

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***İN VİTRO* FERTİLİZASYON SÜRECİNDE
FARE OOSİT VE EMBRİYOLARINDAKİ
HÜCRE İSKELETİNDE MEYDANA
GELEN DEĞİŞİKLİKLER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Erkan GÜMÜŞ**

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. H. Eray BULUT**

**2008
SİVAS**

TUTANAK

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Programı yüksek lisans öğrencisi Erkan GÜMÜŞ'ün "**In Vitro Fertilizasyon Sürecinde Fare Oosit ve Embriyolarındaki Hücre İskeletinde Meydana Gelen Değişiklikler**" konulu yüksek lisans tez savunma sınavı için asıl jüri üyeleri 09.06.2008 tarihinde saat 10⁰⁰ da Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda toplanmıştır. Jüri üyelerinin kişisel raporları okunmuş ve bu raporların doğrultusunda tezin yüksek lisans tezi olarak yeterli olduğu kanısına varılmış, aday sorulan sorulara doğru yanıtlar vermiş ve tez oy birliği ile başarılı bulunmuştur.

Tez için hazırlanan jüri kişisel raporları ve sınavda adaya yöneltilen sorular ekte sunulmuştur.

Doç. Dr. Muhittin SÖNMEZ

Doç Dr. Celal KALOĞLU

Prof. Dr. Hüseyin Eray BULUT
Danışman Öğretim Üyesi

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05. 01. 1984 tarih ve 84/1 nolu kararı ile kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Hücre İskeleti ve Hücreyel Hareketlilik	3
2. 1. 2. Aktin Filamentlerin Yapısı ve Organizasyonu	4
2. 1. 2. 1. Aktin Filamentlerin Yapılanması ve Ayrışması	4
2. 1. 2. 2. Aktin Bağlayan Proteinler	6
2. 1. 2. 2. 1. Aktin Monomerlerine Bağlanan Proteinler	7
2. 1. 2. 2. 2. Aktin Filamentlerin Kep Proteinleri	7
2. 1. 2. 2. 3. Heterodimerik Kep Proteinleri	7
2. 1. 2. 2. 4. Aktin Filamentleri Ayıran (actin filament- severing proteins) Proteinler	8
2. 1. 2. 2. 5. Aktin Filamentlere Çapraz Bağlanan Proteinler	8
2. 1. 2. 2. 6. Aktin Filamentlerin Stabilizasyonunu ve Miyozin İle Olan İlişisini Düzenleyen Proteinler	9
2. 1. 2. 2. 7. Adaptör Proteinler	10
2. 1. 2. 3. Aktin Filamentlerin Hücredeki Yerleşimi ve Fonksiyonları	10
2. 1. 2. 4. Aktin Filamentlerin Plazma Zarı İle Bağlantıları	10
2. 1. 2. 5. Aktin, Miyozin Etkileşimi ve Hücre Hareketi	12
2. 1. 3. Ara Filamentler	13
2. 1. 3. 1. Ara Filament Proteinleri	13
2. 1. 3. 2. Ara Filamentlerin Yapılanması	14
2. 1. 4. Mikrotübüller	16
2. 1. 4. 1. Mikrotübüllerin Yapısı, Yapılanması ve Dinamik Kararsızlığı	16
2. 1. 4. 2. Mitoz Sırasında Mikrotübüllerin Yeniden Düzenlenmesi	18
2. 1. 4. 3. Mikrotübül İlişkili Proteinler (MAP)	18

2. 1. 4. 3. 1.	Mikrotübül Stabilize Eden MAP'lar	19
2. 1. 4. 3. 2.	Mikrotübül Destabilize Eden MAP'lar	19
2. 1. 4. 4.	Mikrotübül Motor Proteinleri ve Hareket	20
2. 1. 4. 5.	Mikrotübüllerden Oluşan Yapılar	22
2. 1. 4. 5. 1.	Sil ve Kamçılar ve Hareketleri	22
2. 1. 4. 5. 2.	Bazal Cisim ve Sentiollerin Yapısı	23
2. 2.	Ovaryum	23
2. 2. 1.	Oositlerin Doğum Öncesi Olgunlaşması (Prenatal Maturation)	24
2. 2. 2.	Oositlerin Doğum Sonrası Olgunlaşma (Postnatal Maturation)	24
2. 2. 3.	Foliküler Faz	25
2. 2. 4.	Folikülogenezis	25
2. 2. 4. 1.	Primordial Folikül Seçilimi	25
2. 2. 4. 1. 1.	Primordial Folikül	27
2. 2. 4. 2.	Primer Folikül Gelişimi	27
2. 2. 4. 2. 1.	Primer Folikül	27
2. 2. 4. 2. 2.	Sekonder Folikül	27
2. 2. 4. 2. 3.	Antral (Graff) Folikül	28
2. 2. 5.	Ovulasyon	29
2. 2. 6.	Fertilizasyon	29
2. 3.	Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT)	30
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	34
3. 1. 1.	Kullanılan Cihazlar	34
3. 1. 2.	Kimyasal Maddeler	35
3. 2.	Süperovulasyon	36
3. 2. 1.	Gonadotropinlerin Hazırlanışı	36

3. 2. 2.	Gonadotropinlerin uygulama zamanı	36
3. 3.	Medyum ve Kullanılan Enzimlerin Hazırlanması	37
3. 3. 1.	M2 Medyumunun Hazırlanması	37
3. 3. 2.	M16 Medyumunun Hazırlanması	37
3. 3. 3.	Hyaluronidase Solüsyonunun Hazırlanması	37
3. 4.	Oositlerin Toplanması ve Kültürü	37
3. 4. 1.	Oositlerin Toplanması Ve İn Vitro Maturasyonu	37
3. 4. 2.	Fare Yumurtalarının İn Vitro Fertilizasyonu	38
3. 5.	Oosit ve Zigotların Fiksasyonu ve İmmünboyanması	40
4. BULGULAR		42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ		57
6. ÖZET		63
7. SUMMARY		65
8. KAYNAKLAR		67
YEREL ETİK KURUL KARARI		76

ANNE'ME VE BABAM'A

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince verdikleri destek ve önerilerle bana rehberlik eden danışman hocam Prof. Dr. Hüseyin Eray Bulut ve Histoloji-Embriyoloji A.D öğretim elamanı hocam Doç. Dr. Celal Kaloğluna teşekkür ederim.

Bilgi birikimlerinden yararlandığım ve desteklerini her zaman hissettiğim Histoloji-Embriyoloji A.D öğretim elamanları Prof. Dr. Emel Koptagel ve Doç. Dr. Serpil Ünver Saraydın' a ayrıca başım her şıkıştığında bana zaman ayıran, katkı ve yorumlarıyla destek olan Tıbbi Biyoloji öğretim elemanı hocam Yrd. Doç. Dr. İzzet Yelkovan'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana zamanını, enerjisini, bilgi birikimini aktarmaktan hiç kaçınmayan ve zaman zaman yaşadığım umutsuzluklarda umut kapılarını açan dostum Meral Yılmaz ve kısa zamanda vazgeçilmezlerimden olan dostum Gonca Dönmez'e sabır, katkıları ve varlıkları için çok teşekkür ederim.

Fikirleriyle hayatıma yön veren, hayatı ve insanları sevmeyi öğreten, dünyaya herkesin bakamayacağı pencerelerden bakmam konusunda rehberim olan uzaklarda olsa da gönül birlikteliğimizin devam ettiği ağbeyim, canım dostum Nihat Çeliktürker'e teşekkür ederim.

Yaşamımda olmadıkları zamanda bile varlıklarını hissettiğim, yaşamım boyunca nefes aldıkları sürece arkamda güçlü birer omuz olacak olan, yüreklerindeki sevgiyi ve bana olan inançlarını hissetmekten onur duyduğum sevgili dostlarım Soner Gönül, Ayşegül Arslan ve Olgaç Güven'e varlıkları ve huysuzluklarıma rağmen yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olacaklarını bildiğim sıkıntılarım sıkıntıları, zorluklarım zorlukları, yaşadığım en ufak mutlukta dünyalar onların olan, bana sevmeyi öğreten ve yaptığım her işi insanlar için yapmamı öğütleyen birçok şeyle beraber varlığımı borçlu olduğum canım annem ve babam, Sevim ve Yaşar Gümüş'e ve çıkarsız sevgilerini her zaman yürekten hissettiren kardeşlerim Emine ve Nida Gümüş'e teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	Bir aktin filamentinin görünümü	5
Şekil 2	A. Aktin molekülünün polimerizasyonu ve depolimerizasyonu. B. Sarmal şeklindeki bir polimerde aktin moleküllerinin A-B birbiriyle ilişkisi	6
Şekil 3	Ara filamentler ve yapıları	14
Şekil 4	Ara Filamentlerin yapılanması	15
Şekil 5	Bir mikrotübül yapısı ve yeniden yapılanması	17
Şekil 6	Folikül gelişimi	26
Şekil 7	GV, GVBD, MII evresinde oositler ve IVF sonrası elde edilen preimplantasyon embriyolarının stereomikroskop görüntüleri.	44
Şekil 8	Fare oositlerinin mayotik maturasyonu süresince ve preimplantasyon embriolarında kromatin yapıları.	46
Şekil 9	İmmatür oositlerde DNA, mikrotübül ve mikrofilamentlerin floresan mikroskop görüntüleri.	48
Şekil 10	MII evresindeki olgun oositlerde, DNA, mikrotübül ve mikrofilamentlerin floresan mikroskop görüntüleri.	50
Şekil 11	İki hücreli embriyolarda, DNA, mikrotübül ve mikrofilamentlerin floresan mikroskop görüntüleri.	52
Şekil 12	Dört ve sekiz hücreli embriyolarda, DNA, mikrotübül ve mikrofilamentlerin floresan mikroskop görüntüleri.	54
Şekil 13	Blastosistlerde, DNA, mikrotübül ve mikrofilamentlerin floresan mikroskop görüntüleri.	56

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hücre iskeletini hücre içindeki bulunuş yerleri ve şekilleri farklı olan üç tip filament meydana getirir. Bunlar; mikrotübüller, ara filamentler ve mikrofilamentler (aktin filamentleri) dir. Bu filamentlerin hepsi farklı protein alt birimlerden meydana gelmiştir; mikrotübüller: tubulin (α , β , γ), ara filamentler; vimentin veya lamin ve aktin filamentler; aktin (globüler-G-aktin ve filamentoz-F-aktin) gibi proteinler tarafından meydana getirilirler (1).

Germ hücrelerinin gelişimi, fertilizasyonu ve erken embriyo gelişiminde hücre iskeletinin çok önemli fonksiyonlar üstlendiği düşünülmektedir.

Oosit maturasyonu, oositin yaşayabilmesi, fertilize olabilmesi ve gelişmeye yönelik yetenek kazanması için bir seri nükleer ve sitoplazmik değişikliğin olduğu kompleks bir süreçtir. Bu süreç için öncelikle nükleer maturasyon gerçekleşmelidir. Nükleer maturasyon, germinal vezikülün bozulması ve I. polar cisimciğin oluşmasının ardından, mayozun şekillenebilmesi için kromozomların ayrılması ve yeniden organize olmasını içerir (2). Oositin sitoplazmik organellerinin yeniden organizasyonu ile beraber nükleer bölünmeyi gerçekleştirebilmesi ise büyük ölçüde mikrotübül ve aktin filamentlerin kapsamlı olarak yeniden düzenlenmeleriyle gerçekleşir (3).

Oositin büyümesi, maturasyonu ve fertilizasyonu için organellerin aktif şekilde hareket etmesi ve doğru biçimde konumlanması gereklidir. Yapılan çalışmalarda, oositlerde büyüme sırasında organellerin hücre korteksine doğru hareket ettiği ve organel zonu denilen bir tabakalanma meydana getirdiği, oositin maturasyonu sırasında ise yeniden merkeze doğru çekilip olgun oositin korteksinde organelden fakir bir zonun yeniden meydana geldiği gözlenmiştir. Endoplazmik retikulum, Golgi ve mitokondrinin hücre içindeki hareketi mikrotübül ve mikrofilamentler aracılığıyla gerçekleştiği birçok omurgasız canlının oositinde gösterilmesine karşın, memeli yumurtalarında, oosit gelişimi, fertilizasyonu ve erken embriyo gelişimi sürecinde bu organellerin göçünde rol oynayan mekanizmalar bilinmemektedir (3 - 7).

Mikrofilamentlerin hücre korteksinin yapısına katılıp hücrenin yüzey gerilimini yarattığı ve bunun yanısıra hücrenin şeklinin devamlılığında fonksiyon gördüğü bilinmektedir. Fertilizasyon sırasında, sperm ve oosit arasındaki etkileşim mikrovilusların uç kısmında gerçekleştiğinden aktin filamentin sperm ve oosit bağlanması ve birleşmesinde görev alabileceği düşünülmektedir (2).

Fertilizasyon sonrasında embriyo gelişimi, vücudun eksenini belirleyen polaritenin kurulmasına bağlıdır. Birçok organizmada oosit, oogenez sürecinde kazandığı animal ve vegetal kutuplara sahiptir ve bu kutuplar embriyonik kutbun oluşmasına hizmet eder (4).

Oosit polarizasyonu, maternal determinantların, oositte nerede lokalize olacağını belirler ve böylece blastomerin kaderini tayin eder. Hücre polaritesi ise hücre iskeleti kökenli polar transport aracılığıyla kurulur (3).

Hücrede oldukça yaşamsal fonksiyonlar üstlenen hücre iskeleti elemanlarının germ hücrelerinin maturasyonu, fertilizasyonu ve erken embriyo gelişimi sürecinde üstlendikleri roller hakkındaki bilgiler sınırlıdır (8). Bu çalışmada *in vitro* fertilizasyon süresince hücre iskeletinde meydana gelen değişikliklerin immünfloresan yöntemler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Hücre İskeleti ve Hücresel Hareketlilik

Birçok organizmada hareketlilik kendi başına hayatını sürdürebilmek için gereklidir. Örneğin sperm hareketliliği olmasa fertilizasyon gerçekleşmez ve fertilize olan yumurta tek hücre evresini geçemezdi. Hücre şeklinde ve hücre göçünde aktif değişiklikler olmasaydı embriyo şekillenemezdi. Eğer hücre hareketliliği olmasaydı beyaz kan hücreleri inflamasyon alanlarına göç edemez ve mikroorganizmalarla mücadele edemezdi. Aksonlarda ve büyük bitki hücrelerinde aktif ve hızlı organel taşınımı olmasaydı bu hücrelerin periferel bölgeleri gelişemezdi (9). Yapısal görevlerinin yanı sıra hücre hareketliliğinden sorumlu olan temel yapı hücre iskeletidir. Tüm ökaryot hücrelerde sitoplazmaya doğru yayılan protein filamentleri ağından oluşan hücre iskeleti ile daha ileri düzeyde bir organizasyon sağlanır. Hücre iskeleti hücre için yapısal bir çerçeve sağlamanın yanı sıra hücre şeklini ve sitoplazmanın organizasyonunu belirleyerek hücreye sağlamlık ve dayanıklılık sağlar. Hücre iskeleti hücrelerin sadece bütünsel hareketlerini değil, aynı zamanda organellerin ve diğer bazı yapıların (mitotik kromozom gibi) sitoplazma içinde taşınması, fagositoz, sitokinez, hücre şeklinin değişimi, hücrenin polaritesinin belirlenmesi ve hatta hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks (ECM) yapışmasından sorumlu temel yapılardır (10, 11). Hücre iskeleti, adının çağrıştırdığı kadar sert ve değişmez bir yapı değildir. Bunun yerine, örneğin hücre bölünmesi sırasında hücrelerin hareket etmesi ve şekil değiştirmesi için sürekli yeniden düzenlenen dinamik bir yapıdır (10, 12, 13).

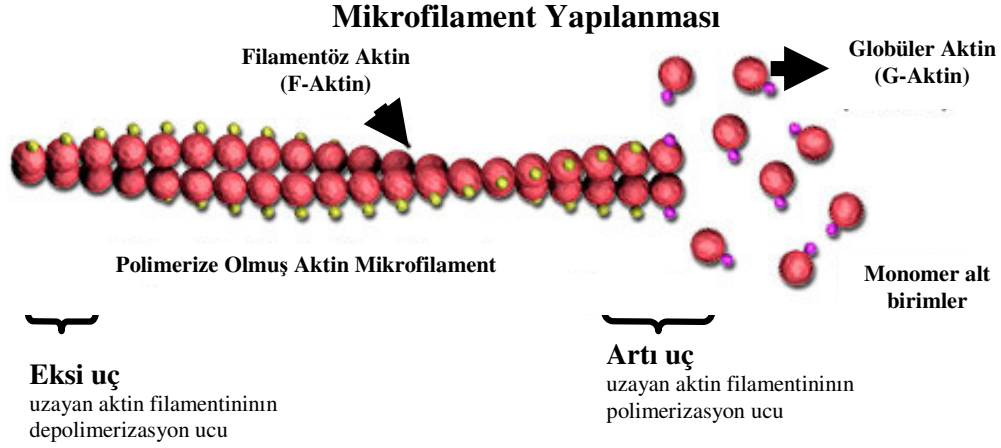
Hücre iskeleti bileşenleri ilk defa elektron mikroskobu kullanılarak tanımlanabilmiştir. İlk çalışmalarda sitoplazmik “kablolar” olarak tanımlanan hücre iskeleti üç farklı boyda sınıflandırılmıştır (12). Aktin filamentleri (mikrofilament) 7 nm çapında, ara filamentler (intermediyer filamentler) 10 nm çapında ve mikrotübüller 25 nm çapındadır ve bu filamentlerin hepsi farklı protein alt birimlerden meydana gelmiştir. Bu filamentler birarada bulunurlar ve çok sayıda aksesuar protein aracılığı ile hücre içi organeller ve plazma zarı ile bağlantılıdır (1, 10, 12, 13).

2. 1. 2. Aktin Filamentlerinin Yapısı ve Organizasyonu

Pekçok hücre tipi için ana hücre iskeleti proteini aktindir. Aktin proteini polimerleşerek 7 nm çapında ve birkaç mikrometre uzunluğunda aktin filamentlerini oluştururlar. Aktin filamentlerinin biraraya gelmesi, ayrılması, paketler ve birbirleri ile çapraz bağlantılar yapmaları ve plazma zarı gibi diğer hücrel yapılar ile etkileşimleri çok sayıda aktin bağlayan protein ile düzenlenir. Bu proteinler, hücrel aktin filamentlerinin organizasyonu ve dinamiklerini düzenleyen yardımcı proteinlerdir. Aktin filamentleri plazma zarının hemen altında; mekanik destek sağlayacak, hücre şeklini belirleyecek ve hücrelerin yüzey hareketlerinin gerçekleştirilmesine böylece hücrelerin göç etmesi, partikül alması ve bölünmesine olanak sağlayacak bir ağ oluşturur (9, 10).

