hipotezimizi destekliyordu. Fakat 8. saatten itibaren kontrol grubu ile aralarında ortaya çıkan farklılık, L-NAME verilen oositlerin, deney sonucunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük sonuç vermesine neden olmuştur.

LN grubunun istatistiksel açıdan kontrol grubundan yüksek olamamasının nedenlerinden biri, her iki grubun da deneyin gerçekleştiği ortam şartlarında ilk saatlerde gerçekleşebilecek en yüksek maturasyon oranlarını vermiş olması olabilir. Daha etkili olabilecek bir faktör de LN grubunda diğer gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek olan dejenerasyon oranları olabilir. Elde ettiğimiz verilerde de LN grubundaki dejenerasyon oranları, 8. saatte hiçbir gruptan anlamlı olarak farklı değilken, deney sonunda belirgin ölçüde yüksek bulunmuştur.

Jablonka-Shariff ve Olson'un gerek eNOS knock out fareler kullanarak, gerekse L-NAME eklenmiş kültür medyumunu kullanarak yaptığı çalışmalar (22,87,88) ve Tao'nun çalışmalarında elde ettiği bulgular (21) göz önüne

alındığında NO eksikliğinin oositlerde fizyolojik bozukluklara neden olduğu bunun da oositi dejenerasyona götürdüğü daha önce de ortaya konmuştur. Bu sonuçlar NO'nun oosit içinde, maturasyonu engellemekten başka, hayati fonksiyonlarda da rol alıyor olabileceğini işaret etmektedir. Değerlendirmeye alınmasa da, gözlemler sırasında saptanan anormal kutup cisimcikleri de yine Jablonka-Shariff'in daha önceki çalışmalarında elde ettiği verilerde yer almaktadır (22). LN grubu genel olarak değerlendirildiğinde L-NAME'nin maturasyonu belli bir süre boyunca tetiklediği ancak bu süreden sonra artan dejenerasyon oranlarının maturasyon oranlarının düşük kalmasına neden olduğu düşüncesindeyiz.

Hipotezimizde NOS aktivitesi ile gerçekleşen NO sentezinin maturasyonu engellediğini ne sürmüştük. Daha önce yapılan çalışmaların çoğunluğu, hipotezimizle çelişen şekilde, NOS inhibitörlerinin maturasyonu baskılayıcı yönde etkileri olduğunu sonucunu ortaya koymuştur. Bu sonuçların gözlem saatleri ile ilgili olup olamayacağını araştırdığımızda, NOS veya GC inhibe edilerek gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda, gözlem saatlerinin oldukça değerken olduğunu gördük. Farelerle alışan araştırmacılardan Jablonka-Shariff ve ark. 3,5 ile 16. saatlerde (88), Huo ve ark. 12 ile 14. saatlerde (94); sığırlarda alışan Bilodeau-Goeseels 3 ve 7. saatlerde (95) gözlem yaparken Viana ve ark. 24 ve 48. saatlerde (45), Tao ve ark. ise domuzlarda 44. saatte (21) değerlendirme yapmışlardır. Araştırmacılar deneylerinde de genellikle birbirlerinden farklı kültür medyumları kullanmışlardır. Tüm bu çalışmalarda süre sonunda NOS veya guanilat siklaz enzimi baskılanan grupların kontrole göre daha düşük GVBD oranlarına sahip oldukları gözlenmiştir.

Nakamura ve arkadaşları ise deneylerinde, 12. saate kadar her yarım saatte bir gözlem yapmışlardır. Araştırmacıların bulguları 12. saatte, hCG ve selektif iNOS inhibitörü AG'nin GVBD'yi tetiklediğini NO donörü SNAP'ın ise bu etkiyi engellediğini göstermiştir (23). Bu ve arkadaşları da, 5 saatlik deney sonucunda, kültüre SNP ekleyip hücre içi NO oranlarını arttırdıklarında maturasyonun engellendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca medyuma GC inhibitörü ODQ eklediklerinde, NO retimi olsun olmasın cGMP üretimi azaldığından maturasyonun tetiklendiğini göstermişlerdir (89).

Bizim çalışmamız 2'den 10'a kadar her ikinci saati ve 20 ile 24. saatleri de kapsadığı için, maturasyonun gidişatı üzerine daha ayrıntılı bilgi vermiştir. Çalışmamızda, LN grubunda 8. saate kadar hem GVBD hem dejenerasyon oranlarında kontrolle anlamlı bir fark oluşturmamıştır. İstatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük maturasyon ve yüksek dejenerasyon oranları ancak 20 ve 24. saatlerde saptanmıştır. L-NAME verilen gruptan elde ettiğimiz veriler hem Nakamura ve Bu'nun çalışmalarını doğrularken hem de 24 saatin sonunda kontrole göre düşük sonuç alan diğer araştırmacıların sonuçlarıyla çelişmemektedir.