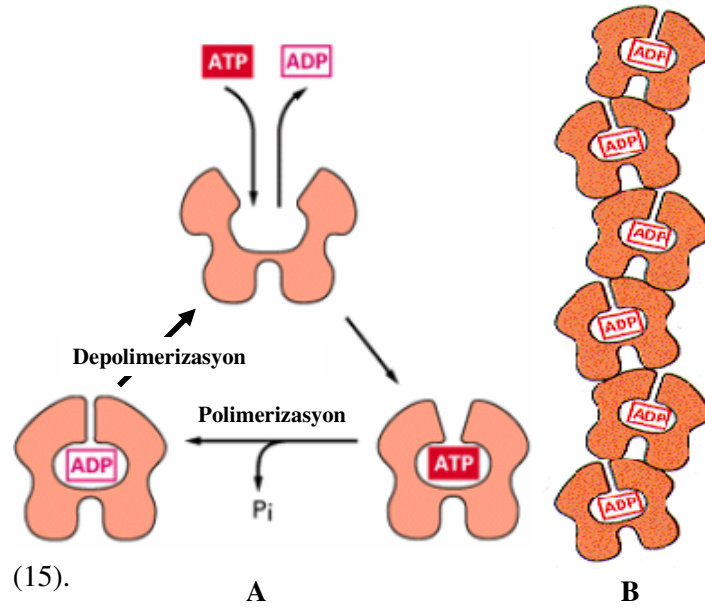
2. 1. 2. 1. Aktin Filamentlerinin Yapılanması ve Ayrışması

Aktin ilk olarak 1942 yılında kas hücrelerinden izole edilmiştir. 1960 ların sonunda kas hücreleri dışındaki hücrelerde de tespit edilmiştir. Bin dokuz yüz yetmiş li yıllardan günümüze her yıl 2 veya daha fazla yeni aktin bağlayan protein keşfedilmektedir. Bu nedenle başlangıçta yalnızca kas kasılması ile ilişkili olduğu düşünülen aktin filamentlerinin, günümüzde tüm ökaryot hücrelerinde en çok bulunan protein (toplam proteinin %5-10'u) olduğu ortaya çıkmıştır. Memelilerde en az altı farklı aktin geni vardır: bunlardan dördü farklı kas tiplerinde eksprese edilirken (α ve β izoformları), ikisi kas dışındaki hücrelerde eksprese olur (γ ve δ izoformları) (9). Aktin molekülleri 375 amino asitlik (42-47 kd) globüler proteinlerdir. Aktin monomerleri (globüler [G] aktin), filamentler şeklinde polimerize olarak filamentöz (F) aktini oluşturur. Her aktin monomeri filament içinde 166° dönerek çift-iplikli bir sarmal oluşturur. Bütün aktin monomerleri aynı yönde eklendikleri için, aktin filamentlerine polar bir yapı kazandırarak farklı iki uca sahip olmalarına neden olurlar. Bu uçlar; görel olarak hareketsiz ve yavaş büyüyen eksi (-) uç ile hızlı büyüyen artı (+) uçlardır (9, 10). [Şekil 1. (14)].



Şekil 1. Bir aktin filamentininin görünümü (14)

Aktin polimerleşmesinin ilk basamağı (nükleasyon) üç aktin monomeri içeren küçük bir birikim oluşumudur. Oluşan bu birime her iki uçtan ters olarak monomerlerin eklenmesi ile aktin filamentleri büyür. Aktin monomerleri aynı zamanda K^+ ve Mg^{++} varlığında ATP'ye de bağlanır. ATP mengene şeklinde olan bir aktin monomerinin iki yarımı arasında kalan yarı kısma bağlanır. Aktin polimerize olurken, her iki yarım ve diğer alt ünitenin arka kenarında bulunan amino asitler birbiriyle etkileşerek molekül kapanır. ATP hidroliziyle oluşan ADP molekül içinde tutulur ve filament depolimerize olana kadar burada kalır (1). ATP bağlanması ve hidrolizi, aktin filamentlerinin yapılanmasının düzenlenmesinde ve dinamik davranışlarında önemli bir rol oynar. Aktin polimerleşmesi geri dönüşümlüdür ve filamentler, aktin alt birimlerinin ayrılması ile depolimerize olur [(Şekil 2) (15)]. Böylece aktin monomerleri ve filamentleri arasındaki denge korunur. Aktin filamentlerinin iki ucu farklı oranlarda büyür, monomerlerin hızlı büyüyen uca (+) eklenmesi, yavaş büyüyen (-) uca eklenmesine göre beş ila on kat daha hızlıdır.



Şekil 2.

A. Aktin molekülünün polimerizasyonu ve depolimerizasyonu.

B. Sarmal şeklindeki bir polimerde aktin moleküllerinin birbirleriyle ilişkisi

Çünkü ATP-aktin ADP-aktine göre daha az ayrışır, bu her iki uçta polimerizasyon için gerekli olan monomerlerin kritik konsantrasyonlarının farklı olmasına neden olur. Bu fark, yürüme (treadmilling) olarak bilinen bir fenomen ile sonuçlanır. Yürüme için ATP gereklidir ve ATP-aktin filamentinin artı ucuna eklenirken, ADP-aktin eksi uçtan ayrışır. Yürümenin hücredeki rolü tam olarak bilinmemesine karşın hücrelerin hareket etmesinde veya şekil değiştirmesinde aktin filamentlerinin polimerizasyonu ve depolimerizasyonunu gerektirdiğini ortaya koyan çalışmalar vardır (10).

2. 1. 2. 2. Aktin Bağlayan Proteinler

Hüresel aktin filamentlerinin organizasyonu ve dinamikleri çok sayıdaki yardımcı proteinlerle düzenlenir. Bu proteinler, monomerlere bağlanan, filamentleri ayıran, filamentlere çapraz bağlanan, filamentleri stabilize eden ve filamentler boyunca hareket eden proteinler olarak gruplanırlar (9).

2. 1. 2. 2. 1. Aktin Monomerlerine Bağlanan Proteinler

Hücrede polimerize olmamış aktin monomerlerin toplanmasını kontrol etmek amacıyla beraber çalışan proteinlerdir (9).

B-Timosin: ATP-aktin monomerlerine, ADP-aktin monomerlerinden daha yüksek bir afinite ile bağlanırlar. Polimerize olmamış aktin monomerlerinin temel düzenleyicileridir ve sitoplazmadaki serbest G-aktin monomerlerinin bir araya gelip birikimler oluşturması için gereklidirler (9, 17).

ADF/kofilin (aktin depolimerize edici faktör): ADP-aktin monomerlerine ATP-aktin monomerlerinden daha yüksek bir afinite ile bağlanan ökaryotik bir proteindir. Böylece filament ayrışması sonrasında aktin monomerlerine bağlı kalır ve onları ADP-bağlı formda tutarak, filamentte yeniden bağlanmasını engeller (9, 10).

Profilin: Bütün ökaryotik hücrelerde bulunan bu protein kofilinin etkisini geri dönüştürür ve aktin monomerlerinin filamentte bağlanmasını uyarır. Profilin, ADP bağlı formun ATP bağlı form ile değişmesini uyararak etki gösterir. Aktin/ATP monomerlerinin oluşması sonucunda, aktin kofilinden ayrılır ve filamentinin yapılanmasına katılmaya hazır hale geçer (10).

2. 1. 2. 2. 2. Aktin Filamentlerin Kep Proteinleri

Kep proteinleri aktin filamentlerin ya (+) ya da (-) uçlarına bağlanır. Bağlandığı uca bağlı olarak alt birimlerin ayrılmasını ya da eklenmesini bloklar. Bu proteinlerin birçoğu yeni filamentlerin düzenlenmesini uyarır (9).

Gelsolin: Gelsolin ailesine ait proteinler, benzer şekilli ancak farklı sıralı ve fonksiyonlu 6 domaine sahiptir. Aktin filamentlerin (+) ucuna bağlanarak Ca^{++} moleküllerini yakalar ve aktin altbirimlerinin hem ayrılmasını hem de birleşmesini bloklarlar (9, 12).

2. 1. 2. 2. 3. Heterodimerik Kep Proteinleri:

Yaklaşık 30 kD'luk iki alt birim içerirler. Ca^{++} bağımsız olarak (-) uca bağlanırlar ve küçük aktin oligomerlerini stabilize ederek (+) ucun nükleasyonunu desteklerler. Ökaryotik hücrelerin hepsinde bulunan bu proteinin, çizgili kasta Z diskindeki aktin filamentlerinin (-) ucunda kep oluşturduğu düşünülmektedir (9).

Arp 2/3 Kompleksi: 7 alt birim içeren ve aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde görev alan proteinlerdir. Arp 2/3 kompleksi ana aktin filamentine (+) ucuna yakın bir yerinden bağlanır ve ana filamentten 70° lik bir açıyla ayrı yeni bir filamentin büyümesini başlatır. Her ökaryotik hücrede bulunan bu kompleks aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini düzenleyerek, hücre hareketi, fagositoz ve yağ veziküllerinin hücre içi taşınması gibi süreçlerde önemli roller üstlenir (17).

Tropomodulin: Kas, kırmızı kan hücreleri ve yüksek organizasyonlu canlıların diğer hücrelerinde stabil aktin filamentlerinin (+) ucuna kep oluşturan proteinlerdir. Bu proteinlerin aktin filamentlere bağlanabilmesi için tropomiyozine gereksinimleri vardır (9).

2. 1. 2. 2. 4. Aktin Filamentlerine Ayıran (actin filament-severing proteins) Proteinler

Gelsolin, fragmin/severin ve ADF/Kofilin aynı zamanda aktin filamentleri küçük fragmentlere ayıran proteinlerdir. Gelsolin ve fragmin/severin Ca^{++} bağımlı ayırma aktivitesi gösterir. ADF/Kofilinler ise Ca^{++} dan bağımsız olarak filamentlere ADP-aktin altbirimlerinden bağlanarak filamentlerin helikal düğümlerinde değişiklikler yaratıp depolimerizasyon ve ayrılmaya neden olur (9).

2. 1. 2. 2. 5. Aktin Filamentlerine Çapraz Bağlanan Proteinler:

Çapraz bağlantıya katılan aktin-bağlayan proteinlerin hepsinde aktine bağlanan en az iki bölge vardır. Bu bölgeler, onların aktine bağlanmalarını ve iki farklı aktin filamenti arasında çapraz bağlantı yapmalarını sağlar. Aktin filamentlerinin ağırlar şeklinde oluşumunu düzenleyen proteinler, aktin filamentlerine dikey çapraz bağlantılar yapabilen büyük esnek proteinlerdir. Demetlerdeki aktin filamentlerine çapraz bağlanan proteinler ise genellikle filamentleri birbirlerine yakınlaşmaya zorlayan küçük katı proteinlerdir. Aktin filamentlerine çapraz bağlanan proteinler; fimbrin, spektrin, distrofin, filamin ve α -aktinindir (9, 10).

Fimbrin: İki komşu aktin-bağlayan bölgesi olan 68 kD'luk bir proteindir. Aktin filamentlerine monomerik olarak bağlanır ve iki paralel filamenti birbirine yaklaştırır (9).

α -aktinin: Aktine dimerik olarak bağlanır, 102 kD'luk bir proteindir ve her bir alt birimin tek bir aktin-bağlanma bölgesi vardır. Bu nedenle, α -aktinin ile çapraz bağlantı yapan filamentler arasında, fimbrine nazaran çok daha büyük mesafe vardır (9).

Filamin: ABP-280 (Aktin bağlayan protein) olarak da adlandırılır. Aktine 280 kd luk alt birimden oluşan bir dimer olarak bağlanır. Filamin gevşek üç boyutlu bir tabaka yaratarak, ortogonal aktin filamentleri arasında çapraz bağlantılar oluşturur. Bu tip aktin filament ağları, plazma zarının temelini oluşturur ve hücre yüzeyine destek olur (9).

Spektrin: Plazma membranının iç yüzeyinde pentagonal ya da hegzogonal düzenlenim gösteren bir hücre iskeleti proteindir. Eritrositlerin kortikal iskeletinin yapısal temelini oluşturan aktin-bağlayan ana proteindir (10).

Distrofin: Spektrin gibi kas hücresi plazma zarındaki transmembran proteinler ile aktin filamentleri arasındaki bağlantıyı oluşturur. Bu transmembran proteinler, kas kasılması sırasındaki hücre kararlılığında önemli rol oynayan, hücre dışı matriks ile hücre iskeleti arasındaki bağlantıları da sağlar (10).

2. 1. 2. 2. 6. Aktin Filamentlerinin Stabilizasyonunu ve Miyozin İle Olan İlişisini Düzenleyen Proteinler:

Tropomiyozin, nebulin ve kaldesmon aktin filamentlerinin yan kolları boyunca bağlanan proteinlerdir.

Tropomiyozin: Aktin filamentlerinin oluşturduğu oluğa uzunlamasına bağlanan proteinlerdir. Çizgili kasta gerilme kuvvetini artırır. Aynı zamanda aktin ve miyozinin ilişkisini kontrol eden Ca^{++} duyarlı düzenleyici mekanizmanın temel bileşenidir (9).

Nebulin: Aktin ile bağlanır ve aktin filamentlerinin uzunluklarını belirler. Bu sayede aktin filamentlerinin yapılanmasını kontrol ettikleri düşünülmektedir (10).

Kaldesmon: Fonksiyonu hakkında çok bilgi olmamasına karşın, düz kas hücreleri ve kas hücresi dışındaki hücrelerde, tropomiyozinlerle birlikte aktin-miyozin ilişkisinin Ca^{++} -kaldesmon duyarlı düzenleyici formunu oluştururlar. Ayrıca mitoz süresince aktin filamentlerinin yeniden organize olmasında rol aldıkları düşünülmektedir (9).

2. 1. 2. 2. 7. Adaptör Proteinler

Hayvan ve mantar hücreleri, aktin ve diğer proteinler (özellikle Rho ailesinin küçük GTP bağlayan proteinleri ve diğer sinyal proteinleri) arasında adaptör olarak fonksiyon gören çok domainli proteinler kullanırlar. Yapılan genetik çalışmalarda bu proteinlerin aktin temelli fonksiyonlarla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin çok domainli WASp proteini eksikliğinde immünyetmezlik ve kanama bozuklukları şeklinde seyreden Wiskott-Aldrich sendromu gözlenir. WASp'ın C terminal domaini Arp 2/3 kompleksini aktive eder ve var olan filamentlerin yan kısımlarında yeni aktin filamentlerin nükleasyonunu sağlar (9).

2. 1. 2. 3. Aktin Filamentlerinin Hücredeki Yerleşimi ve Fonksiyonları

Aktin filamentleri, hücre içinde kontraktıl halka, stres fibrilleri, hücre adhezyon kemeri ve hücre korteksi gibi labil ve mikrovillus ve sarkomer gibi stabil yapıların oluşumuna katılırlar.

2. 1. 2. 4. Aktin Filamentlerinin Plazma Zarı İle Bağlantıları

Aktin filamentleri, hücre zarının hemen altında yani hücre korteksinde çok yoğun bir ağ oluşturur. Bu ağın yapısı içerisindeki, aktin-bağlayan proteinler ve bu proteinlerin aktin filamentlerine bağlanma şekilleri, o hücrenin şeklinde, hareketinde ve bunların yanısıra fagositoz, sitokinez gibi çok sayıda hücre yüzey aktivitesinde belirleyicidir (18).

Örneğin, çekirdeklerini ve hücre içi organellerini kaybetmiş hücreler olan eritrositlerin bikonkav disk şeklindeki görünümünü kortikal hücre iskeleti belirler. Eritrositlerin kortikal iskeletinin yapısal temelini ise spektrin oluşturur. Eritrosit spektrini, α ve β olarak adlandırılan iki farklı polipeptid zinciri içerir. β zincirinin amino ucunda bir aktin bağlama bölgesi vardır. α ve β zincirleri yan yana bağlanarak dimerler oluştururlar, daha sonra baş bölgelerinin karşılıklı

olarak birbirlerine bağlanması ile tetramerler oluşur. Böylece spektrin tetramerinin iki ucu kısa aktin filamentleri ile bağlanabilir, bu da, kırmızı kan hücrelerinin kortikal hücre iskeletini şekillendirecek olan spektrin-aktin ağının oluşumu ile sonuçlanır. Spektrin aktin ağı ve plazma zarı arasındaki ana bağlantı ankrin olarak adlandırılan ve hem spektrine, hem de sık rastlanan transmembran bir protein olan band 3 proteininin sitoplazmik bölümüne bağlanan bir protein ile sağlanır (10).

Birçok hücre fagositoz, besinlerin emilimi ve hücre hareketinden sorumlu özelleşmiş çıkıntı ve uzantılara sahiptir. Hücre yüzeyinde bulunan bu tip uzantıların çoğunda temel olarak aktin filamentleri bulunur. Aktin filamentleri ya kısmen kalıcı ya da hızla yeniden düzenlenen demet veya ağlar ile organize edilirler (10, 18).

Aktin temelli hücre yüzey çıkıntılarında en iyi tanımlanmış olanı, bazı hayvan hücrelerinde gözlenen mikrovilluslardır. Mikrovilluslar geniş yüzeye gereksinim duyan epitel hücrelerinin apikal bölgelerinde oldukça fazla sayıda bulunur. Emilim görevinin yanısıra özel bir şekli olan stereosiller işitsel tüy hücrelerinde rastlanır ve ses titreşimlerini saptar. Mikrovilluslar, hücre korteksine kadar uzanan sıkıca paketlenmiş 20-30 kadar aktin filament demetlerinden oluşur. Bu demetlerdeki aktin filamentlerinin (+) uçları mikrovillus ucunda olacak şekilde ve fimbrinler tarafından çapraz bağlanarak birbirinden belirli uzakta dizilirler. Bununla birlikte barsak mikrovilluslarındaki ana aktin-demetleyen protein villindir. Mikrovilluslar plazma zarına, aktin demetleri boyunca miyozin I ile bağlanmış kalsiyum bağlayıcı protein kalmodulini içeren yan kollarıyla tutunur. Mikrovilluslar taban bölümünde terminal ağ bölgesine ise spektrinlerle tutunur (9, 10).

Mikrovillusların aksine birçok yüzey çıkıntısı çevresel uyarılara yanıt olarak oluşan geçici yapılardır. Örneğin, ağ şeklinde çapraz bağlanmış aktin filamentlerinden oluşan psödopodlar, fagositoz ve amiplerin bir yüzeyde hareket etmesinden sorumludurlar. Lamellipodlar, mikrodiken veya filopodlar gibi yapılar aktin filament ağı içerirler. Bu yapıların oluşumu ve geri çekilmesi, aktin filamentlerinin yapılanması ve ayrışması ile düzenlenir (10).

2. 1. 2. 5. Aktin-Miyozin Etkileşimi ve Hücre Hareketi

Genellikle miyozin ile bağlantılı aktin filamentleri, hücre hareketlerinin birçok tipinden sorumludur. Miyozin, ATP formundaki kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştüren, böylece güç ve hareket meydana getiren bir proteindir. Aktin-miyozin etkileşimleri kas kasılmasının yanısıra kas dışındaki hücrelerin bölünmesi ve çeşitli hareketlerinin gerçekleşmesinden de sorumludur. Ayrıca, aktin hücre iskeleti hücrelerin bir yüzeyde ilerlemesini sağlayan sürünme hareketlerinden de sorumludur. Bu hareketlerin, aktin-miyozin etkileşimleri kadar, doğrudan aktin polimerleşmesi ile de yönlendirildiği düşünülmektedir (10).

Kasta bulunan miyozin tipi olan miyozin II, iki özdeş ağır zincir (her biri yaklaşık 200 kd) ve iki çift hafif zincir (her biri yaklaşık 20 kd) içeren çok büyük bir proteindir. Her bir ağır zincir, globüler bir baş bölgesi ve uzun bir α -sarmal kuyruk içerir. İki ağır zincirin α -sarmal kuyrukları birbirleri etrafında dönerek bir dimer oluştururlar. Başlangıçta kendisine herhangi bir nükleotid (ATP veya ADP) bağlı olmayan miyozin baş aktin filamentine sıkıca bağlıdır. Miyozinin baş kısmına ATP bağlandığında miyozin, aktin filamentine olan afinitesini yitirir ve aktinden ayrılır. Daha sonra ATP hidrolizi ile miyozinin baş aktin filamenti üzerinde yeni bir yerden bağlanarak hidroliz ürünlerini (ADP ve Pi) serbest bırakır. Böylelikle aktin filamentleri sarkomer üzerinde M çizgisine doğru kayarlar (10, 12, 13).

Aktin-miyozin etkileşiminin kas dışındaki hücrelerde gözlenen en tipik örneği sitokinezdir. Hayvan hücrelerinde mitozun sonlarına doğru ekvatoryal bölgedeki plazma zarının hemen altında, aktin filamentleri ve miyozin II içeren bir kasılabilir-halka oluşur. Bunun kasılması plazma zarını kademeli olarak içeriye doğru çeker ve hücre zamanla ikiye ayrılır.

Kas dışı hücrelerde miyozin II'ye ek olarak en az 12 farklı miyozin tipi tanımlanmıştır. Bu miyozinler, filamentler oluşturmadıklarından kasılma ile ilişkili değildir ancak gerek zar vezikülleri ve gerekse organellerin aktin filamentleri boyunca taşınması, fagositoz ve amipte psödopodların uzaması gibi çeşitli hücre hareketi ile ilişkilidirler. Miyozinlerin çoğunun fonksiyonları henüz bilinmemekle birlikte, miyozin I, V ve VI'nin madde taşınması ve organel

hareketlerinde, miyozin III'ün görme ve miyozin VI ve VII'nin işitme gibi duysal işlevlerde önemli rollerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (10).

2. 1. 3. Ara Filamentler

Ara filamentler 10 nm çapında olan esnek ancak oldukça güçlü olan polimerlerdir. Aktin filamentleri ve mikrotübüllerin tersine ara filamentler hücre hareketlerine doğrudan katılmazlar. Bunun yerine mekanik olarak baskıyla karşılaşan hücelere (epitel hücreleri, kas hücreleri, sinir aksonları gibi) yapısal destek sağlar (1, 9, 10, 12, 13).

2. 1. 3. 1. Ara Filament Proteinleri

Bugüne kadar elliden fazla farklı ara filament tipi tanımlanmıştır. Amino asit dizileri arasındaki ve protein yapılarındaki benzerliklere göre altı grupta sınıflandırılmışlardır (10, 13).

Tip I ve II; epitel hücrelerinde eksprese edilen, her biri yaklaşık 15 farklı protein içeren iki keratin grubundan oluşmuştur. Her epitel hücre tipi, filamentler halinde birlikte polimerleşen en azından bir tip I (asidik) ve bir tip II (nötral/bazik) keratin sentezler. Keratin tip I ve II'nin bazı tipleri (sert keratinler) kıl, tırnak ve boynuz gibi yapıların üretilmesinden sorumludurlar. Keratin tip I ve II'nin bazı diğer tipleri (yumuşak keratinler) epitel hücrelerinin, ara filament hücre iskeleti (sitokeratini) oluştururlar. Tip I ve tip II ara filamentler desmozom ve hemidesmozomların sitoplazma plaklarına tutunurlar.

Tip III ara filament proteinleri mezenşimal kökenli (fibroblastlar, düz kas hücreleri, kondroblastlar ve beyaz kan hücreleri gibi) hücrelerde bulunan bir protein olan vimentin içerir (1, 9, 18). Vimentinin nükleusa, endoplazmik retikuluma ve mitokondriye lateral ya da terminal olarak tutundukları ve sitoplazmada organellerin pozisyon alması ve sabitlenmesinde görev aldıkları bilinmektedir (19). Bir diğer tip III proteini, özgün olarak kas hücrelerinde eksprese edilen ve buradaki farklı kasılabilir elemanları Z diskine bağlayan desmindir (10). Üçüncü, tip III ara filament proteini, astrosit ve bazı Schwann hücrelerinde eksprese edilen glial fibriller asidik protein (GFAP), dördüncüsü ise

periferel sinir sistemindeki nöronlarda nörofilament proteinleri ile beraber sentezlenen periferindir (10, 18).

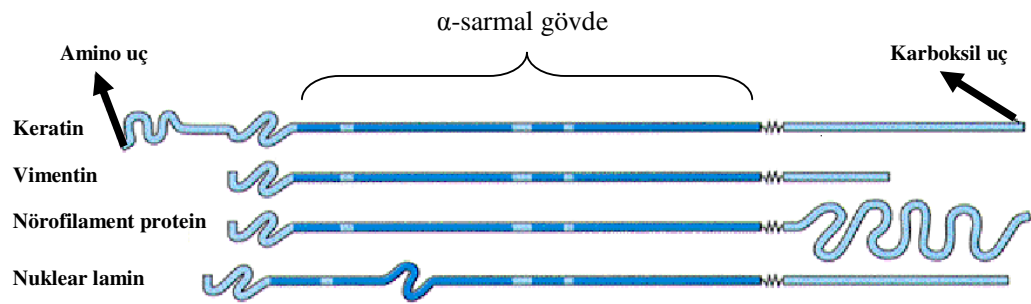
Tip IV ara filament proteinleri, üç nörofilament (NF) proteinini (NF-L, NF-M ve NF-H) içerir. Bu proteinler birçok tipteki olgun sinir hücrelerinde ana ara filamentleri oluşturur. Bir diğere, tip IV proteini olan α -interneksin nöral gelişimin erken dönemlerinde, nörofilament proteinlerinin ekspresyonundan önce eksprese edilir (10).

Tip V ara filament proteinleri, çoğu ökaryotik hücrede bulunan nükleer laminlerdir. Nükleer laminler, hücre iskeletinin bir parçası olmalarından çok, nükleus zarının altını döşeyerek ortogonal bir tabaka oluştururlar. Nükleer laminler çekirdek kılıfına mekanik destek olup kromatine bağlanır (1, 10).

Tek **tip VI** ara filament proteini (netsin) nöral gelişimin daha da erken dönemleri sırasında, merkezi sinir sistemi kök hücrelerinde eksprese edilir (10).

2. 1. 3. 2. Ara Filamentlerin Yapılanması

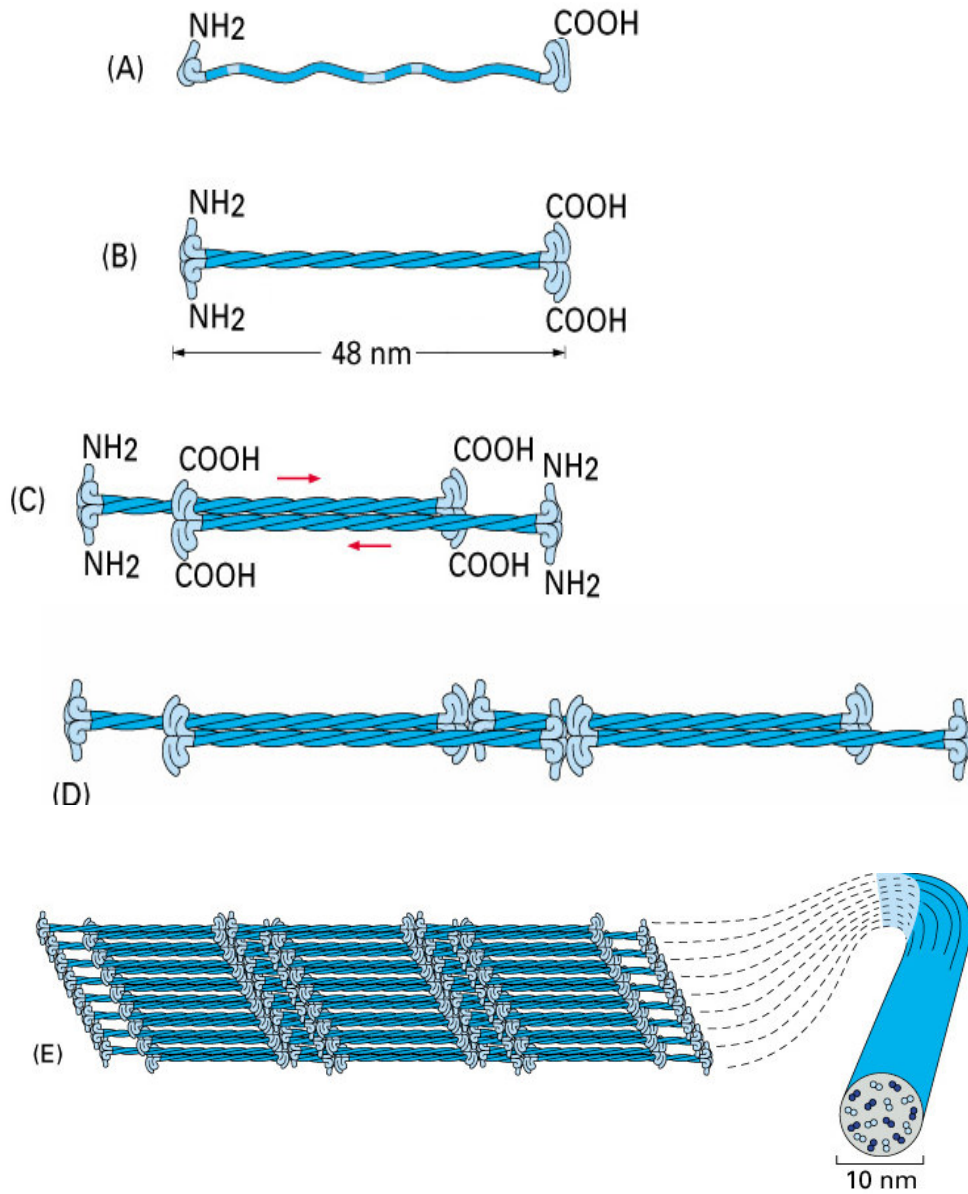
Boyut ve amino asit diziliminde önemli farklılıklar olmasına karşın, ara filamentleri oluşturan protein monomerlerinin yapısal organizasyonu aynıdır. Bu monomerleri, amino uç (baş), karboksil uç (kuyruk) ve merkezi bölge (gövde) olmak üzere üç kısımdan oluşurlar [Şekil 3 (20)].



Şekil 3. Arafilamentler ve yapıları (20).

Merkezi bölge 310-350 amino asitten oluşan α -sarmal yapıdadır. Ara filament yapılanmasında birinci basamak, iki polipeptitin merkezi çubuk bölgelerinin ikili yapı oluşturacak tarzda birbirinin etrafında kıvrılarak

dönmesidir. Daha sonra oluşan ikililer, dörtlü bir yapı oluşturmak amacıyla zıt-parallel şekilde birleşirler. Oluşan dörtlüler uç uca eklenirken bir yandan da kangallaşarak 10 nm kalınlıktaki ara filamentleri meydana getirirler. Ara filamentler anti paralel tetramerler halinde yapılandıklarından apolardır. Yani farklı (+) ve (-) uçlara sahip değildir (10) [Şekil 4. (20)].



Şekil 4. Arafilamentlerin yapılanması (20).

2. 1. 4. Mikrotübüller

Üçüncü temel hücre iskeleti elemanı olan mikrotübüller yaklaşık 24 nm çapındaki sert, içi boş çubuklardır. 5 nm kalınlığında yoğun bir duvara sahiptir ve merkezinde 14 nm genişliğinde bir boşluk bulunur. Mikrotübüller, hücre şeklinin belirlenmesi, hücrelerin yer değiştirmesi, sil ve kamçı yapısına katılarak bunların hareketi, organellerin ve veziküllerin hücre içindeki taşınması ve mitoz sırasında mitoz iğciği oluşturarak kromozomların ayrılmasını da içeren çok çeşitli hücre hareketlerinde görevler üstlenirler (1, 12, 13).

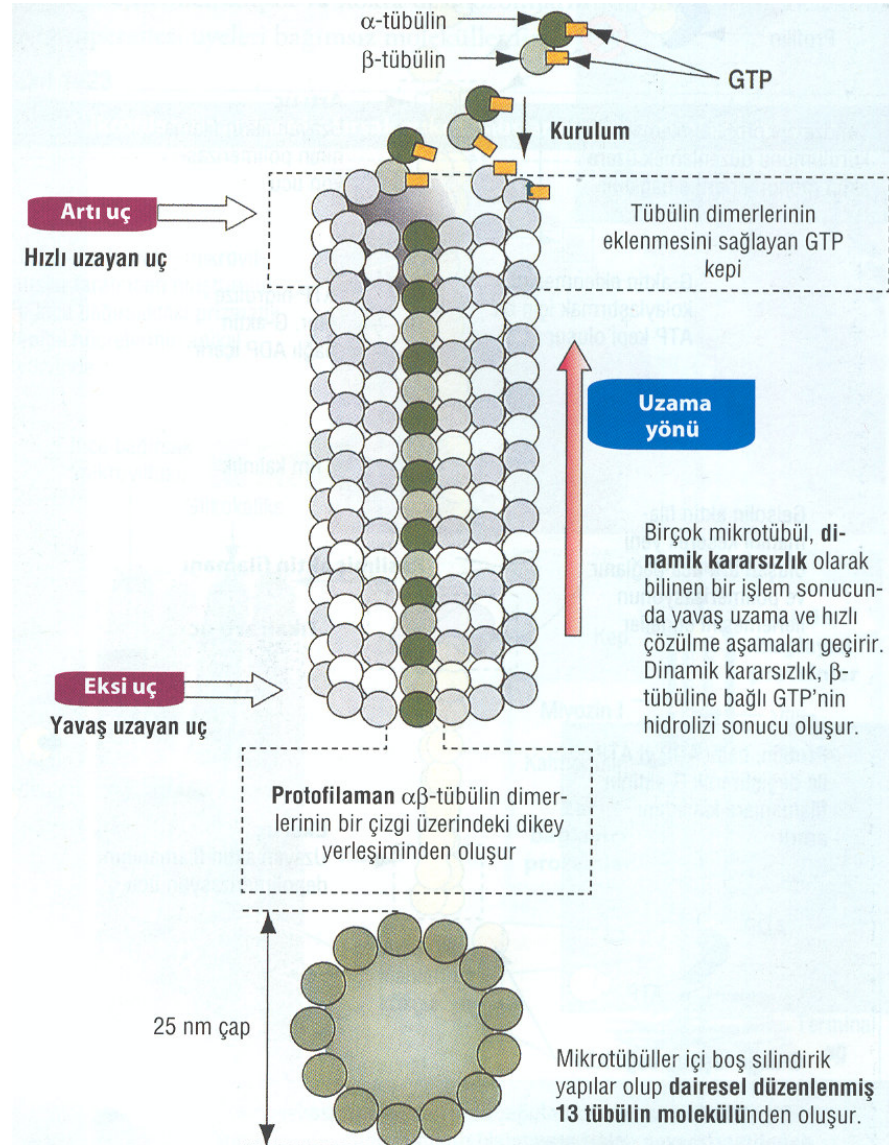
2. 1. 4. 1. Mikrotübüllerin Yapısı, Yapılanması ve Dinamik Kararsızlığı

Mikrotübüller tübülün denilen globuler proteinlerden oluşmuştur. Tübülün, birbiri ile çok benzer yaklaşık 50 kD'luk iki polipeptitten, α -tübülün ve β -tübülün, oluşur. Ayrıca üçüncü bir tübülün tipi (γ -tübülün) spesifik olarak sentrozomda yer alıp mikrotübül yapılanmasında kritik rol oynar (10, 13).

Uygun koşullarda, α ve β tubulinler üst üste yerleşerek 8 nm uzunluğunda dimerik alt birimler oluştururlar. Protofilament içinde bu heterodimerler α - β - α - β olacak şekilde uç uca eklenirler. Onüç protofilament silindir şeklinde dizilerek mikrotübülleri oluştururlar. Tübülün dimerlerinin baş-kuyruk yönünde dizilmesi ile oluşan önfilamentler, paralel şekilde bir araya gelmişlerdir. Böylece, mikrotübüller hızla büyüyen bir artı uç ve yavaş büyüyen bir eksi uca sahip olurlar. Bu polarite, mikrotübül boyunca hareketin yönünü belirlemede önemlidir (1, 10, 21).