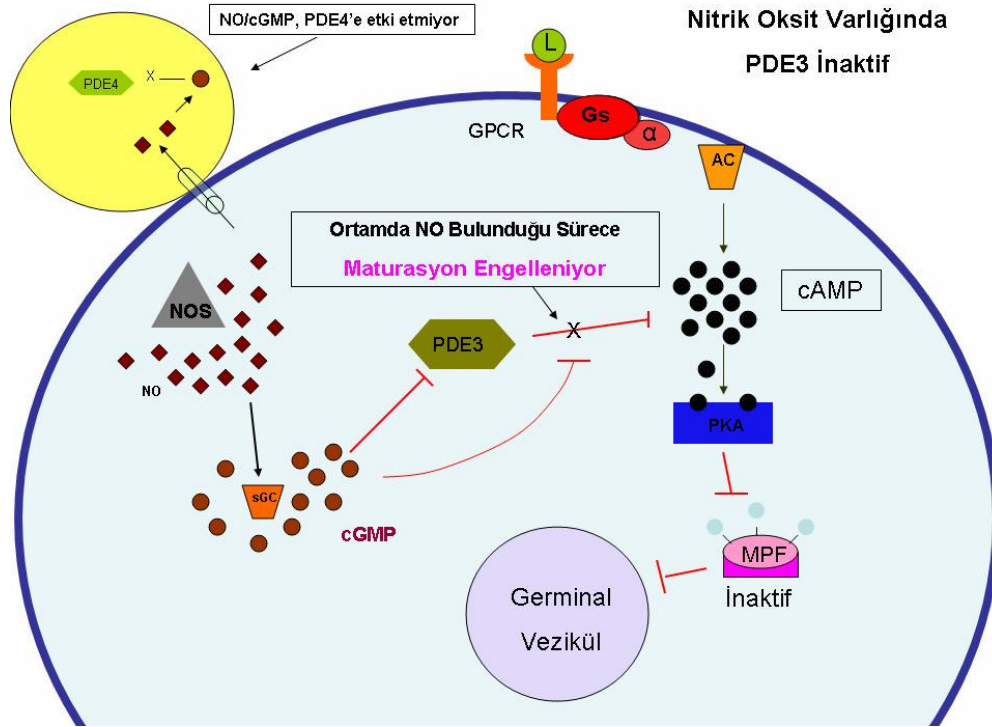
Literatür taramalarımızda, L-NAME ile hipoksantin bir arada verildiği bir yayına rastlamadık. Çalışmamızda, LN+HX grubunda maturasyon, 6. saate kadar başlamadığını gözlemledik. Diğer gruplar göz önüne alındığında bunun medyum içindeki hipoksantin maturasyonu baskılayıcı etkisinden kaynaklandığını söylemek mümkündür. 6. saate kadar, medyum içindeki L-NAME, oosit içi NO ve cGMP oranlarını düşürerek PDE3A üzerindeki baskılayıcı etkiyi azaltsa da hipoksantin, PDE3A'yı spesifik olarak inhibe etmeye devam ettiği için maturasyon gerçekleşmemiştir. Yalnızca L-NAME eklenen grupta aynı saatte anlamlı derecede yüksek GVBD ve maturasyon oranları elde edilirken HX+LN grubunda oranların düşük kalması NO'nun maturasyondaki etkisinin PDE3A üzerinden gerçekleştiğinin bir kanıtıdır. HX+LN grubunda, 6. saatten itibaren kontrol ve LN gruplarının deney başlangıcındaki artışına benzer şekilde gerçekleşen PI-MI geçişleri 10. saat civarında LN grubunu yakalamış ve deney sonunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile bir miktar üzerine çıkmıştır. Bu durumda 6. saatten sonra L-NAME'nin tetikleyici etkisinin, hipoksantin inhibitör etkisine baskın gelerek maturasyonu tetiklediği yorumu yapılabilir. Deney sonunda elde edilen verilerde, LN ile LN+HX grupları kendi aralarında, gerek GVBD oranları, gerekse dejenerasyonda istatistiksel olarak farklı sonuç vermezken kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklı sonuçlar almalarından yola çıkarak, LN+HX grubunda, maturasyon oranlarına etki eden faktörün L-NAME olduğu sonucunu çıkartabiliriz.