Hem α - hem de β -tübülün, ATP bağlı aktinin polimerleşmesinin kontrolündeki rolü ile aynı işleve sahip ve GTP'ye bağlanır. Polimerleşme sırasında β -tübüline bağlı GTP, GDP'ye hidrolize olur. Böylece tubulinin komşu moleküllere bağlanma eğilimi zayıflar ve ayrışmaya yardımcı olur. Bir mikrotübülün uzayacağı ya da kısalacağı, kısmen, tübülün konsantrasyonuna karşılık GTP hidroliz oranı ile belirlenir. GTP bağlı tübülünlerin mikrotübüle eklenme hızı, daha önceden bağlanmış tubulinlerdeki GTP'nin GDP'ye hidrolizasyon hızından daha fazladır. Bu nedenle ortamda tubulin konsantrasyonu

fazlaysa mikrotübülün artı ucunda GTP başlığı kalır ve mikrotübül uzamaya devam eder. Bununla birlikte, polimerleşme oranı yavaşsa, mikrotübülün artı ucundaki GTP bağlı tübülün GDP'ye hidrolize edilecektir. Bu olduğu zaman, GDP bağlı tübülün ayrışacak, hızlı depolimerizasyon ve kısalma ile sonuçlanacaktır (10, 21) [Şekil 5 (12)].



Şekil 5. Bir mikrotübül yapısı ve yeniden yapılanması (12).

2. 1. 4. 2. Mitoz Sırasında Mikrotübüllerin Yeniden Düzenlenmesi

Mitoz sırasında mikrotübüller tam olarak yeniden düzenlenirler. Mitoz sırasında hücrede interfaz evresinde bulunan mikrotübül ağı yıkılır ve serbest tubulin alt birimleri, kardeş kromozomların ayrılmasından sorumlu mitotik iğni oluşturmak üzere yeniden yapılır. Bu yeniden yapılanma, sentrozomun mitotik iğni karşıt kutuplarında, iki ayrı mikrotübül organize edici merkez oluşturacak şekilde iki katına çıkması ile yönlendirilir (1).

İnterfaz evresinde sentrioller ve sentrozomun diğer elemanları iki katına çıkar. G₁ evresinde iki sentriol birbirine çok yakın konumlanmışlardır. S evresinde her sentriol yanında ona dik açı ile yeni bir sentriol büyümeye başlar. G₂ evresinde yeni oluşan sentriolün büyümesi sonlanır. Mitoz bölünme başlayınca (erken profaz) her bir sentriol çifti ayrılıp kutuplara doğru yönelirler ve mitotik iğni iki kutbunu oluştururlar (1).

Hayvan hücrelerinde yapılan elektron mikroskopik çalışmalar mitotik iğni 3 tip mikrotübül barındırdığını göstermiştir. Polar fibriller, kutuplardan ekvatora doğru uzanan mikrotübüllerdir. Kromozomlara tutunmayan ancak ekvatoryal bölgede mikrotübül bağlayıcı proteinlerle birbirine çapraz olarak bağlanıp stabil bir yapı kazanılmasında fonksiyon gören fibrillerdir. Kinetikor fibriller, kromozomların sentromerlerine tutunarak, kromozomları kutuplara bağlar. Mitotik kromozomların ayrılmasında önemli roller üstlenir. Yıldızsı fibriller, sentrozomdan hücrenin kenarına doğru uzar ve kromozom hareketine katkıda bulunur (1, 18).

Mitoz devam ederken, kromozomlar metafaz plağı üzerinde toplanırlar. Kromozomlar iğni mikrotübülleri ile ilişkili motor proteinleri aracılığı ile hareket ederek iğni iki karşıt kutbuna çekilir. Mitozun son evrelerinde, nükleer zarf yeniden oluşur ve sitokinez başlar. Böylece her iki yavru hücrede, interfaz mikrotübül ağı yapısını oluşturacak bir sentrozom yer alır (18).

2. 1. 4. 3. Mikrotübül İlişkili Proteinler (MAP)

Mikrotübüllerin toplanması ve yapısının düzenlenmesinde görev alan çok sayıda protein bilinmektedir. Her hücre tipinde MAP'ların birleşimi gelişim

sırasında gen ekspresyonuyla sağlanır. Bu karışım mikrotübüllerin organizasyonu ve dinamiklerini etkiler ayrıca ikincil olarak hücrenin şeklini belirler.

MAP'lar genellikle beyinde bulunmasına rağmen, sinir hücreleri dışındaki hayvan hücrelerinde, bitkilerde, mantarlarda ve protozoonlarda bulunurlar.

Farklı birçok hücre tipinde çok çeşitli sayıda MAP'lar belirlenmiştir. Bu proteinler mikrotübülleri stabilize etme, destabilize etme, mikrotübülleri hücrede spesifik bölgelere yönlendirme, mikrotübüllere çapraz bağlanma ve hücrelerdeki diğer proteinlerle mikrotübüllerin ilişkilerinde aracılık etme gibi görevleri üstlenirler (9, 18).

2. 1. 4. 3. 1. Mikrotübül Stabilize Eden MAP'lar

MAP 1A ve MAP 1B, dendrit ve aksonlarda bulunurlar. C-terminalleri ile mikrotübüllere bağlanırlar. N-terminalleri ile de hücre iskeletinin diğer kısımlarına veya plazma membranına bağlanırlar. Böylece hücre içerisinde mikrotübüllerin mesafesini kontrol ederler (22).

MAP2, sadece dendritlerde bulunur. Mikrotübül protofilamentlerinin dış yüzeyine bağlanarak çapraz bağlarla mikrotübülleri birbirine ve ara filamentlere bağlarlar (9,10).

TAU, akson ve diğer hücre tiplerinde bulunurlar(9). Tubulin polimerizasyonunu hızlandırır ve kol benzeri çıkıntılar yaparak komşu mikrotübülleri çapraz olarak birbirine bağlayarak stabilize ederler (1).

MAP4, interfaz ve mitozda mikrotübüllerle bağlantılar yaparlar. Omurgalıların özellikle glial hücrelerinde ve neredeyse tüm hücre tiplerinde bulunurlar.

Bu yaygın görülen MAP'lar dışında tektin, sinkolin ve stop proteinleri gibi mikrotübül stabilize eden MAP'lar vardır.

2. 1. 4. 3. 2. Mikrotübül Destabilize Eden MAP'lar

Hücrede mikrotübüller üç farklı yolla destabilize edilirler. Bunlardan birincisi, küçük bir protein olan ve omurgalı hücrelerinde yaygın olarak bulunan Op18/stathmindir. Bu protein tubulin dimerlerini ayırarak yıkımı hızlandırır.

İkincisi, kinesin ilişkili ancak bir motor protein olmayan XKCM1/MCAK proteindir. Bu protein polipeptit zincirinin merkezinde bir motor domaine

sahiptir. Bu domainde ATP hidrolizi ile mikrotübüllerin (+) ucunda tubulin alt birimleri gerilir ve ayrışma hızlanır.

Desatabilizasyona neden olan üçüncü yol ise, katanin adı verilen heterodimerik protein aracılığı ile gerçekleşir. Katanin ATP hidrolizi yoluyla mikrotübülleri küçük parçalara ayırır. Mitoz sırasında katanin ile gerçekleşen parçalanma interfaz mikrotübül ağının yeniden modellenmesine katkıda bulunur (9).

2. 1. 4. 4. Mikrotübül Motor Proteinleri ve Hareket

Mikrotübüller hücre içi hareket, zar veziküllerinin ve organellerin yer değiştirmesi, mitozda kromozomların ayrılması, sil ve kamçıların hareketini içeren çok çeşitli hücre hareketlerinden sorumludur. Mikrotübüller boyunca hareket, ATP hidrolizinden elde ettiği enerjiyi kullanarak güç ve hareket oluşturan, motor proteinlerin çalışması esasına dayanır (1, 10).

Motor proteinler yapısal olarak baş (ATP hidrolizinin olduğu mikrotübüle bağlanan uç) sap ve kuyruk (transport veziküllerine bağlanan uç)'tan oluşur. Enerji başta bulunan ATP'nin ATP'yi sürekli hidrolize etmesi ile karşılanır. Kuyruk bölgesi ise veziküllerin ve organellerin yüzeyinde bulunan belirli reseptörlere bağlanarak transportu gerçekleştirir (1).

Mikrotübül motor proteinlerinden ilk tanımlanan dineinlerdir. Dineinler 2 gruba ayrılırlar; sitoplazmik dineinler ve aksonemal dineinler.

Aksonemal dineinle, aksonemler içinde mikrotübüllerin kaymasına neden olurlar. Yani sil ve flagellada hareketten sorumlu α -tubulinin (-) uca doğru kaymasına katılırlar.

Sitoplazmik dineinler (MAP 1C), biri değişken sayıdaki, boyutları 14 ila 120 kD arasında değişen, hafif veya orta boyuttaki zincirler ile kompleks oluşturan, iki ya da üç ağır zincir (her biri yaklaşık 500 kD) içeren, çok büyük bir moleküldür (2000 kD kadar) (10). Bütün hayvan hücrelerinde bulunur ve sentrozomların toplanması, organel transportu gibi hücre için yaşamsal fonksiyonların gerçekleştirilmesinden sorumludurlar (23).

1985 yılında yapılan bir çalışmayla mürekkep balığı dev aksonlarında ve sığır beyinde yeni bir protein keşfedilmiştir. Bu proteinin gerek enzimatik

davranışı gerekse molekül ağırlığı dinein ve miyozinden farklı olduğu bulunmuş ve kinezin olarak adlandırılmıştır (24).

Kinezin, yaklaşık 380 kD'luk, iki ağır zincire (her biri 120 kD) ve iki hafif zincire (her biri 64 kD) sahip bir proteindir. Ağır zincirlerdeki globüler baş bölümleri, hem mikrotübüllere hem de ATP'ye bağlanır ve hidrolizi ile hareket için gerekli enerjiyi sağlar. Kinezin molekülünün kuyruk kısmı ise mikrotübül boyunca taşınacak diğer hücresel elemanlara (zar vezikülleri ve organeller gibi) bağlanmadan sorumludur (10, 23).

Hücre içinde veziküller, organeller ve çeşitli protein partikülleri sürekli olarak bir taşınım içindedirler. Bu taşınmada hücre iskelet fibrilleri çok önemli görevler üstlenmektedirler. Örneğin nörotransmitterleri içeren salgı vezikülleri Golgi aygıtından aksonların uç dallarına kinezinlerle taşınırlar. Kinezin molekülünün bir ucu mikrotübüle tutunurken diğer ucu veziküllere tutunur. ATP varlığında kinezin mikrotübülün (-) ucundan (+) ucuna doğru hareket eder ve salgı vezikülünü mikrotübül boyunca taşır (anterograde taşınım). Ters yönde endositotik veziküller de mikrotübül boyunca aksondan hücre gövdesine sitoplazmik dineinlerle (MAP 1C) taşınır (retrograde taşınım) (9, 10).

Diğer hücre tiplerinde de mikrotübüller zar veziküllerini ve organelleri benzer şekilde taşır. Ayrıca mikrotübüller ve ilişkili motor proteinlerin, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, lizozomlar, mitokondri gibi zarla çevrili organellerin hücre içerisindeki yerleşimini düzenlediği bilinmektedir (10). Özellikle kinezinlerin endoplazmik retikulumun hücre içindeki yerleşiminde, lizozomların hücrenin merkezinden uzaklaştırılmasında ve mitokondri hareketinde görev aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (25, 26).

Ayrıca yapılan çalışmalarda dineinlerin Golgi aygıtının yerleşimini düzenlediği gösterilmiştir. Hücre mitoz girildiğinde mikrotübüllerin yıkılması ile Golgi aygıtı sitoplazmaya küçük veziküller halinde yayılır ve mikrotübüllerin oluşumuyla sitoplazmik dineinler aracılığı ile veziküller hücre merkezine taşınır ve Golgi aygıtı yeniden yapılırlar (10).

2. 1. 4. 5. Mikrotübüllerden Oluşan Yapılar

2. 1. 4. 5. 1. Siller, Kamçılar ve Hareketleri

Mikrotübüller hücre içinde sil, kamçı (flagel), bazal cisim ve sentriol yapısına katılır. Sil ve kamçılar çeşitli ökaryot hücrenin hareketinden sorumlu olan, plazma zarının mikrotübül temelli uzantılarıdır. Birçok bakteride de kamçılar bulunmaktadır ancak prokaryot kamçıları hücre yüzeyinden dışarıya doğru uzanan protein filamentleridir. Siller yaklaşık 10 µm uzunluğunda düzenli bir şekilde ileri-geri hareketleri yaparak, titreşerek, hücreyi sıvı içerisinde ya da sıvıyı hücre yüzeyinde hareket ettirir. Buna iyi bir örnek, solunum yollarını döşeyen ve solunum yollarından mukus ve tozları uzaklaştıran, kirpikli hücrelerdir. Kamçılar 200 µm'ye varabilen uzunlukları ve dalga benzeri titreşme hareketleri bakımından kirpiklerden farklıdır (10).

Hem siller hem de kamçının temel yapısı, mikrotübüller ve ilişkili proteinlerinden oluşan aksonemdir. Mikrotübüller, dokuz çift dış mikrotübül ile çevrili bir çift merkez mikrotübülünden oluşan '9+2' formatında düzenlenmişlerdir. Dışta bulunan birbirine kaynaşmış her ikili farklıdır: bunlardan biri (A tübülü adı verilen) 13 ön filamente sahip olan tam bir mikrotübüldür; diğeri ise (B tübülü) tam bir mikrotübül yapısına sahip değildir ve A tübülüne kaynaşmış halde 10 ya da 11 ön filament içerir. A ve B tübüleri birbirine tektin adı verilen protein bir filamentle bağlıdır. Dış mikrotübül çiftleri merkezdeki mikrotübül çiftine ışınları çıkıntılar ve birbirlerine de neksin adı verilen bağlantılar aracılığı ile bağlıdır. Buna ek olarak, her bir A tübülüne, iki dinein kolu tutunmuştur, bu aksonemal dineinlerin motor aktiviteleri, kirpik ve kamçının titreşme hareketini sağlar (10, 12, 13).

Kirpik ve kamçıların hareketleri, dıştaki mikrotübül çiftlerinin birbirine görel olarak kaymasının sonucudur ve bu aksonemal dineinin motor aktivitesi ile desteklenir. Dineinin alt kısmı A tübülüne bağlanırken, dinein baş grupları komşu mikrotübül çiftlerinin B tübüllerine bağlanır. Böylece, dinein baş gruplarının eksi uç yönündeki hareketi, bir çift içindeki A tübülünün, komşu B tübülünün alt ucuna doğru kaymasına yol açar. Aksonemdeki mikrotübül çiftleri neksin

köprüleri ile bağlı olduğundan, bir çiftin diğeri üzerinde kayması bükülmelerine neden olur. Bu da kirpik ve kamçının titreşim hareketinin temelini oluşturmaktadır (10).

2. 1. 4. 5. 2. Bazal Cisim ve Sentiollerin Yapısı

Sil ve kamçılar sitoplazmik uçlarından bazal cisim olarak adlandırılan ve mikrotübül içeren yapılara tutunurlar. Aynı şekilde mitoz içiğindeki mikrotübüllerde sentriol olarak adlandırılan yapılara tutunurlar.

Gerek bazal cisim gerekse sentioller yaklaşık 0,4 µm uzunluğunda 0,2 µm genişliğinde silindir yapılardır. Çevresel olarak dizilmiş üçerli 9 mikrotübül demeti içerir. Her üçlü demette tam olarak 13 protofilament taşıyan A subfibrili ve A subfibriline tutunmuş tam olmayan B subfibrili ve B subfibriline tutunmuş tam olmayan C subfibrili yer alır. A ve B subfibrilleri aksonemin sütun gövdesi boyunca devam ederken C subfibrili bazal cisim ile sütun gövde arasındaki geçiş zonunda sonlanır.

Gerek sentiollerin gerekse bazal cisimlerin çoğalması ve büyümesi asıl sentriole ve bazal cisime dik olacak şekilde ortaya çıkar ve yeni oluşan yapılar asıllarından ayrılarak yeni sil ve kamçıyı oluşturur (18).

2. 2. Ovaryum

Tek katlı yassıdan kısa kübik epitelyuma kadar değişkenlik gösteren bir epitel ve epitelin hemen altında yer alan tunika albuginea adı verilen bağ dokusu bir tabakayla çevrilidir. Kesitlerde korteks ve medulla olarak adlandırılan kesin sınırlarla birbirinden ayrılamayan tabakalanma oluştururlar. Organın stromasında, primordial folliküller (testisteki seminifer tübüllerin homoloğu) ve interstitial bezler (testisteki Leydig hücrelerinin homoloğu) bulunur. Organın medullasına baktığımızda hilustan ovaryuma giren, bağ dokusu, interstisyel hücreler, sinirler, lenf ve kan damarları bulunur (12, 27, 28).

Gamet üretimi, öncelikle mitozla hücre sayısında artış, mayozla genetik çeşitlilik ve kromozom sayısının azalması ve oosit maturasyonu süresince haploit sayıdaki kromozomların paketlenmesi olarak açıklanabilir. Aslında ilkel dişi cins

hücrelerinin gelişip olgunlaşması yani oogenez, doğum öncesi ve doğum sonrası olarak ikiye ayrılabilir (28, 29).

2. 2. 1. Oositlerin Doğum Öncesi Olgunlaşması (Prenatal Maturasyon)

İlkel cins hücreleri, dişi gonadlara ulaştıktan sonra oogoniumlara farklılıklar. Burada bir dizi mitozun ardından sayıları artıp 3. ayın sonunda ortada oogonium, çevrede tek sıra follikül epitel hücreleri yer alır. Bu aşamada oogoniumların büyük bir kısmı mitozla bölünürken bir kısım oogoniumda büyüyerek primer oositleri meydana getirirler. Primer oositler hemen DNA'larını replike edip birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. 5. ayda sayıları 7 milyonu bulan cins hücreleri bu aydan sonra gerilemeye başlar. 8. ayda oogoniumların neredeyse hepsi dejenere olur. Sağlam kalan primer oositlerin tümüyle, I. mayoz bölünmede tek katlı epitel ile sarılarak primordial follikülleri meydana getirirler (29).

2. 2. 2. Oositlerin Doğum Sonrası Olgunlaşması (Postnatal Maturasyon)

Doğuma yakın tüm primer oositler I. mayoz bölünmenin profaz evresini bitirip, mayozun dinlenme 'diktat' evresine girerler. Primer oositler, pubertede, ovulasyondan az önce I. mayoz bölünmeyi tamamlarlar.

Doğumda, primer oositlerin sayısı 700.000 ila 2.000.000 arasında değişir ve doğum sonrasında artık primer oosit meydana gelmez. Puberteye erişildiğinde bir genç kızda her iki ovaryumda toplam 400.000 primordial follikül halinde primer oosit bulunur (29, 30).

Pübertenin başlamasıyla beraber hipotalamus, hipofiz bezi ve overler tarafından salgılanan hormonların etkileşimiyle ovaryum döngüsü başlar. Adet siklusu olarak da adlandırılan bu döngü folliküler (proliferatif) faz ve luteal (sekretuar) faz olarak ikiye ayrılır. İnsanda ortalama menstrual siklus süresi 28 gündür ve genellikle 25 ila 30 gün arasında farklılık gösterebilir. Folliküler faz süresince görülen değişiklikler tüm siklus süresince değişiklikler yaratır ve folliküler faz genellikle 10-16 gün içerisinde sonuçlanır. Luteal faz ise sabittir ve 14 gün sürer (27, 29).

2. 2. 3. Folliküler Faz

Menstruasyon kanamasının ilk günü başlar ve ovulasyona kadar devam eder. Bu fazın en önemli özelliği overlerde primordial folliküllerin farklanması ve follikül gelişiminin olmasıdır. Siklusun son günlerinde korpus luteumun gerilemesine bağlı olarak steroid sentezindeki azalma ve sonrasında inhibin A ve B seviyelerindeki düşüş ortamdaki FSH (Follikül Stimüle Edici Hormon)'un konsantrasyonunun yükselmesine neden olur. Yükselen FSH değerleri ovaryumda follikül gelişimini tetikler. Gelişen folliküllerden birisi bir sonraki siklus için dominant follikül olarak seçilir. Dominant follikülün hangi mekanizmalarla seçildiği tam olarak bilinmese de granüloza hücrelerinden salgılanan peptitlerin gelişmekte olan diğer folliküllerin gelişimini engellediği bilinmektedir.

Dominant follikülün gelişimi; Menstruasyonun 1. ve 4. günleri arasında bazı primordial folliküller gelişim için uyarılması ile başlar. Siklusun 5. ve 7. günleri arasında, recruitment aşamasında, gelişim için seçilen folliküllerden birinin ovule olabilmesi için seçilmesi gerçekleşir. Diğer folliküller atreziye uğrar. Ovule olması için seçilen follikül kendi gelişimini tamamlar ve diğer folliküllerin gelişimi engellenir (27).

2. 2. 4. Follikülogenez

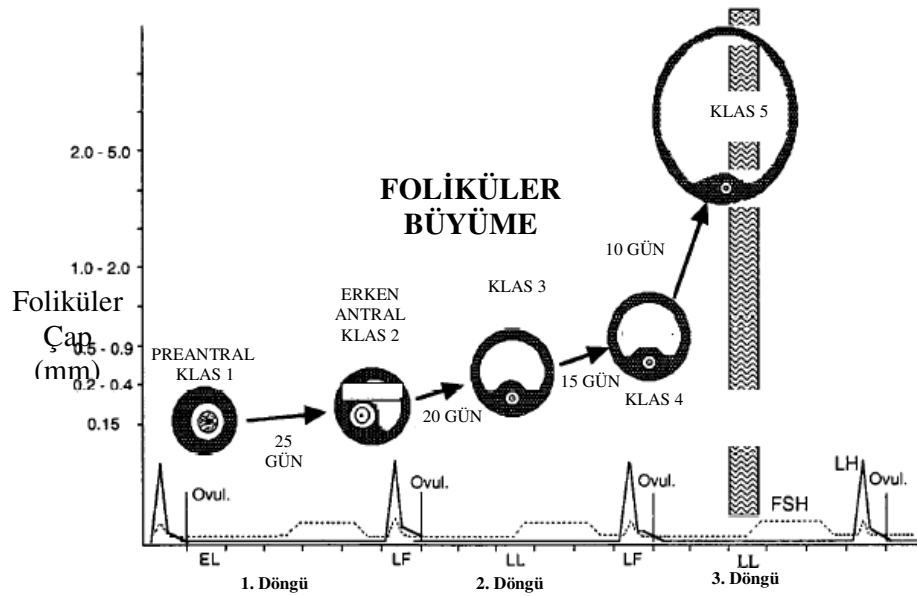
Bazı primordial folliküllerin seçilmesi ve ovulasyon ya da follikül atrezisiyle sonuçlanan olaylar bütününe follikülogenez denilir. Ovaryum korteksinde gerçekleşen follikülogenez'de folliküller 4 büyük gelişim evresi gösterirler:

- A. Primordial Follikül Seçilimi
- B. Preantral Follikül Gelişimi
- C. Graaf Follikül Gelişimi ve Seçimi
- D. Follikül Atrezisi

2. 2. 4. 1. Primordial Follikül Seçilimi

Follikülogenez uzun bir süreçtir. Her dominant follikül yaklaşık 1 yıl gelişim gösteren primordial folliküllerden seçilir. Preantral (klas 1) fazı, primordial, primer ve sekonder follikül evrelerini kapsar. İnsan ve maymunlarda preantral fazın tamamlanması yaklaşık 290 gün ya da 10 düzenli menstrüal siklus

kadar süre gerektirir. Preantral (klas 1)'dan erken antral evresi (klas 2)'ne geçiş follikül çapı 20 μm den türe bağlı olarak 200 ve ya 400 μm arasına ulaştığında gerçekleşir. Primer oositse yine türe bağlı olarak 60 ile 120 μm arasında büyüklüğe erişir. Bu büyüme mayozun yeniden başlaması ile değil yoğun sentez aktivitesine bağlı olarak gerçekleşir. Bu aşamada sentezlenen maddeler oosit sitoplazmasını daha sonra gerçekleştirecek olan oosit maturasyonu için hazırlar. Antral faz 4 büyük gruba ayrılır; küçük (klas 2, 3, 4, 5), orta (klas 6), büyük (klas 7) ve preovulatuvar Graaf follikül (klas 8). Antral fazda antrum formasyonu ve yaklaşık 20 μm çapa ulaşmış preovulatuvar Graaf follikülü arasında yaklaşık 60 gün süre vardır [Şekil 6.(31)]. Dominant follikül siklusun luteal fazının sonunda klas 5 follikülleri arasından seçilir. Seçilen dominant follikülün preovulatuvar Graaf follikülü haline ulaşması 15-20 gün gibi bir süre alır. Follikülogenezin son evresi olan bazı folliküllerin atreziye uğradığı evre genellikle klas 1 evresinden sonra bütün evrelerde görülür. Ancak atrezi en yaygın küçük ve orta folliküllerde (klas 5, 6, 7) gözlenir (27, 28, 31).



Şekil 6. Follikül gelişimi (31)

2. 2. 4. 1. 1. Primordial Follikül

Histolojik olarak yaklaşık 25-30 µm çapında I. mayozun diktiat evresinde kalmış küçük bir primer oosit, tek katlı yassı veya kolumnar dizilmiş granülosa hücreleri ve ince bir bazal lamina ile kuşatılmış folliküllerdir. Bazal lamina gerek oositin gerekse oositi çevreleyen granülosa hücrelerinin diğer hücrelerle doğrudan temasını engeller (27, 31).

2. 2. 4. 2. Primer Follikül Gelişimi

2. 2. 4. 2. 1. Primer Follikül

Primer oosit büyür ve etrafındaki tek katlı follikül epitelyumu mitozla çoğalarak tek katlı kübik, tek katlı prizmatik ve daha sonra çok katlı follikül epiteliyle (granülosa) çevrenmesi ile primer folliküller şekillenmeye başlar (27). Oosit büyürken oositi çevreleyen granülosa hücreleri ve oositin ortak ürünü olan glikoprotein yapıda hücresel bir tabaka, zona pellucida, meydana gelir. Daha sonra çevre ovaryum stroması teka folliküliyi oluşturur. Teka folliküli, kan damarları ve hücrelerden zengin teka interna ve sıkı bağ dokusu yapısında teka eksternaya farklanır. Böylece oluşan bu folliküle primer follikül adı verilir (29, 31).

Granülosa hücrelerinin mitotik aktivite kazanması ve şekillerinin yassıdan küboidal epitele dönüşmesi o follikülün seçildiğini gösterir. Bunu gen aktivasyonu ve oositin gelişimi takip eder. Yapılan çalışmalarda oosit mRNA'larının translasyonu ile oluşan bazı proteinlerin (ZP1, ZP2, ZP3, BMP-15, GDF-9) insanda preantral follikül gelişimini uyardığı gösterilmiştir (17-18). Hayvanlarda ise kit ligand, kemik morfogenetik protein (BMP-7), yüksek FSH ve Müllarian inhibe edici madde (MIS) primordial folliküllerin seçilmesi (recruitment) sürecini negatif veya pozitif yönde kontrol ettiği gösterilmiştir (27). Ayrıca primer follikül gelişimi süresince granülosa hücrelerinin FSH reseptörü ekspresyonunda uyardığı FSH reseptöründe gözlenen bu artışın primer follikül gelişimini uyardığı gösterilmiştir (32).

2. 2. 4. 2. 2. Sekonder Follikül

Preantral follikülogenez süresince, primer follikülden tam gelişmiş bir sekonder follikül oluşumunda oosit tarafından üretilen otkrin ve parakrin etkiye

sahip büyüme faktörleri rol oynar. Sekonder follikül gelişimi granülosa hücrelerinin sayısında ve katlar oluşturacak şekilde konumlanmasıyla karakterizedir. Genellikle granülosa hücrelerinin ikinci tabakasının ortaya çıkışı primer follikülden sekonder folliküle geçiş olarak değerlendirilmektedir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde granülosa hücreleri küboid epitelden stratifiye veya psödostratifiye epitele değişim gösterir (31).

Sekonder follikül gelişimindeki diğer bir karakteristik olay da teka gelişimidir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde, interstisyel hücrelerden köken alan teka interna ve düz kas hücrelerinin değişmesiyle teka eksterna tabakası şekillenir. Teka interna hücreleri lüteinleştirici hormon (LH) için reseptörler eksprese ederek androstenedion üretimine katkıda bulunurlar ve granülosa hücrelerine östrojen üretimi için haberci olurlar (33). Teka eksterna tabakası ise follikülü dıştan saran bol miktarda kollajen içeren ve temel olarak destekleyici fonksiyon üstlenen tabakadır (33).

Sekonder follikül, zona pellucida ile çevrelenmiş tam olarak gelişmiş bir oosit, yaklaşık 9 katlı granülosa hücre tabakası, bazal lamina, teka eksterna, teka interna ve teka içerisinde konumlanan damarlarla karakterizedir (27, 28).

2. 2. 4. 2. 3. Antral (Graaf) Follikül

Graaf follikül gelişimi, oositin bir kutbunda sıvı dolu bir kavitenin belirmesi ile karakterizedir. Graaf follikül gelişimi ve büyümesi boyutlarına göre dört evreye ayrılır. Küçük Graaf follikülü 1-6 mm çapına sahipken, orta Graaf follikülü 7-11 mm, büyük Graaf follikülü 12-17 mm ve preovulatuvar Graaf follikülü 18-23 mm çapa sahiptir. Atreziye uğrayacak folliküller küçük ve orta (1-10 mm) evredeki Graaf folliküllerinden seçilir (27). Hyaluronik asitce zengin folliküler sıvı birikimi ve hücre proliferasyonu, folliküler faz süresince devam etmesi nedeniyle dominant follikül aşırı derecede büyür (29). Preovulatuvar oositte artık mayoz yeniden aktive olur. Follikülün LH ile stimülasyonunun ardından birkaç saat içinde nükleer membranla çevrili diktiat kromozomlar mayoza kaldıkları yerden devam ederler. Bu aşamaya germinal vezikül bozulumu adı verilir ve kromozomlar profazı tamamlayarak I. mayotik iğ iplikciklerinde düzenlenirler (28).

2. 2. 5. Ovulasyon

Olgun bir Graaf follikülünün yırtılması sonrasında sekonder oositin uterus tüplerine alınması olayına ovulasyon denilir. Atılan sekonder oosit zona pellucida, korona radiata ve kumulus ooforus tabakası ile sarılmış haldedir. I. mayotik bölünme ya ovulasyondan az önce ya da ovulasyon sırasında tamamlanır. Eşit büyüklükte olmayan, $2n$ DNA miktarına sahip ve her biri 23 çift yapıklı kromozom taşıyan iki cins hücresi meydana gelir. Bunlardan biri sitoplazma yönünden zengindir ve gerçek oosit (= sekonder oosit)'dir. Diğeri ise sitoplazma yönünden fakir ancak mitokondri, ribozom ve kortikal granüle sahip polar cisimciğdir. Polar cisimcik oluşuktan kısa bir süre sonra kaybolur. I. polar cisimciği kaybolan oosit metafaz II ye geçiş için gerekli hazırlıkları yapar. Kromozomlar tekrar hücrenin ortasında dizilir ancak sekonder oosit metafaz II aşamasında kalmıştır (28, 29, 34).

2. 2. 6. Fertilizasyon

Dişi üreme yollarına bırakılan milyonlarca spermde sadece bir sperm hücresi sırasıyla korona radiata ve zona pellucidayı geçip sekonder oositin plazma zarına yapışır ve sperm başı ve bir miktar kuyrukla beraber oosit sitoplazmasına girer. Sperm yumurta içerisine girer girmez, girdiği yerden başlayarak bir dölleme zarı oluşturur. Buna kabuk tepkimesi denir. Dölleme zarı oluşuktan sonra hiç bir sperm yumurtaya giremez. Sperm hücresi sekonder oosit sitoplazmasına girer girmez sekonder oosit II. mayoz bölünmesini tamamlar. Ergin dişi cins hücresi ovum ve II. polar cisim oluşur. Ovum çekirdeği dişi pronükleusu olarak adlandırılır. Sperm başını oluşturan çekirdek ise büyüyerek erkek pronükleusunu oluşturur. Farede II. polar cisimciğın oluşumu fertilizasyondan sonra 2 ila 5. saatlerde gözlenir. Erkek ve dişi pronükleuslar fertilizasyondan sonraki 4 ile 9. saatler içinde şekillenir ve yumurtanın merkezine doğru taşınırlar. DNA replikasyonu fertilizasyondan sonra 11. ile 18. saatler arasında olur. İki pronükleus birbirine çok yaklaşırlar ancak birleşmezler. Bunun yerine mitozda çekirdek zarları yıkılır ve maternal ve paternal kromozomlar iğ iplikciklerinin üzerinde bir araya gelirler. Böylece tek hücreli zigot şekillenir. Maternal ve paternal kökenli kromozomlar sentromerleri hizasında uzunlamasına

ikiye ayrılırlar. Kardeş kromatidler, aksi kutuplara çekilir. Derin bir yarık zigot yüzeyinde oluşur ve giderek yarık derinleşerek zigot ikiye bölünür. Böylece iki hücreli (blastomerli) zigot oluşur. Farede fertilizasyondan sonraki 17 ile 20. saatler arasında ilk yarıklanma oluşur. Pronükleusların şekillenmesi, DNA replikasyonu ve sitokinez, oogenez süresince sentezlenen ve yumurtada depolanan RNA ve proteinler aracılığıyla gerçekleştirilir (35). İlk yarıklanmanın ardından birbirini izleyen mitoz bölünmeler olur ve giderek küçülen hücreler meydana gelir. Her mitoz bölünmeden önce mutlaka DNA replike olur. Üçüncü ve dördüncü bölünmeden sonra blastomerler şeklini değiştirmeye başlar sıkıca bir araya gelmiş 12-16 blastomerli morula şekillenmiş olur (30, 36).

2. 3. Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT)

Yardımcı üreme teknikleri, gelişen teknolojisi ile birlikte sağlık, veterinerlik ve biyoteknoloji gibi farklı birçok disiplinde kullanılmaktadır. Zirai bilimlerde yardımcı üreme teknikleri teknolojisinin kullanılması hızla artan dünya popülasyonunun büyüyen gereksinimlerini gidermek için kullanılırken, sağlık bilimlerinde temel kullanım alanını kısırlık tedavisi oluşturmaktadır (37). Kısırlık tedavisinde, son yıllarda hızlı bir gelişme gözlenmektedir. Bu hızlı gelişme, üreme teknolojisinde gözlenen hızlı gelişme ve bunun sağlık sektöründe etkili kullanımını sağlamaktadır. Bugün her 100 çiftten 15'inin infertil olduğu kabul edilmektedir. Bu %15'lik oranın; %6'sı tedavi edilebilmekte ancak %9'luk bir oranda hala çözümsüzlük sürmektedir (38, 39). Kadın, erkek ya da her ikisine ait üreme sistemleri ile ilgili problemlerden kaynaklanan bir sağlık sorunu olan infertilite, "çiftlerin en az bir yıl süreyle istemelerine rağmen çocuk sahibi olamamaları" olarak tanımlanır. İnfertilitenin yaklaşık %40'ı kadınlardan, %40'ı da erkeklerden kaynaklanan nedenlere bağlıdır. Geriye kalan %20 ise her ikisinden kaynaklanan sorunlar ya da açıklanamayan infertilite nedenleridir (39).

Kadın infertilitesinin en sık görülen nedeni yumurtalıklara ait bozukluklar ve tüplerin tıkalı olması gibi anatomik sorunlardır. Daha az görülen nedenler arasında ise endometriozis (endometriyumun uterus dışına yerleşmesi) ve

hiperprolaktinemi (hormonal bozukluk) gibi nedenler söz konusu olabilir. Erkek infertilitesinin nedenleri arasında ise; spermin kalitesi ya da sayısını etkileyen sperm üretim bozuklukları, sperm ileti yollarının doğuştan yokluğu veya tıkanıklıkları gibi anatomik bozukluklar, immunolojik (bağışıklık sistemi ile ilgili) bozukluklar sayılabilir (27, 39).

İnfertilite tedavilerinde, *in vitro* fertilizasyon (IVF), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), gamet intrafallopian transfer (GIFT), zigot intrafallopian transfer (ZIFT) ve tubal embriyo transfer (TET) gibi birçok yardımcı üreme teknikleri kullanılır (40).

İnfertilite tedavilerinde en çok faydalanılan yardımcı üreme tedavisi, *in vitro* fertilizasyondur (IVF). *In vitro* fertilizasyon (IVF), yumurta hücrelerinin spermlerce dışı dölyatağı dışında fertilize edilmesi tekniğidir. IVF diğer yardımcı üreme tekniklerinin başarısız olduğu infertilite problemlerinde başvuru alan temel tedavi biçimidir. IVF, ovaryum folliküllerden aspire edilen oositler ile ejakulattan veya cerrahi yollardan elde edilen spermelerin laboratuvar ortamında bir araya getirilmesi, fertilizasyonu ve *in vitro* kültür şartlarında gelişimi sonrasında embriyoların intrauterin kaviteye transferi olarak özetlenebilecek bir tedavi sürecidir (27).