Elde ettiğimiz verileri toparlamak gerekirse, kültüre 1 mM L-NAME eklenen grupta maturasyonun 8. saate kadar, kontrol grubu ile benzer sonuçlar

vererek gerçekleştiğini ancak azalan NO seviyelerinin 8. saatten sonra oositlerde dejenerasyona neden olarak 24 saatin sonunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede dşuk oranda kaldığını saptadık. 4mM hipoksantin eklenen gruptaki oositler ise 24 saatin sonunda bile çok dşuk oranda maturasyon gerçekleştirerek GV aşamasında kalmıştır. Hipoksantin ve L-NAME'nin birlikte verildiği gruptaki oositler ise ilk 6 saat için hipoksantin grubu ile istatistiksel olarak aynı sonuçları verip GV aşamasında kalırlarken, deney sonunda L-NAME verilen grupla aynı olgunlaşma ve dejenerasyon oranları göstermiştir.

Deneyley sonunda, L-NAME tek başına kullanıldığında kontrol grubuna göre maturasyon oranlarında anlamlı bir artış olmamasına rağmen 8 saate kadar benzer sonuçlar vermesi ve hipoksantin ile birlikte kullanıldığı grupta, hipoksantin tek başına bulunduğu gruba kıyasla anlamlı şekilde yüksek oranda maturasyona neden olmasından yola çıkararak, L-NAME'nin maturasyonu tetiklediğini söyleyebiliriz. Bu da NO sentezinin maturasyonu engellediği hipotezimizi doğrulamaktadır. Bu engeleyici etkinin PDE3A üzerinden gerçekleştiğinin kanıtı da, LN+HX grubunda, PDE3A zerindeki NO kaynaklı baskı ortadan kalksa bile bu sefer de hipoksantin tarafından baskılanmaya devam ettiği için maturasyon geç başlamasıdır.

Daha önce verdiğimiz bilgiler ve elde ettiğimiz veriler işığında konuyu toplamak gerekirse, olgunlaşmamış oositlerde, NOS enziminin aktivitesiyle gerçekleşen NO retimi, guanilat siklazı uyararak cGMP sentezini arttırmakta; cGMP de oositlerde bulunan hakim PDE formu PDE3' baskılayarak oosit içi cAMP seviyelerini yüksek tutmaktadır. Yüksek oranda cAMP de MPP'yi inaktif halde tutarak maturasyonun başlamasını engeller. cGMP, oositteki PDE3A'yı baskımlarken, oositi çevreleyen granüloza hücrelerindeki PDE formu, PDE4D ile etkileşmemektedir. Bu durum hem oosit ile çevresindeki granüloza hücrelerinde neden farklı inhibitörlerle etkileşen farklı PDE formlarının bulunduğunu hem de maturasyon öncesinde cAMP oranınının neden oositte yüksekken ona bağlı granlozalarda dşuk olduğunu açıklamaktadır. Ayrıca, maturasyon öncesinde, cAMP seviyelerinin, neden granüloza hücrelerinde dşuk oositte ise yüksek olduğunu da açıklayabilmektedir.



Şekil 31: Deney sonunda elde ettiğimiz verilere göre nitrik oksitin oosit maturasyonundaki rolü.

(Hakan DARICI)

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, uzun yıllardır netleşmeyen maturasyon engelleyici mekanizmaların aydınlatılmasına ışık tutacak niteliktedir. Oosit maturasyonu ile ilgili mekanizmaların ortaya çıkarılması yalnızca eşey hücrelerinin bölünmesi ile ilgili bilgilerin netleşmesini sağlamayacak aynı zamanda infertil bireylere uygulanan yardımcı üreme tekniklerinin ve kültür ortamlarının da gelişimine katkıda bulunacaktır (3,6,9). Var olan doğum kontrol ilaçlarının yan etkileri oldukça yüksek olduğundan yalnızca oosit olgunlaşmasına etki eden ilaçlar bunlara karşı alternatif olarak geliştirilebilir (49). *In vitro* ve *in vivo* olgunlaştırılmış oositlerin gelişim kapasiteleri arasında büyük farklar bulunmaktadır (8). *In vitro* folikül kültür sistemlerini gelişmesi, yalnızca ovaryum fiziolojisi araştırmalarına büyük bir katkıda bulunmayacak, aynı zamanda da klinik uygulamalarda da yarar sağlayacaktır (29). Kültür çalışmalarında meydana gelecek gelişmeler, kadınlarda, oositlerin dondurularak saklanıp, menopoz sonrasında bile anne olabilmeleri ya da hiç sperm veya öncül hücresi olmayan

erkeklerin çocuk sahibi olması gibi dünyada pek çok çiftin arzuladığı ancak henüz mümkün olmayan durumlara olanak sağlayabilir (1).