Tedaviye başvuran infertil çiftlerin sadece yaklaşık %3 ü gibi küçük bir oranına IVF tedavisi uygulanır. Aslında hem erkek hem kadın için birçok farklı uygun tedavi yöntemleri vardır. Örneğin düzensiz ovulasyon şikayeti olan bazı kadınların hormon tedavisiyle ovulasyonları indüklenir ve gebe kalmaları ve hamilelikleri sağlanabilir. Erkekler için sperm analizleri sonucunda bir enfeksiyon veya bir antikör sorunu tespit edilebilir. Bu durum uygun hekimlere gidilip, uygun ilaç tedavisiyle rahatlıkla giderilebilir. Sperm analizleri sonucunda eğer sperm sayısında azlık ya da spermin hayatta kalma süresinin kısa olduğu fark edilirse, çifte intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu tedavisi uygulanabilir (40). İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) en yeni mikromanipülasyon tekniklerinden biridir. Bu teknik, tek bir spermin yumurta içine enjeksiyonunu içerir. IVF de olduğu gibi dışı, ovaryum uyarıcıları ile implantasyon için

hazırlanır. ICSI, yeni YÜT teknikleri içinde başarı oranı yaklaşık %26 ile en etkili yöntemdir (41).

Yaygın olarak kullanılan diğer bir YÜT prosedürü, gamete intrafallopian transfer (GIFT) dir. Bu teknik 1984 yılında geliştirilmiştir ve servikal veya immünolojik faktörlerin, hafif endometriozisin neden olduğu kısırlık durumunda veya açıklanamayan kısırlık durumlarında başarıyla uygulanan bir tedavi biçimidir. GIFT sırasında sperm ve yumurta bir araya getirilir ve fallop tüplerinden birine veya her ikisine transfer edilir. Dolayısıyla GIFT tekniğinde IVF den farklı olarak in vivo fertilizasyon gerçekleşir (40).

IVF'in bir başka formu da, zigot intrafallopian transfer (ZIFT)'dir. Bu tekniğin diğer bir ismi de "pronuclear stage transfer" (PROST)'dur. ZIFT yönteminde yumurtalar transvaginal ultrason aspirasyonu yoluyla alınır ve bir laboratuvar kabında döllenir. Ertesi gün döllenmiş yumurtaların hücre bölünme evreleri başlamadan fallop tüplerine nakledilir. Daha gelişmiş embriyolar (4-8 hücreli)'in fallop tüplerine nakledilmesine ise Tubal Embriyo Transfer (TET) denir. Bu tekniklerin GIFT' ten en önemli farkı ve yararı fertilizasyonun olup olmadığının belirlenebilmesidir (42).

Yardımcı üreme teknikleri kullanımına dair ilk belge 1783 yılında Spallazani'nin yapay olarak döllenmiş bir köpekten elde ettiği yavrulardır. Ancak ilk ciddi belgeler 1900 lü yıllarda Rusya'daki İvanov okulunda at, koyun ve sığırlarda kullanılmak amacıyla geliştirilen yapay vajina ve döllenme tekniklerine ait çalışmalar (46). Çiftlik hayvanlarında suni döllenme çok önemli bir görev üstlenmektedir. Çünkü bir erkek ejakulatı milyonlarca spermatozoa içerir ve bu spermatozoalarla teorik olarak binlerce dişi döllenebilir. YÜT konusunda büyük atılım 1940'ların sonlarında İngiltereden bir ekibin hayvan spermatozoalarının dondurularak saklanması sağlayacak tekniği duyurması oldu. Aynı zamanda dişi gametlerin elde edilmesi ve manipülasyonları ile ilgili yöntemlerde de gelişmeler rapor edildi. Folliküllerinden kurtulup uygun medyumlar içinde kültüre edilen tavşan primer oositlerinin mayoza kaldıkları yerden devam ettikleri yani *in vitro* maturasyonunun gerçekleştirildiğine dair ilk çalışmanın yayınlanmasının üstünden 50 yıldan fazla süre geçti. 1968 yılında İrlanda' da bir ekip ilk olarak sığır

oositlerinin *in vitro* nükleer maturasyonunu rapor etmişlerdir. İlk yardımcı üreme teknikleri prosedürü 1960 ların sonunda tavşanlar üzerinde gerçekleştirildi ve daha sonra bu teknik fallop tüplerinin zarar görmesi ya da tıkanması sonucunda oluşan insan infertilitesinin tedavisinde kullanıldı (40, 43, 45). Hayvanlar üzerinde başarıyla uygulanan bu IVF teknikleri insanlar için geliştirildi ve ilk kez 1973'te vücut dışında dölleme başarılı oldu. Fakat dölleme sonrası oluşan embriyo rahime yerleşmemiş yani "implante olamamış" ve düşükle kaybedilmişti 1978'de İngiltere'de, Dr. Steptoe ve Dr. Edwards'ın yönettiği ekibin geliştirdikleri bir teknikle ilk tüp bebek olan "Louise Brown" doğmuştur. Bu aşamadan sonra hedef yumurtlama tedavilerinin geliştirilmesine doğru ilerlemiştir (40, 44). Neredeyse 50 yıldır yardımcı üreme laboratuvarlarında ve genetik laboratuvarlarında uygulanan tekniklerle çok hızlı ilerlemeler gözlenmektedir. Örneğin 1960'lı yıllarda başlayan gametlerin yani oosit ve sperm hücrelerinin *in vitro* maturasyonu üzerine yapılan çalışmalar hala devam etmekte ve maturasyonda görev alan moleküller tespit edilmeye çalışılmaktadır. Sperm maturasyonu özellikle steril erkeklerin tedavisinde umut vadetmekteyken oositler içinde ovulasyonun indüksiyonun yerine geçecektir (47). İlerleyen yıllarda çocuk sahibi olmak isteyenler için ovaryum dokusunun dondurularak istenildiğinde primordial folliküllerden oosit eldesi çalışmaları hızla gelişmektedir (38).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. 1. Kullanılan Cihazlar

- Hassas Tartı (Denver Instrument Company, USA)
- Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- Mikropipetler -10µl, 20µl, 200µl ve 1000µl- (Gilson, USA)
- Vorteks (Clifton Cyclone, UK)
- PH Meter (Metle Toledo MP 2200, UK)
- Masaüstü Makro Santrifüj (Mistral 1000 MSE, UK)
- Stereo mikroskop (Nikon SMZ 645, Japan)
- Invert mikroskop (Nikon T1-SM, Japan)
- Floresan mikroskop (Olympus BX51, Japan)
- CO₂'li inkübatör (Thermo Forma, USA)
- Laminar Flow (Steril-VBH Poste de securite Microbiologique Type II, Categorie 2 1190X580X685, France)

3. 1. 2. Kimyasal Maddeler

- M2 medyumu (Sigma, USA)
- M16 medyumu (Sigma, USA)
- HTF (IVF) medyumu (Millipore, USA)
- PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin) (Sigma, USA)
- hCG (human chorionic gondotropin) (Sigma, USA)
- Hyaluronidaz (Sigma, USA)
- Hafif mineral yağ (Sigma, USA)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- Penisilin/Streptomisin (Biological industries, Israel)
- Paraformaldehit (Sigma, USA)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Sigma, USA)
- Primer Antibody Diluent (Pleasanton, USA)
- Gel Mount Aqueous Mounting (Sigma, USA)
- Monoklonal anti- α -tubulin-FITC (Sigma, USA)
- DAPI (Fluka, USA)
- Phalloidin konjugeli TRITC (Sigma, USA)

3. 2. Süperovulasyon

Süperovulasyonda, ovule olan oositlerin sayısını arttırmak amacıyla, çiftleşmeden önce dişilere gonadotropinler uygulanır. Pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma G-4877) FSH etkilidir ve follikülü uyaran doğal hormonu taklit eder. Human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma C-8554) ise LH etkilidir ve ovulasyonu sağlayan doğal hormonu taklit eder (47, 48).

3. 2. 1. Gonadotropinlerin Hazırlanışı

Çoğu soylarda PMSG'nin önerilen çözeltisinde dozu intraperitoneal 5 I.U. dir. Uygulamadan önce, PMSG %0.9 NaCl çözeltisinde 50 I.U./ml olarak sulandırıldı. Oligotlara bölünerek -20 °C'de kullanıma dek saklandı. Hazırlanan bu çözeltiden, her hayvana intraperitoneal olarak 0.1 ml enjekte edildi.

hCG ikinci gonadotropindir ve ovulasyonu uyarmak ve sağlamak için verildi. Çoğu fare soyunda, hCG'nin 2.5 I.U.'lik dozunun yeterli olmasına rağmen, hayvan başına genellikle 5 I.U. uygulandı. 50 I.U./ml'lik stok olarak hazırlanan ve oligotlara bölünerek -20 °C'de ışıktan korunarak saklanan bu hormon her hayvana intraperitoneal olarak 0.1 ml enjekte edildi (47, 49, 50).

3. 2. 2. Gonadotropinlerin uygulama zamanı

Gonadotropinlerin verilme zamanı uniform, yani aynı gelişim dönemindeki embriyoların elde edilmesine etki eden fare odasının ışık siklusu ile yakından ilgilidir. Çoğu soylar için, PMSG ve hCG enjeksiyonları arasındaki uygun zaman aralığı 42-48 saattir. Genellikle, ovulasyon, hCG enjeksiyonundan 10-13 saat sonra meydana gelir. Fertilizasyon ise, ovulasyondan 1-2 saat sonra şekillenir. Ovulasyon zamanını kontrol etmek için, hCG'nin endojen LH salgılanmasından en az 2-3 saat önce uygulanması önemlidir. Endojen LH salgılanması PMSG enjeksiyonunu takiben ikinci karanlık periyodun orta noktasından 15-20 saat sonra meydana gelir. PMSG'ye cevap olarak salgılanan endojen LH'nin zamanı aydınlık karanlık siklusu ile düzenlenir. Bu çalışmada, 14 saat aydınlık 10 saat karanlık ışık siklusu uygulandı (47, 49).

3. 3. Medyum ve Kullanılan Enzimlerin Hazırlanması

3. 3. 1. M2 Medyumunun Hazırlanması

Elli ml M2 içine 0.5 ml penisilin/streptomisin çözeltisi katıldı. (Karışım oligotlanarak +4 °C'de 1 ay bozulmadan saklanabilir)(49).

3. 3. 2. M16 Medyumunun Hazırlanması

Elli ml M16 içine 0.5 ml penisilin/streptomisin çözeltisi katıldı. (Karışım oligotlanarak +4 °C'de 1 ay bozulmadan saklanabilir) (49).

3. 3. 3. Hyaluronidaz Çözeltisinin Hazırlanması

60 mg hyaluronidaz tartılıp 1000 µl distile su içine katılarak ana stok hazırlandı. Bu ana stoktan otomatik pipetle 160 µl alınıp 1 ml'lik ependorf tüplere bölündü. Daha sonra her tüp 1 ml'ye tamamlanarak 2. stok çözelti hazırlandı. Tüpler -20 °C'de saklandı. Enzim kullanılacağı zaman 300 µg/ml olacak şekilde hesaplanarak 2. stok çözeltisinden 30 µl alınıp M2 ile 1 ml'ye tamamlandı (47).

3. 4. Oositlerin Toplanması ve Kültürü

3. 4. 1. Oositlerin Toplanması ve *İn Vitro* Maturasyonu

- 14 saat aydınlık 10 saat karanlık ışık periyodunda en az iki hafta bırakılan 4-6 haftalık dişi fareler süperovulasyon için kullanıldı (sabah 8:00 de ışık kapanıp akşam 18:00 de açıldı). Bu koşullarda barındırılmış farelere saat 18:00'da 5 ünite PMSG hormonu intraperitoneal enjeksiyonla verildi (47, 49).
- PMSG enjeksiyonundan yaklaşık 48 saat sonra, intraperitoneal olarak 200 mg/kg pentotal sodyum enjekte edilmiş dişi fareler servikal dislokasyon ile öldürüldü. İçinde M2 medyumunu bulunan petriye alınan ovaryumun 27 ga'luk iğne kullanılarak ensizyonu ile germinal vezikül

aşamasındaki oositler toplandı. Kumulus hücreleri, mekanik olarak cam pipetle uzaklaştırıldı (47, 49, 51).

- Toplanan oositler enzimsiz M2 medyumunda 3 kez yıkandıktan sonra 0.5 ml penisilin/streptomisin içeren M 16 kültür medyumunda 37 °C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 13 saat kültüre edildi (49, 51).
- İnkübasyonun başlangıcından itibaren çeşitli zaman dilimlerinde oositler invert mikroskop altında kontrol edildi ve I. polar cisimciğin gözlemlenmesi ile germinal vezikül aşamasında toplanan oositlerin nükleer maturasyonunu tamamladığı kabul edildi (52).
- Kültürdeki oositler, 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 8, ve 12-16.saatlerde immünfloresan görüntü alabilmek için toplandı (51).

3. 4. 2. Fare Yumurtalarının *In Vitro* Fertilizasyonu

- **Süperovulasyon:** 14 saat aydınlık 10 saat karanlık ışık periyodunda en az iki hafta bırakılan 4-6 haftalık dişi fareler süperovulasyon için kullanıldı (sabah 8:00 de ışık kapanıp akşam 18:00 de açıldı). Bu koşullarda barındırılmış farelere saat 18:00'da 5 ünite PMSG hormonunun intraperitoneal enjeksiyonu yapıldıktan 48 saat sonra, saat 18:00'da 5 ünite hCG intraperitoneal olarak verilerek fareler yumurta eldesine kadar aynı koşullarda bekletildi (47, 49, 51, 52).
- IVF uygulamasından bir gün önce ya da minimum 3 saat öncesinde IVF medyumunun 1x1000µl ve 50 şer µl'lik mikrodamlar kültürleri üstleri mineral yağ ile kaplanarak 35 mm'lik steril petri kaplarına hazırlandı. Hazırlanan petri kabı %5'lik CO₂ ve 37°C de inkübasyona bırakıldı (47, 49).
- IVF uygulamasından en az bir saat önce M16 medyumuna içeren 2 farklı 35 mm'lik petri kabında mikrodamlar hazırlandı. M16 medyumuna içeren bu

iki kaptan biri yıkama amaçlı kullanılırken diğeri kültür için kullanıldı (49).

- **Sperm eldesi:** hCG enjeksiyonundan 12 saat sonra erkek fareler öldürüldü ve erkek fareden iki adet epididimis IVF medyumu içine alındı. Yağlarından ince pensler yardımı ile temizlenen kauda epididimisler ve vas deferensler 1000µl dengelenmiş IVF medyumu içine alındı. Sperm hücrelerinin medyuma geçmesini sağlamak için ince bir pens yardımıyla epididimis ve vas deferensler sıvazlandı. Petri 10-20 dakika %5 CO₂li ortamda sperm hücrelerinin hareketine olanak sağlamak için bırakıldı. Bu süre sonunda 2×10^6 spermatozoon/ml olacak şekilde konsantrasyon hesabı yapıldı. Altmış-doksan dakika %5 CO₂'li ortamda kapasitasyon için bekletildi (52).
- **Yumurta eldesi:** hCG enjeksiyonundan 12.5-13 saat sonra süperovule dişilerin oviduktlarından yumurtalar alındı. Enzimli M2 medyumunun içinde yaklaşık 5 dakika bekletildi. Sonra enzimsiz M2 içinde 3 kez yumurtalar yıkanıp ve fertilizasyona kadar dengelenmiş 50'şer mikrolitrelik IVF medyumu içinde 10'ar adet yumurta olacak şekilde, 37°C, %5 CO₂'li inkübatör şartlarında bekletildi (47, 49, 52, 53).
- **Fertilizasyon:** hCG enjeksiyonundan en geç 13.5-14 saat sonra IVF yapılmalıdır. Bunun için daha önceden hazırlanmış ve içerisinde yumurtaların bulunduğu IVF medyumu içerisine 100µl sperm süspansiyonu steril pipet ve uçlar kullanarak ilave edildi. Yaklaşık 5-6 saat süreyle, fertilizasyon için 37°C, %5 CO₂ ve yüksek nem şartlarındaki etüvde sperm hücreleri oositler ile birlikte inkübe edildi (47, 53).
- Bu süre sonunda hücreler M2 medyumuyla yıkanıp ılık ve dengelenmiş M16 medyumunda 37 °C'de % 5'lik CO₂'li etüvde fiksasyon ve boyama aşamasına kadar kültüre edildi (53).

3. 5. Oosit ve Zigotların Fiksasyonu ve İmmünboyanması

- Oosit kültürünün başlangıcından itibaren 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 8, ve 12-16. saatlerde ve IVF den sonra 24. saatte 2 hücreli 48. saatte 4, 54. saatte 8 hücreli ve 5,5-6 günde blastosist aşamasındaki embriyolar mikrotübül, mikrofilament ve kromozom analizi için üç kez PBS de yıkandı (49,54).
- PBS'de %4'lük paraformaldehit çözeltisinde 60 dk oda ısısında fikse edildi (54).
- Fiksasyon sonrasında, oositler 3 er değişim 5 dk PBS den geçirildikten sonra PBS'de % 0.1 triton X 100 ile 10 dk oda ısısında permeabilize edildi (55).
- Permeabilizasyon sonrasında hücreler, PBS'de % 0.1'lik BSA içinde 10 dk oda ısısında muamele edildi (55).
- Hücreler, monoklonal anti- α -tubulin-FITC antibodysinin 1:50 oranındaki çözeltisinde 37°C'de 90 dk inkübe edildi (49, 54).
- Mikrotübüller bu şekilde işaretlendikten sonra, oositler %0.1 BSA ve %0.1 Triton-X-100 içeren PBS de üçer kez ve iki kezden fazla da PBS'de yıkandı (51, 52, 53, 55).
- Oosit ve embriyolarda aktin hücre iskeletini gösterebilmek içinse 37°C'de 45 dk phalloidin konjugeli TRITC ile inkübe edildi (55).
- F-aktin bu şekilde işaretlendikten sonra, oositler ve embriyolar %0.1 BSA ve %0.1 Triton-X-100 içeren PBS de üçer kez ve iki kezden fazla da PBS'de yıkandı (51, 52, 53, 55).

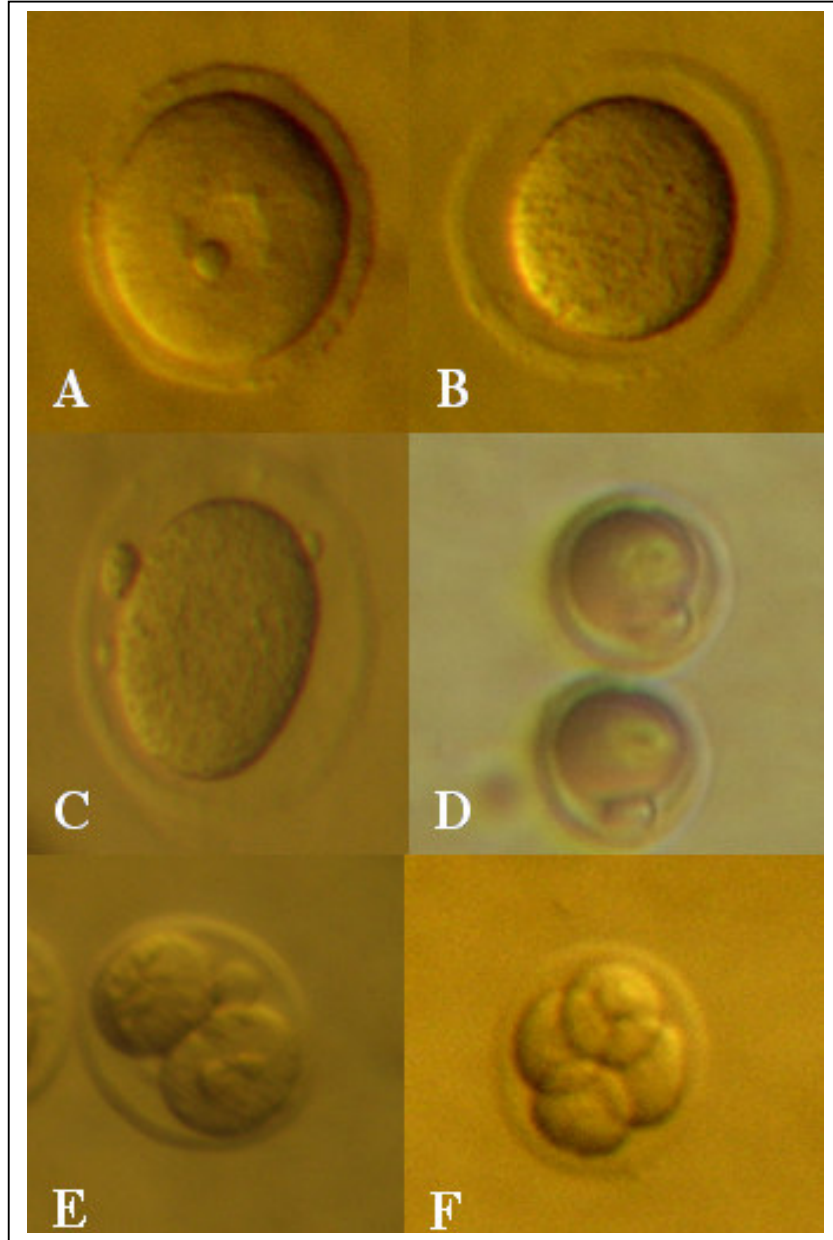
- Daha sonra kromozomların görünür hale gelmesini sağlamak için oositler ve embriyolar, oda ısısında 15 dk DAPI ile inkübe edildi (49, 54,).
- Boyama işleminin ardından oositler ve embriyolar, antifade medyumla kapatılıp immünofloresan mikroskofta incelendi (49, 51, 52, 53, 55).

4. BULGULAR

Oosit kültürünün başlangıcından itibaren 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 8, ve 12-16. saatlerde oositlerde ve IVF den sonra 24. saatte 2 hücreli, 48. saatte 4, 54. saatte 8 hücreli ve 5,5-6 günde blastosist aşamasındaki embriyolarda, kromozom, mikrotübül ve mikrofilament dağılımları ve organizasyonları üçlü boyama tekniği kullanılarak floresan mikroskopta belirlendi.

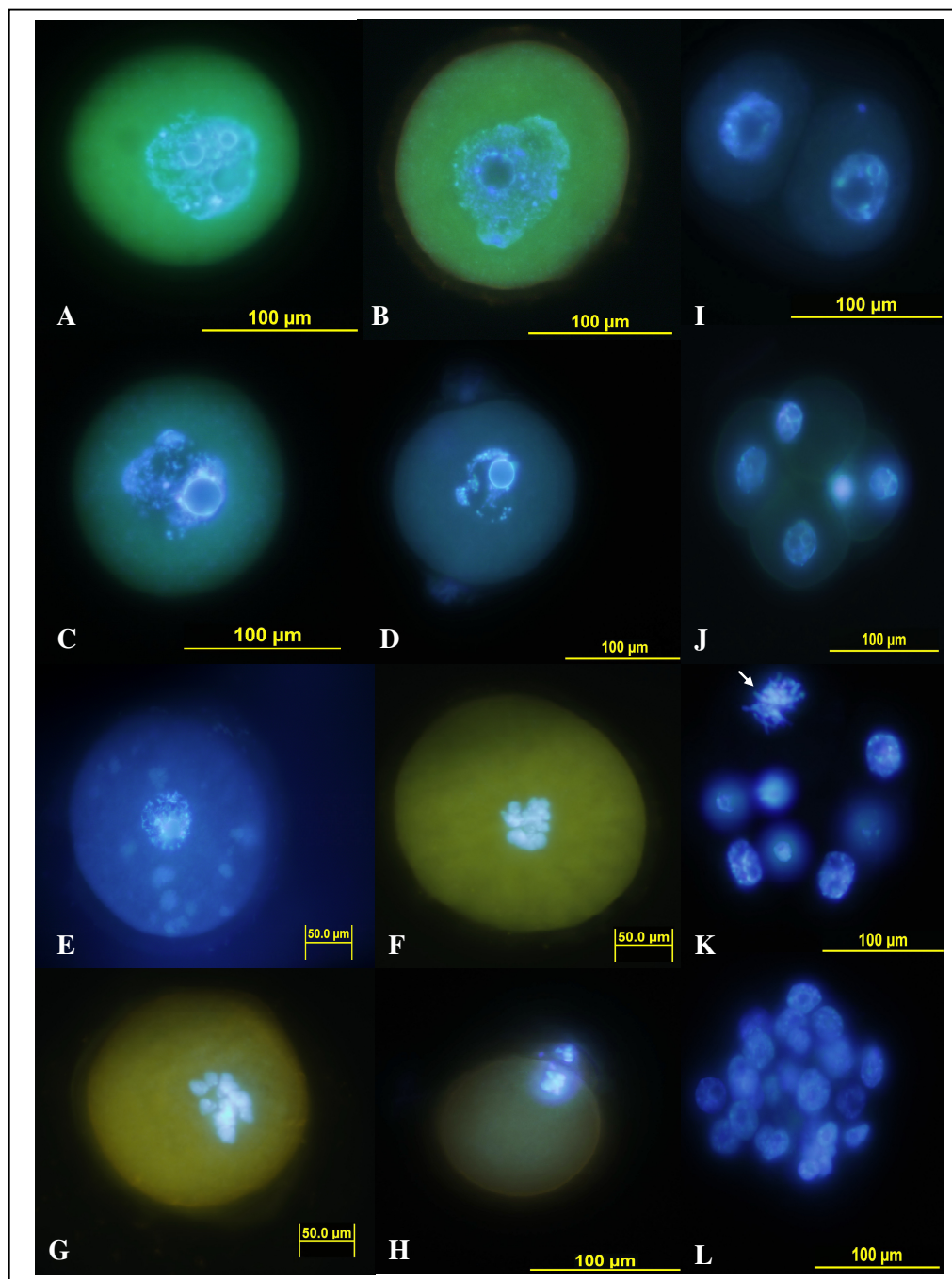
Farklı gelişim basamaklarındaki oositlerde ve *in vitro* fertilizasyon sonrası elde edilen embriyolarda kromatin dağılımının belirlenebilmesi için oosit ve embriyolar DAPI ile muamele edildi ve Olympus BX51 marka floresan mikroskobun U-MNIGA3 filtresi ile görüntülendi. Kültürün başlangıcında toplanan oositlerin hepsi germinal vezikül (GV) aşamasındaydı (Şekil 7. A ve Şekil 8. A). Kültürün 0., ½., 1. ve 1,5. saatlerinde fikse edilerek DAPI ile boyanan oositlerin nükleuslarının ve bir ya da iki belirgin nükleoluslarının oositin merkezinde buldukları gözlemlendi (Şekil 8. A, B, C ve D). Kültürün başlangıcından iki saat sonra oositlerin hepsinin, germinal vezikül bozulmasına (GVBD) uğradıkları belirlendi (Şekil 7. B, Şekil 8. E). Bu iki saatlik süre içinde oositler diakinezin hem erken hem de geç fazına doğru bir gelişim gösterdiler. Kültürün 8. saatinde kromatinler kondanse hale geldiler ve DAPI ile daha iyi reaksiyon verdiler (Şekil 8. F). 11. saatte ise kondanse olan kromatinler kalın kromozom yapılar oluşturdular (Şekil 8. G). 12-16. saatlerde ise I. polar cisimcik oluştu ve kromozomlar zamanla yığınlar oluşturdular (Şekil 7. C, D, Şekil 8. H). *In vitro* fertilizasyon sonrası kültüre alınan preimplantasyon embriyoları, 24. saatte 2 hücreli (Şekil 7. E, Şekil 8. I), 48. saatte 4 hücreli (Şekil 7. F, Şekil 8. J), 54. saatte 8 hücreli (Şekil 8. K), 5,5. gündeysen blastosist safhasına (Şekil 8. L) ulaştı. 1-7 hücreli safhada bütün blastomer nükleusları hücrenin merkezinde veya merkezine yakın yerde gözlemlendi. Ancak blastomerlerde nükleus hücre kontakt bölgelerinin bazal yarıklarına yakın gözlemlendi (Şekil 8. J). Sekiz hücreli safhada ve blastosist aşamasında bir çok nükleus benzer şekilde hücrenin merkezinde lokalize olarak gözlemlendi (Şekil 8. J, K). Sekiz hücreli safhada okla gösterilen alanda diğer blastomerlerden farklı olarak metafaz safhasında bir blastomer görülmektedir (Şekil 8. J).

Oosit matürasyonu süresince ve fertilizasyon sonrası elde edilen embriyoların hücre iskeleti görünüşleri ise çeşitli zaman dilimlerinde, immünfloresan teknikler kullanılarak belirlendi. Üç tip hücre iskeleti elemanından mikrotübül ve mikrofilementler fare oositlerinde açıkça gözlemlendi. Önemli hücre iskeleti elemanlarından mikrotübüller, monoklonal anti- α -tubulin-FITC antikoru (1:50) (Olympus BX51 marka floresan mikroskopun U-MWB2 filtresi ile), mikrofilamentler ise, phalloidin konjugeli TRITC kullanılarak (Olympus BX51 marka floresan mikroskopun U-MWIY2 filtresi ile) oosit ve embriyolarda görüntüldü. Mikrotübüllerin, fare oositlerinin matürasyonu süresince ooplazma boyunca nispeten tekdüze bir dağılım gösterdiği belirlendi. Mikrotübüller, metafaz I safhasında mayotik iğ iplikçiklerinde konsantre olup matür oositlerde her mayotik bölünmenin metafazında, sıralanmış kromozomları çevreleyen mayotik iğ iplikçiklerinde yoğunlaştılar. Mikrotübüller interfaz süresince sitoplazmada bir ağ şeklinde bulunmakta (Şekil 9. B, B* ve b) olup mayoz bölünme ve karyokinez süresince ise sadece mayotik iğ iplikçikleri şeklinde bir çift kromozom seti çevresinde gözlemlendi (Şekil 10. D, E, B*, D*, b ve d). Mikrofilamentler, GV aşaması süresince kortekste belirgin olmak üzere ooplazmanın her tarafında dağılmış halde (Şekil 9. A, A* ve a), GVBD sonrasında ise oositin çoğunlukla subkortikal bölgesinde yoğunlaştıkları gözlemlendi. Matür oositlerde (MII), mikrofilementler temel olarak kortekste gözlemlendiler (Şekil 10. A, A*, D*, a ve d). Ancak daha büyük konsantrasyonda hücre yüzeyine yakın yerde ve paralel konumlanan mayotik iğ iplikçığının üzerindeki bölgede bulukları gözlemlendi (Şekil 10. A, D ve d). *In vitro* fertilizasyon sonrası gerçekleşen sitokinez süresince korteksin yarıklanma çizgisinde verdiği floresan yansıma korteksin geri kalanından daha yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 11. A, A*). Mikrofilamentlerin, temel olarak blastomerlerin hücre membranının hemen altında ve özellikle hücre-hücre temas bölgelerinde konsantre oldukları gözlemlendi (Şekil 11. A, A*, Şekil 12. A, a ve Şekil 13. A, a).

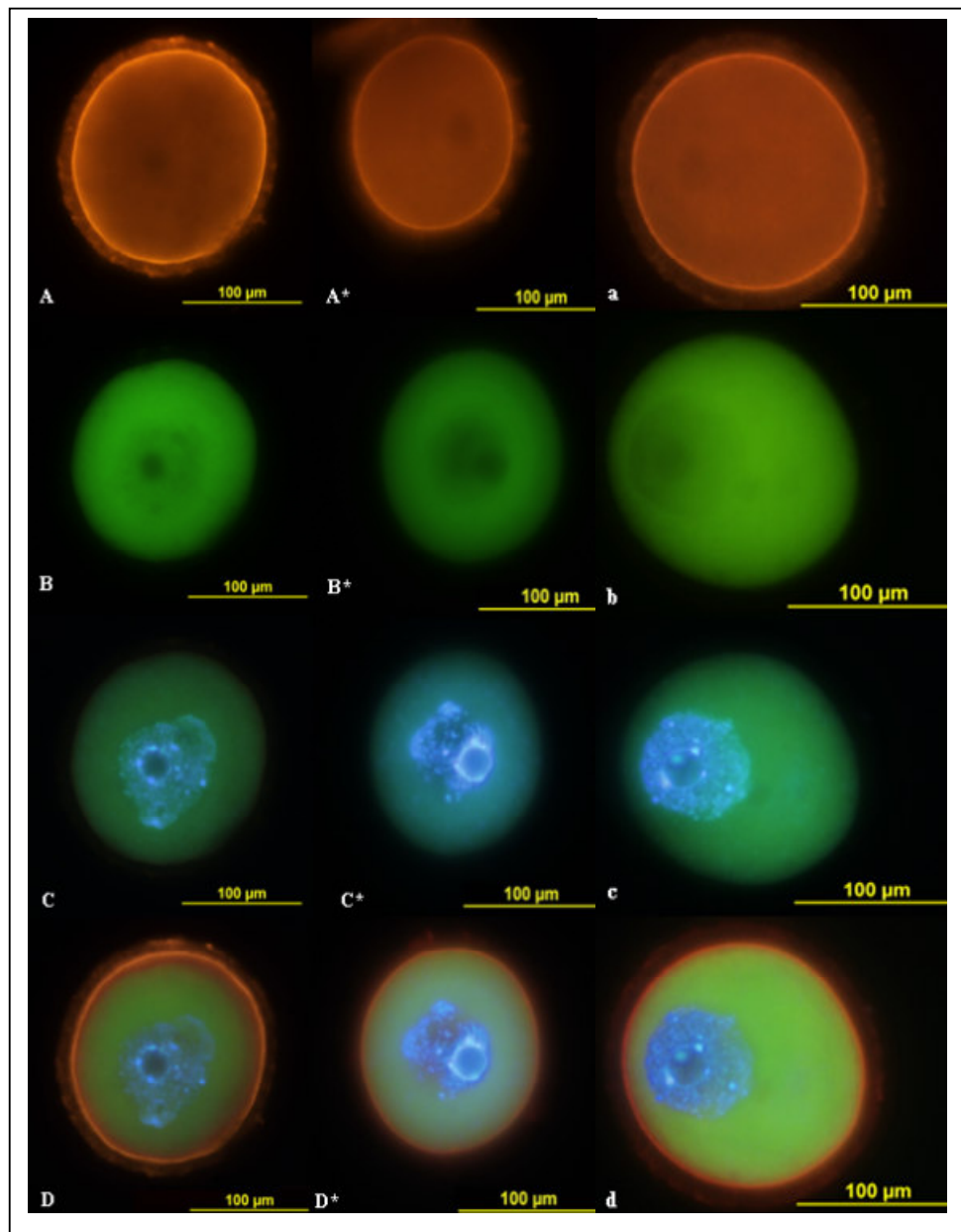


Şekil 7. A, Germinal Vezikül (GV) safhasında, B: Germinal Vezikül bozulumu (GVBD) safhasına, C ve D: MII safhasına ulaşmış oositlerin, E: *in vitro* fertilizasyon sonrası 24.saatte elde edilen 2 hücreli ve 48. saatte elde edilen 4 hücreli embriyonun stereomikroskop görüntüleri. Büyütme 100X