Bulgularımız, oosit kültüründe NO sentezinin engellenmesinin ilk saatlerde maturasyonu tetiklediğini ancak ilerleyen saatlerde oositlerde artan dejenerasyon nedeniyle maturasyonun engellediğini göstermiştir. Ayrıca NO'nun maturasyona etkisinin, PDE3A üzerinden gerçekleştiği de ortaya konmuştur. Sonuç olarak, NO sentezinin, farelerdeki oosit maturasyonunda, cGMP sentezini artırarak PDE3A üzerinden maturasyonu engellediğini söyleyebiliriz.

Çalışmamız bu konuda yapılacak araştırmalarda, genel olarak izlenmesi gereken yolu göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda, NO/cGMP/cAMP yolağındaki ara mekanizmaların ve burada görevli çeşitli enzimler ile halkasal nükleotidlerin aktivitelerinin ayrıntılı şekilde incelenmesi, maturasyonu engelleyen sistemin tam olarak aydınlatılmasını sağlayacaktır.

## ÖZET

### Oosit Olgunlaşmasında Nitrik Oksitin Rolü

Memeli oositlerinde, mayoz bölünme erken embriyonik dönemde başlamasına rağmen, GV aşaması olarak da adlandırılan profaz I'den öteye gidemez. Oosit maturasyonu, oositin, hipofiz bezinden gelen LH dalgası ile mayozu devam etmesi olarak adlandırılabilir. Nitrik oksitin (NO), fare oosit maturasyonunda nasıl bir rol oynadığı halen tamamıyla aydınlatılmış değildir. Biz de çalışmamızda NO'nun maturasyondaki rolünün halkasal nükleotid fosfodiesterazlarla (PDE) ilgisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bunun için, 21-28 günlük farelerden topladığımız oositleri, hücre içi PDE aktivitesini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen farklı ajanlar içeren medyumlarda, aynı kültür şartlarında kültüre ettik. NO üreten NOS enzimini bloke etmek için 1 mM L-NAME (LN) kullandık. Oositteki hakim PDE izoformu PDE3A'yı baskılamak için 4 mM konsantrasyonda hipoksantin (HX) kullanıldı. Üçüncü bir deney grubu olarak HX ve LN içeren medyumların birebir orandaki karışımı kullanıldı (HX+LN). Kontrol grubuna ise hiçbir kimyasal eklenmedi. COC'lar 2, 4, 6, 8, 10, 20 ve 24. saatlerde incelenerek maturasyon aşamaları açısından değerlendirildi.

Deneyler sonucunda kontrol grubu en yüksek maturasyon oranını elde ederken, hipoksantin eklenen gruptaki oositler 24 saatin sonunda bile çok düşük oranda maturasyon gerçekleştirerek GV aşamasında kalmıştır. LN grubunda maturasyon, 8. saate kadar, kontrol grubu ile benzer şekilde yüksek oranlarda gerçekleşmiş ancak oositlerde meydana gelen dejenerasyon nedeniyle 24 saatin sonunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük oranda kalmıştır. HX+LN grubunda maturasyon ilk 6 saatte başlamazken deney sonunda LN grubunun değerlerine ulaştı. HX+LN grubunda, deneyin ilk altı saatinde HX grubundaki gibi sıfır olan maturasyon değerlerinin, deneyin ilerleyen saatlerinde L-NAME etkisiyle yükselmesi; fare oositlerinde, hücre içinde sentezlenen NO'nun, cGMP aracılığıyla PDE3A üzerinden maturasyonu geciktirdiğini ortaya koymuştur.

**Anahtar kelimeler:** Oosit maturasyonu, Oosit kültürü, Nitrik Oksit (NO), Nitrik Oksit sentaz, (NOS), halkasal nükleotid fosfodiesteraz (PDE)



## SUMMARY

### Role of Nitric Oxide on Oocyte Maturation

In mammalian oocytes, meiosis starts at the early embryonic period but becomes arrested at the prophase I stage which is also termed the GV stage. Oocyte maturation can be termed as the reinitiation of the meiosis following LH surge from the pituitary gland. The role of Nitric oxide (NO) on mouse oocyte maturation is not clarified yet. We aimed to investigate the role of NO if it's related with the cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) or not. Oocytes isolated from 21-28 days old mice and cultured in the same culture conditions with different agents which manipulate activity of PDE directly or indirectly. L-NAME (1 mM) was used to inhibit, NO producing enzyme, NOS. Hypoxanthine (HX) (4 mM) is used to inhibit PDE3A, dominant PDE form of the oocyte. A third group consisted of the 1:1 mixture of first two medium (HX+LN). No additives used in control group. Oocytes were examined at 2, 4, 6, 8, 10, 20 and 24<sup>th</sup> hours for the maturation stage.

Oocytes in HX medium showed very low maturation rates and stayed at GV stage at the end of the 24 hour while control oocytes reached maximum maturation rates. LN group oocytes matured like the control group until 8<sup>th</sup> hour but total maturation rate remained significantly low at the end of the experiment because of the high degeneration rates. Maturation didn't start at the HX+LN group for first six hour but reached the LN group at 24<sup>th</sup> hour. The increase of maturation rates at the HX+LN group with the effect of L-NAME after the sixth hour of the experiment which is zero before, showed that; intracellularly synthesized NO delays mouse oocyte maturation via inhibiting PDE3A with cGMP.

**Key words:** Oocyte maturation, Oocyte culture, Nitric Oxide (NO), Nitric Oxide Synthase (NOS), cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE).

## KAYNAKLAR

1. Gürer F, In Vivo ve In Vitro Koşullarda Oosit Maturasyonu, Hassa H, *İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları*. 087, 1. Baskı, Osmangazi Üniversitesi Basımevi. Eskişehir 2003:229-240
2. Pincus G, Enzmann EV, Can Mammalian Eggs Undergo Normal Development In Vitro? *Proc.N.A.S.* 1934; 20:121-122
3. Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte Maturation: The Coming Of Age Of A Germ Cell. *Semin Reprod Med.* 2005 Aug;23(3):234-41
4. Richard FJ, Tsafri A, Conti M. Related Articles, Role Of Phosphodiesterase Type 3A In Rat Oocyte Maturation. *Biol Reprod.* 2001 Nov;65(5):1444-51
5. Mehlmann LM. Stops And Starts In Mammalian Oocytes: Recent Advances In Understanding The Regulation Of Meiotic Arrest And Oocyte Maturation. *Reproduction.* 2005 Dec;130(6):791-9
6. Miyano T. In Vitro Growth Of Mammalian Oocytes. *J Reprod Dev.* 2005 Apr;51(2):169-76
7. Conti M, Andersen CB, Richard FJ, Shitsukawa K, Tsafri A. Molecular and Cellular Endocrinology 1998; 145: 9-14
8. Doktora Tezi “Sistemik, Otokrin Ve Parakrin Etkili B-Endorfin Ve Oosit/Embriyo Gelişim Medyumlarının Sıçan Preantral Foliküllerinin İn-Vitro Gelişimi Üzerindeki Etkileri” Ayla, Eker, SARIBOYACI, Danışman: Prof. Dr. Firdevs GÜRER, Eskişehir 2004
9. Cortvrint R, Smitz J. In Vitro Follicle Growth: Achievements In Mammalian Species. *Reprod Domest Anim.* 2001 Feb;36(1):3-9
10. J.B. Russel. Immature Oocyte Retrieval Combined With İn-Vitro Oocyte Maturation. Global Trends In Assisted Human Reproduction, *Human Reproduction*, Vol. 13, Supplement 3, Oxford University Press, 1998
11. Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME. Impact of Bovine Oocyte Maturation Media on Oocyte Transcript Levels, Blastocyst Development, Cell Number, and Apoptosis, *Biology Of Reproduction* 2000; 62, 355–364
12. Fan HY, Sun QY. Involvement Of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation And Fertilization In Mammals. *Biol Reprod.* 2004 Mar;70(3):535-47. Epub 2003 Nov 12
13. Lastro M, Collins S, Currie WB., Adenylyl Cyclases In Oocyte Maturation: A Characterization Of AC Isoforms In Bovine Cumulus Cells. *Mol Reprod Dev.* 2006 Sep;73(9):1202-10
14. Murthy KS, Zhou H, Makhlof GM, PKA-Dependent Activation Of PDE3A And PDE4 And Inhibition Of Adenylyl Cyclase V/VI In Smooth Muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Mar;282(3):C508-17
15. Mehlmann LM, Kalinowski RR, Ross LF, Parlow AF, Hewlett EL, Jaffe LA. Meiotic Resumption In Response To Luteinizing Hormone Is Independent Of A G(i) Family G Protein Or Calcium In The Mouse Oocyte. *Dev Biol.* 2006 Nov 15;299(2):345–55. Epub 2006

16. Aizawa T, Wei H, Miano JM, Abe J, Berk BC, Yan C. Role Of Phosphodiesterase 3 In NO/Cgmp-Mediated Antiinflammatory Effects In Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res.* 2003; 93(5):406-13. Epub 2003
17. Gao Y, Tolsa JF, Shen H, Raj JU. Effect Of Selective Phosphodiesterase Inhibitors On Response Of Ovine Pulmonary Arteries To Prostaglandin E2. *J Appl Physiol.* 1998 Jan;84(1):13-8
18. Manganiello V. Short-Term Regulation Of PDE4 Activity. *Br J Pharmacol.* 2002 Jun;136(3):339-40
19. Herring N, Zaman JA, Paterson DJ. Natriuretic peptides like NO facilitate cardiac vagal neurotransmission and bradycardia via a cGMP pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Dec;281(6):H2318-27
20. Yao J, Hiramatsu N, Zhu Y, Morioka T, Takeda M, Oite T, Kitamura M. Nitric oxide-mediated regulation of connexin43 expression and gap junctional intercellular communication in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jan;16(1):58-67. Epub 2004
21. Tao Y, Fu Z, Zhang M, Xia G, Yang J, Xie H. Immunohistochemical localization of Inducible And Endothelial Nitric Oxide Synthase In Porcine Ovaries And Effects Of NO On Antrum Formation And Oocyte Meiotic Maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Jul 30;222(1-2):93-103
22. Jablonka-Shariff A, Olson LM. The Role Of Nitric Oxide In Oocyte Meiotic Maturation And Ovulation: Meiotic Abnormalities Of Endothelial Nitric Oxide Synthase Knock-Out Mouse Oocytes. *Endocrinology.* 1998 Jun;139(6):2944-54
23. Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H, Kato H. Nitric Oxide Inhibits Oocyte Meiotic Maturation. *Biol Reprod.* 2002 Nov;67(5):1588-92
24. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: *CAB International*, 1994.
25. Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757
26. <http://www.colorado.edu/kines/iphy4480tsai/ovary.jpg> 10.06.2007
27. Moore KL, Persaud TVN, *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*, Nobel Tıp Kitapevleri, 6. Baskıdan Çeviri, 2002; 223–344
28. Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular And Molecular Mechanisms Regulating Oocyte Quality And The Relevance For Farm Animal Reproductive Efficiency, , *Rev. Sci. Tech. Off. İnt. Epiz.*, 2005, 24 (1), 413-423
29. Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact Of Various Endocrine And Paracrine Factors On In Vitro Culture Of Preantral Follicles In Rodents. *Reproduction* 2005; 130 147–156
30. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*. McGraw&Hill 10. Ed. 2003; 449-465
31. Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 1990; 33: 77-87
32. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, 398, Ankara, 2006;531-588

33. Mayes M. The meiotic arrest of bovine oocytes. Département des sciences animales Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Université Laval Québec PhD thés. De l'Université Laval, Québec Canada. 2002; 4-110
34. <http://www.gurganclinic.com.tr/index.php?sayfa=infertilite-ve-tup-bebek&konu=8-1>, 16.06.2007
35. Delilbaşı L. 10, *Tüp Bebek: Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuvar Yöntemleri*. Bayındır Sağlık, Eğitim ve Araştırma Vakfı, Ankara, 1997;102-103
36. Özçelik N. *Tıbbi Biyoloji*, 2. Baskı. Isparta, 2005: 57–64
37. Cooper GM, Hausman RE, The Cell, A Molecular Approach, 4. Ed. ASM Pres, Washington, USA. 2007; 603-641
38. Tsafirri A, Channing CP. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 1975; 43:149-52
39. Sorensen RA, Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 1976; 50: 531-6.
40. Kubelka M, Motlik J, Fulka JJ, Prochazka R, Rimkeviovka Z, Fulka J. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gam. Res.* 1988; 19: 423-431
41. Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *The Journal of Clinical Investigation* 2004; 114(2):196–205
42. Szollosi D, Calarco P, Donahue R. The nuclear envelope: its breakdown and fate in mammalian oogonia and oocytes. *Anat Rec* 1972; 174.
43. [http://darwin.bio.uci.edu/~bardwell/231B\\_2006\\_CC1.ppt](http://darwin.bio.uci.edu/~bardwell/231B_2006_CC1.ppt), 15.05.2007
44. Heikinheimo O, Gibbons WE. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Molecular Human Reproduction* 1998; 4(8):745–756
45. Viana, K.S, Caldas-Bussiere MC, Matta SGC, Faes MR, Paes de Carvalho CS, Quirino CR. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the *in vitro* maturation of bovine oocytes, *Anim. Reprod. Sci.* (2006), article in press.
46. Kubiak JZ, Weber M, de Pennart H, Winston NJ, Maro B. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *The EMBO Journal* 1993;12(10):3773-3778
47. Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels. *Biology of Reproduction* 2004;70:548–556
48. Masui Y., From Oocyte Maturation To The In Vitro Cell Cycle: The History Of Discoveries Of Maturation-Promoting Factor (MPF) And Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation*. 2001 Dec;69(1):1-17
49. Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafirri A. Role Of Cyclic Nucleotide Signaling In Oocyte Maturation. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Feb 22;187(1-2):153-9

50. Alberts B, Bray D. *Molecular Biology of The Cell*. 3<sup>rd</sup> Ed. Garland Science, NY. U.S.A. 1994.
51. [http://www.newsroom.ucla.edu/NewsReleaseImages/7113\\_images/7113a.jpg](http://www.newsroom.ucla.edu/NewsReleaseImages/7113_images/7113a.jpg), 15.05.2007
52. Conti M. Specificity of the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Signal in Granulosa Cell Function. *Biology of Reproduction* 2002;67:1653–1661
53. <http://www.answers.com/topic/cyclic-adenosine-monophosphate>, 15.05.2007
54. [http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclic\\_adenosine\\_monophosphate](http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclic_adenosine_monophosphate), 15.05.2007
55. Mayes MA, Sirard MA Effect of Type 3 and Type 4 Phosphodiesterase Inhibitors on the Maintenance of Bovine Oocytes in Meiotic Arrest. *Biology of Reproduction* 2002; 66:180–184
56. [http://www.chemistry.emory.edu/justice/seminar/images/fig\\_6.26.gif](http://www.chemistry.emory.edu/justice/seminar/images/fig_6.26.gif), 15.05.2007
57. Başaran A. *Tıbbi Biyoloji (Ders Kitabı)*, Güneş & Nobel Tıp Kitapevi. 6. Baskı, Bursa, 2002; 166-167
58. Bornslaeger EA, Schultz RM. Regulation Of Mouse Oocyte Maturation: Effect Of Elevating Cumulus Cell Camp On Oocyte Camp Levels. *Biology of Reproduction* 1985; 33:698-704
59. Dekel N, Sherizly I. Induction of maturation in rat follicle-enclosed oocyte by forskolin *Federation of European Biochemical Societies*. 1983; 151(1):153-156
60. Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanesi E, Lauria A, Gandolfi F. Role Of Intracellular Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Concentration and Oocyte-Cumulus Cells Communications on the Acquisition of The Developmental Competence During in Vitro Maturation of Bovine Oocyte. *Biology of Reproduction* 2004;70(2):465-72
61. Webb RJ, Bains H, Cruttwell C, Carroll J. Gap-Junctional Communication in Mouse Cumulus–Oocyte Complexes: Implications for the Mechanism of Meiotic Maturation *Reproduction* 2002; 123, 41–52
62. Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL et al. The Gs-Linked Receptor GPR3 Maintains Meiotic Arrest in Mammalian Oocytes. *Science*. 2004; 306(5703):1947-50
63. Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carroll J. Follicle-Stimulating Hormone Induces a Gap Junction-Dependent Dynamic Change in [cAMP] and Protein Kinase A in Mammalian Oocytes. *Developmental Biology* 2002; 246:441-454
64. Hammes SR. Steroids and Oocyte Maturation—A New Look at an Old Story. *Molecular Endocrinology* 2004; 18(4):769–775
65. Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M. The G-Protein-Coupled Receptors GPR3 and GPR12 are Involved in Camp Signaling and Maintenance of Meiotic Arrest in Rodent Oocytes. *Developmental Biology* 2005; 287(2):249-61
66. Freudzon L, Norris RP, Hand AR, Tanaka S, Saeki Y, Jones TLZ et al. Regulation of Meiotic Prophase Arrest in Mouse Oocytes By GPR3, a Constitutive Activator of the Gs G Protein. *The Journal of Cell Biology*, 2005; 171(2):255–265
67. Kalinowski RR, Berlot CH, Jones TLZ, Ross LF, Jaffe LA, Mehlmann LM. Maintenance of Meiotic Prophase Arrest in Vertebrate Oocytes by a Gs Protein-Mediated Pathway. *Developmental Biology* 2004;267:1-13

68. Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. Meiotic Arrest in The Mouse Follicle Maintained by a Gs Protein in The Oocyte. *Science*. 2002; 297(5585):1343–5.
69. <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:GPCR-Zyklus.png>, 18.05.2007
70. [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:GDP\\_chemical\\_structure.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:GDP_chemical_structure.png), 18.05.2007
71. [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:GTP\\_chemical\\_structure.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:GTP_chemical_structure.png), 18.05.2007
72. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. *Molecular Biology of The Cell*. 4<sup>th</sup> Ed. Garland Science, NY. U.S.A. 2002.
73. <http://www.cmpharm.ucsf.edu/bourne/images/rplusabg.jpg>, 20.06.2007
74. Mehlmann LM Oocyte-Specific Expression of Gpr3 is Required for the Maintenance of Meiotic Arrest in Mouse Oocytes. *Developmental Biology* 2005;288:397-404
75. Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP Signaling: New Phosphodiesterases and New Functions. *Current Opinion in Cell Biology* 2000; 12:174–179
76. Shitsukawa K, Andersen CB, Richard FJ, Horner AK, Wiersma A, van Duin M, Conti M. Cloning and Characterization of the Cyclic Guanosine Monophosphate-Inhibited Phosphodiesterase PDE3A Expressed in Mouse Oocyte *Biology of Reproduction* 2001; 65:188–196
77. [http://en.wikipedia.org/wiki/Guanylyl\\_cyclase](http://en.wikipedia.org/wiki/Guanylyl_cyclase), 21.05.2007
78. [cgm.blauplanet.com/adv/gc.html](http://cgm.blauplanet.com/adv/gc.html), 20.06.2007
79. Kılınc K, Kılınc A. *Nitrik Oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri*. Palme Yayıncılık, Ankara, 2004
80. Herring N, Rigg L, Terrar DA, Paterson DJ. NO-cGMP Pathway Increases The Hyperpolarisation-Activated Current, I<sub>f</sub> and Heart Rate during Adrenergic Stimulation. *Cardiovascular Research* 2001; 52:446–453
81. Musialek P, Rigg L, Terrar DA, Paterson DJ, Casadei B. Role of cGMP-inhibited Phosphodiesterase and Sarcoplasmic Calcium in Mediating the Increase in Basal Heart Rate with Nitric Oxide Donors. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:1831–1840
82. Al-Sa'doni H, Ferro A. S-Nitrosothiols: A Class of Nitric Oxide-Donor Drugs *Clinical Science*. 2000; 98:507–520
83. Feelisch M. The Use Of Nitric Oxide Donors in Pharmacological Studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1998; 358:113–122
84. Ramirez J, Yu L, Li J, Braunschweiger PG, Wang PG. Glico-S-Nitrosothiols, A Novel Class of NO Donor Compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1996; 6(21):2575-80
85. <http://www.merckbiosciences.co.uk/Products/ProductDisplay.asp?catno=362338&>, 23.05.2006
86. Tesfaye D, Kadanga A, Rings F, Bauch K, Jennen D, Nganvongpanit K et al. The Effect of Nitric Oxide Inhibition and Temporal Expression Patterns of the mRNA and Protein Products of Nitric Oxide Synthase Genes During In Vitro Development of Bovine Pre-implantation Embryos. *Reprod Dom Anim* 2006; 41:501–509

87. Jablonka-Shariff A, Basuray R, Olson LM. Inhibitors of Nitric Oxide Synthase Influence Oocyte Maturation in Rats. *J Soc Gynecol Invest.* 1999; 6(2):95-101
88. Jablonka-Shariff A, Olson LM. Nitric Oxide Is Essential for Optimal Meiotic Maturation of Murine Cumulus-Oocyte Complexes In Vitro. *Molecular Reproduction and Development* 2000; 55:412–421
89. Bu S, Xie H, Tao Y, Wang J, Xia G Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 223(1-2):85-93
90. Tao JY, Fu Z, Zhang ML, Xia G, Lei L, Wu ZL. Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxanthine-supplemented medium. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 2005; 89:38–44
91. Marshall SJ, Senis YA, Auger JM, Feil R, Hofmann F, Salmon G et al. GPIIb-dependent platelet activation is dependent on Src kinases but not MAP kinase or cGMP-dependent Kinase. *Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biolog.* 2004; 103(7):2601-9
92. Bhandari V, Johnson L, Smith-Kirwin S, Vigliotta G, Funanage V, Chander A. Hyperoxia and Nitric Oxide Reduce Surfactant Components (DSPC and Surfactant Proteins) and Increase Apoptosis in Adult and Fetal Rat Type II Pneumocytes. *Lung* 2003; 180:301–317
93. Srivastava S, Dixit BL, Ramana KV, Chandra A, Chandra D, Zacarias A et al. Structural and Kinetic Modifications of Aldose Reductase by S-Nitrosothiols. *Biochem. J.* 2001; 358:111–118
94. Huo LJ, Liang CG, Yu LZ, Zhong ZS, Yang ZM, Fan HY, Chen DY, Sun QY. Inducible Nitric Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide Regulates Germinal Vesicle Breakdown and First Polar Body Emission in the Mouse Oocyte. *Reproduction* 2005; 129:403–409
95. Bilodeau-Goeseels S. Effects of Manipulating the Nitric Oxide/Cyclic GMP Pathway on Bovine Oocyte Meiotic Resumption in vitro. *Theriogenology* 2007; article in pres.