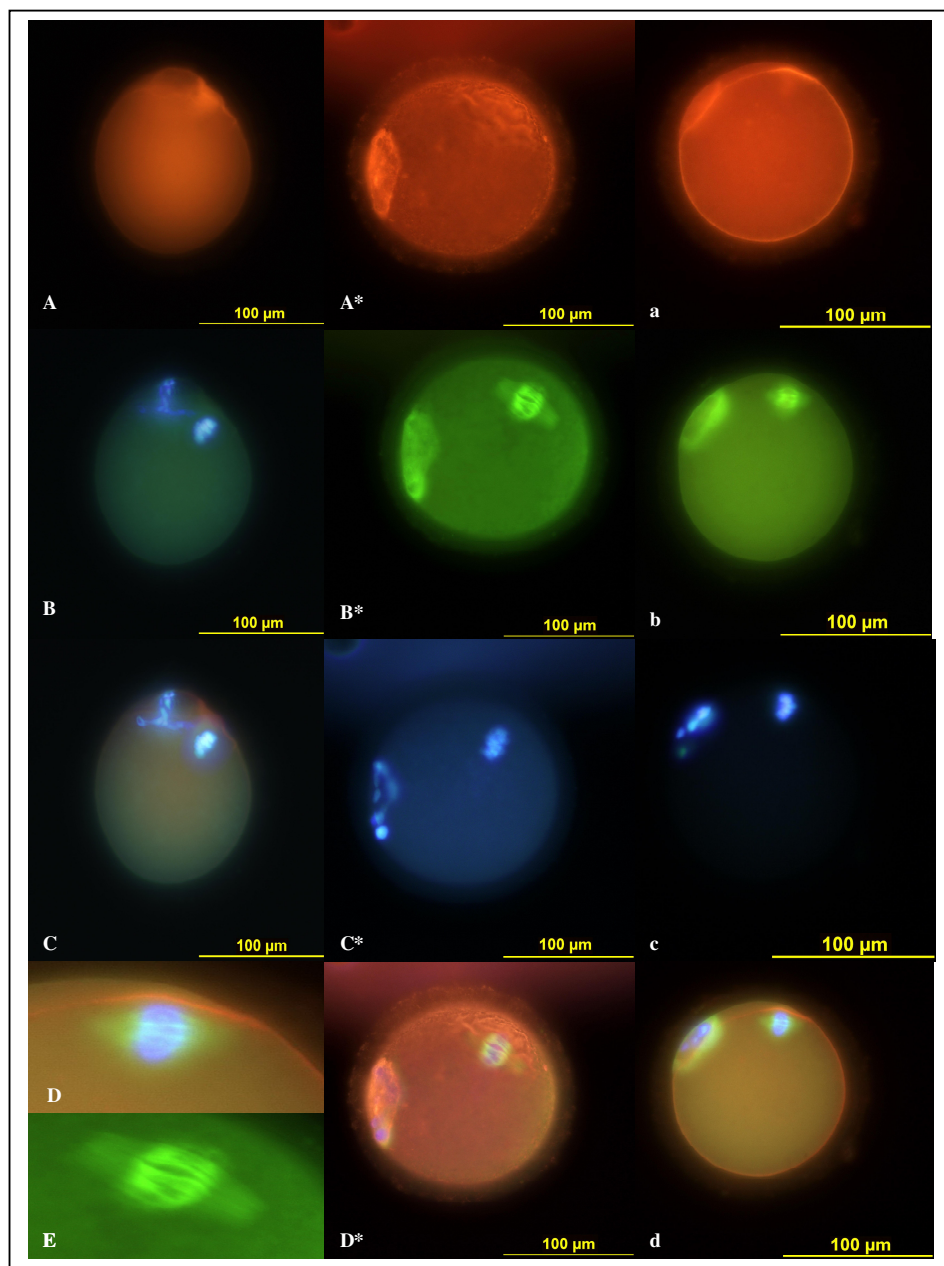
Şekil 8. Fare oositlerinin mayotik maturasyonu süresince ve preimplantasyon embriyolarında kromatin yapıları gösterilmiştir. DNA (mavi), DAPI ile işaretlenerek floresan mikroskopta görüntülendi (10 µg/ml). A, 0.saatte, B, 1/2. saatte, C, 1. saatte ve D, 1 ½. saatte kültürden alınarak işaretlenen oositlerin görüntüleri. Kültürün 2. saatinde germinal vezikül bozulumu (GVBD) gerçekleşti (E). Kültürün 8. saatindeki oosit (F). Kültürün 11. saatindeki oosit (G). Kültürün 12-16.saatlerde I. polar cisimciği oluşmuş MII safhasında oosit (H). İn vitro fertilizasyon sonrası kültüre alınan preimplantasyon embriyoları (I, J, K, L). 24. saatte 2 hücreli (I), 48. saatte 4 hücreli (J), 56. saatte 8 hücreli (K), 5.5. gündeysel blastosist safhasına (L) ulaşan embriyoların floresan mikroskopik görüntüleri.



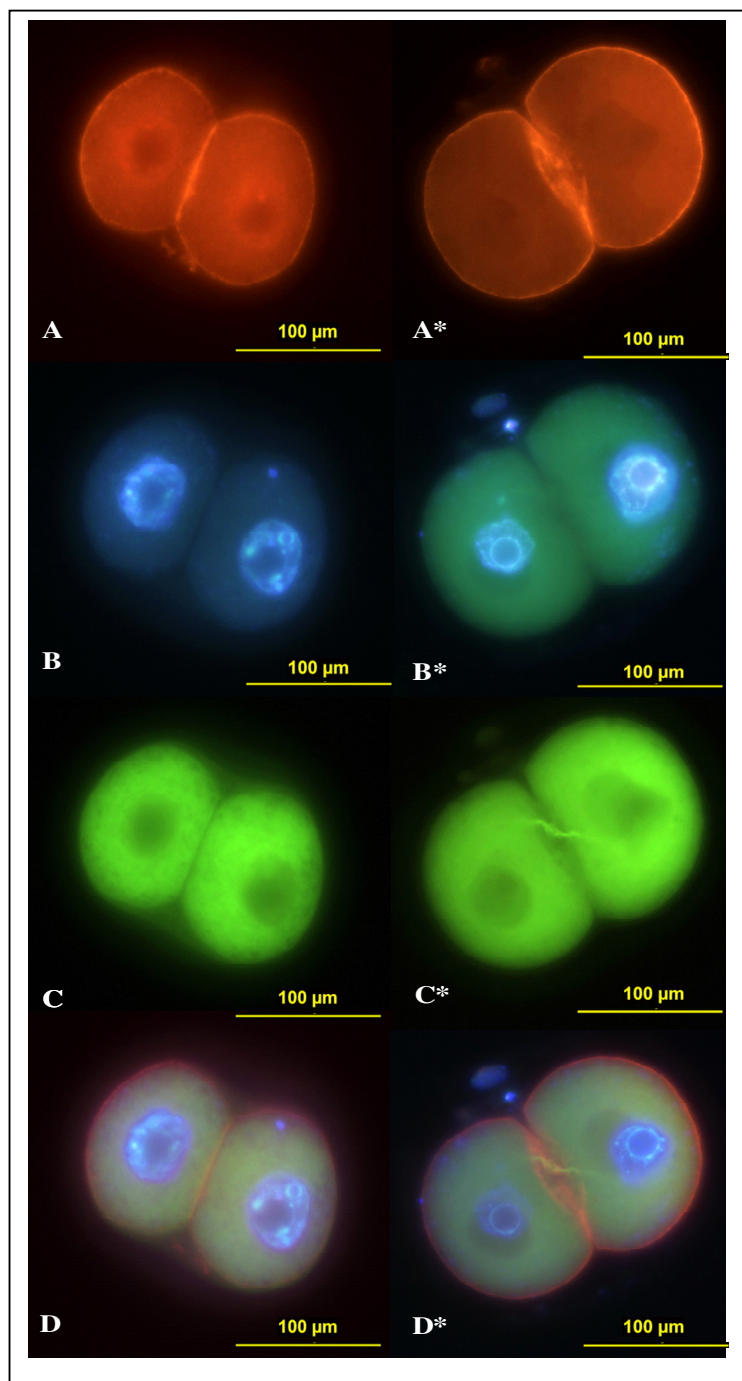
Şekil 9. DNA, DAPI (mavi) ile mikrotübüller, monoklonal anti- α -tubulin-FITC antibodysi (yeşil) (1:50) ve mikrofilamentler ise, phalloidin konjugeli TRITC (kırmızı) kullanılarak immatür oositlerde görüntülendi. Kültürün başlangıcında görüntülenen GV evresindeki oositler. D, D* ve d DNA, mikrofilament ve mikrotübül görüntülerinin üst üste bindirilmesi ile elde edilmiş görüntülerdir. Çakıştırılmış görüntülerde, aktin hücre iskeletinin kırmızı floresan yansımayla oositlerin korteksinde dağılım gösterdiği, mikrotübüllerin yeşil floresan yansımayla oositin ooplazması içinde tekdüze bir dağılım gösterdiği ve nükleusların oositin merkezinde konumlandığı görülmektedir.



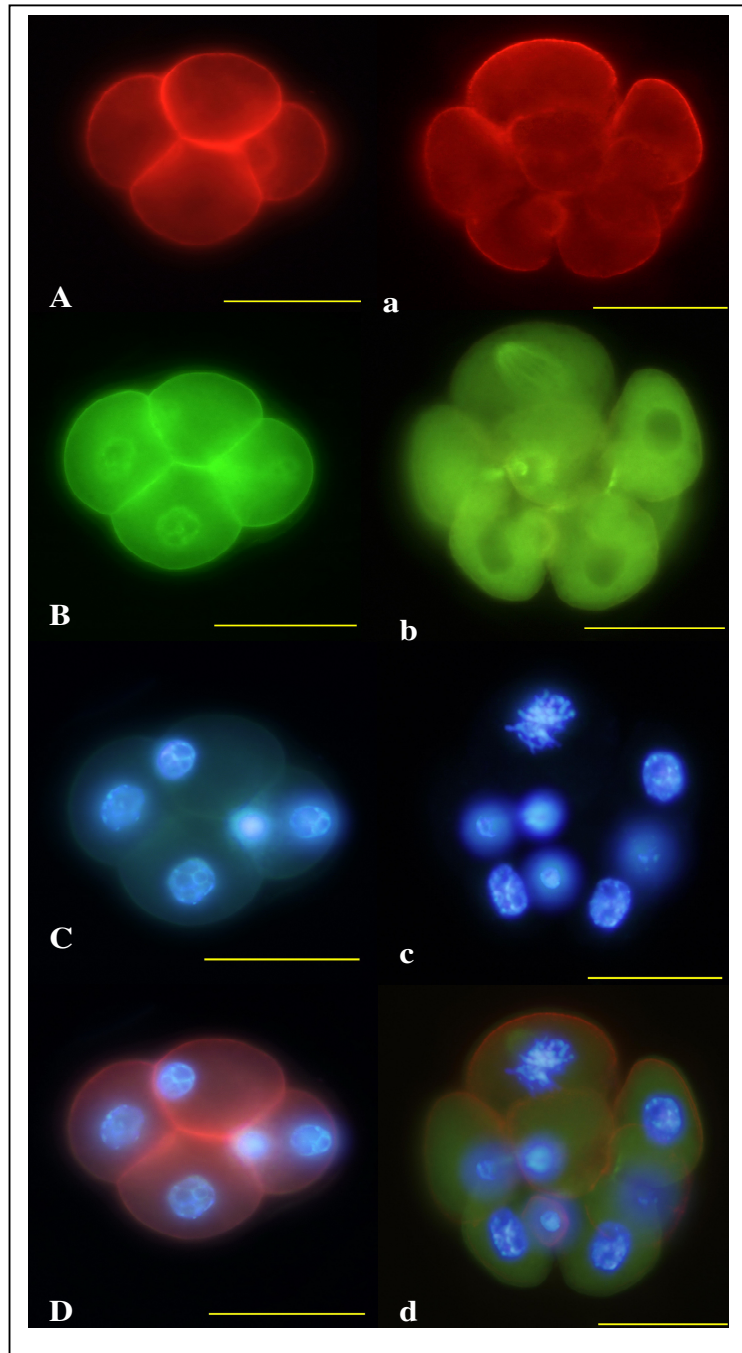
Şekil 10. MII evresindeki olgun oositlerde, DNA (mavi), mikrotübüller (yeşil) ve mikrofilamentler (kırmızı) immünfloresan yöntemler ile floresan mikroskopta görüntülendi. Mikrofilementlerin temel olarak kortekste buldukları ancak daha büyük konsantrasyonda hücre yüzeyine yakın yerde ve paralel konumlanan mayotik iğ iplikçığının üzerindeki bölgelerde buldukları gözlemlenmiştir. (A, C, D, A*, D*, a ve d). A, C ve D de polar cisimciğin şekillendiği alanda ve özellikle mikrotübüller ve mikrotübüllerle ilişkili kromozomların bulunduğu alanda mikrofilamentlerin oldukça kalınlaştığı ve (a ve d)daha güçlü floresan yansıma verdiği görülmüştür. E, anastral, varil şekilli ve oosit korteksiyle ilişkili mikrotübüllerin büyütülmüş görüntüsü. D* ve d, DNA, mikrotübül ve mikrofilament görüntülerinin karşılaştırılması ile elde edilmiş görüntülerdir.



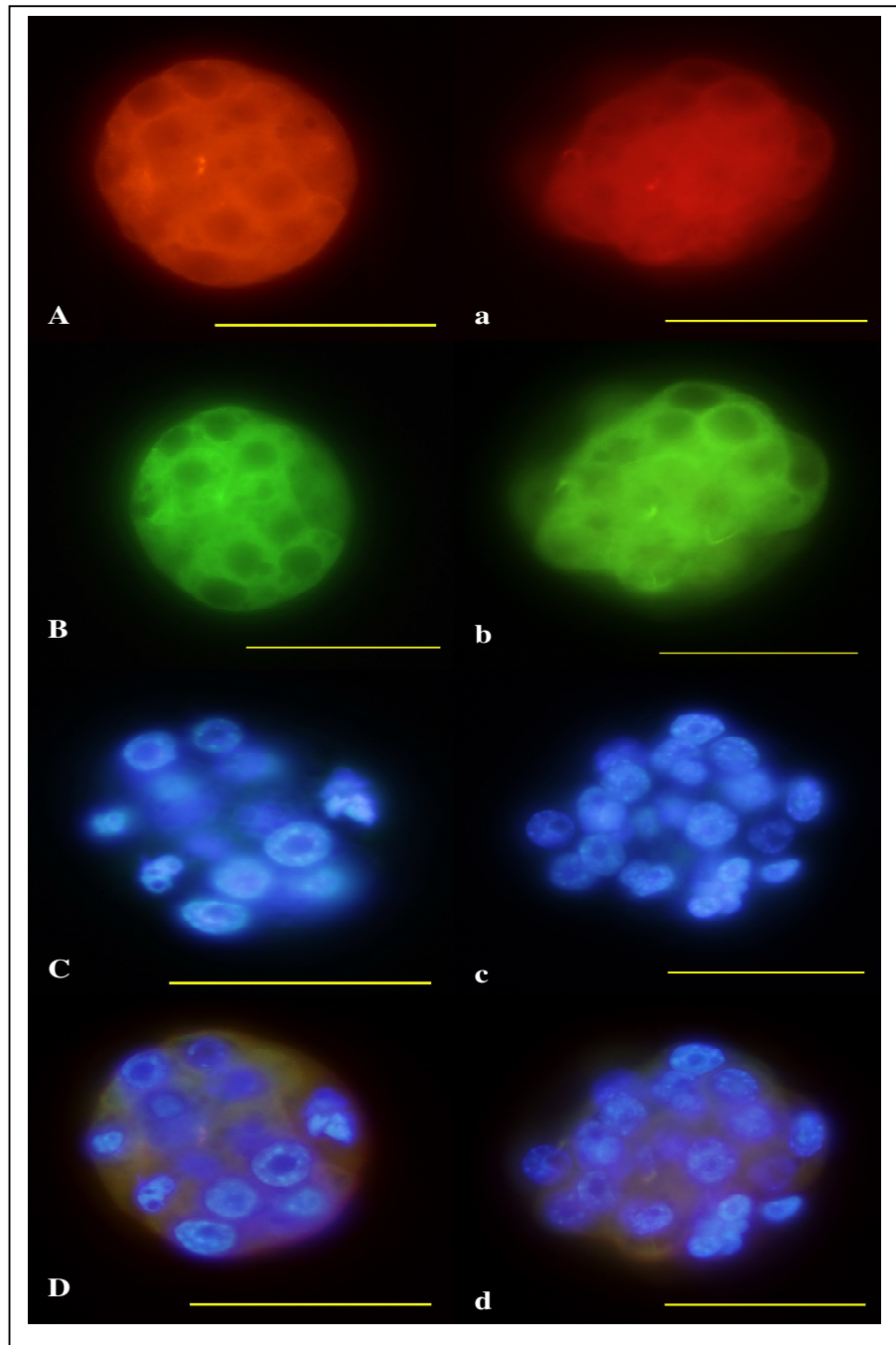
Şekil 11. İki hücreli embriyolarda, DNA (mavi), mikrotübüller (yeşil) ve mikrofilamentler (kırmızı) immünfloresan yöntemler ile floresan mikroskopta görüntülendi. Mikrofilamentlerin temel olarak hücre membranının hemen altında ve özellikle hücre hücre kontakt bölgelerinde konsantre oldukları gözlemlendi (A, A*, D, D*). 2 hücreli embriyoda interfaz safhasında mikrotübüller ooplazmada tek düze bir dağılım gösterirken (C), anafaz köprüsünün (midbody) C*'nde görülmektedir. Nükleuslar blastomerlerin merkezinde görülmektedir (B, B*, Dve D*). D* ve d, DNA, mikrotübül ve mikrofilament görüntülerinin çakıştırılması ile elde edilmiş görüntülerdir.



Şekil 12. Dört ve sekiz hücreli embriyolarda, DNA (mavi), mikrotübüller (yeşil) ve mikrofilamentler (kırmızı) immünfloresan yöntemler ile floresan mikroskopta görüntülendi. Mikrofilamentlerin, hücre membranının hemen altında ve özellikle hücre hücre kontakt bölgelerinde konsantre oldukları görülmektedir (A, a). Mikrotübüllerin, blastomerlerin interfaz evrelerinde sitoplazma içinde ağ şeklinde dağıldığı ancak karyokinez süresince bir çift kromozom seti çevresinde iğ iplikçikleri şeklinde, simetrik, bipolar, varil şekilli olduğu görülmektedir (b). 8 hücreli embriyoda, b ve c şekillerinde sırasıyla mikrotübüller ve metafaz safhasındaki kromozomlar görülmektedir. D ve d fotoğrafları görüntülerin çakıştırılması ile elde edilmiş görüntülerdir. Bar 100 µm.



Şekil 13. Blastosistlerde, DNA (mavi), mikrotübüller (yeşil) ve mikrofilamentler (kırmızı) immünfloresan yöntemler ile floresan mikroskopta iki boyutlu görüntülendi. Seviye farkından dolayı çok net görüntü elde edilemedi. Nükleusların blastomerlerin merkezinde, mikrotübüllerin blastomerlerin sitoplazmasını ağ gibi sardığını ve mikrofilamentlerin kompaksiyon alanlarında ve kortekste yoğun şekilde dağılım gösterdikleri izlendi. Bar 100 µm.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Üç hücre iskeleti elemanından 2 tanesi, mikrofilamentler ve mikrotübüllerin fare oositlerinde bulunduğu açıkça bilinmektedir. Ancak bu iki hücre iskeleti elemanının oositlerdeki organizasyonunun somatik hücrelerde gözlenenenden belirgin farklılıklar gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (57, 58).

Bu çalışmada hücre iskelet ağı (temel olarak mikrotübüller ve mikrofilamentler)'nin rolü ve yeniden organizasyonu farede oosit maturasyonu ve *in vitro* fertilizasyon sonrası preimplantasyon gelişimi süresince tanımlandı. Fare oositlerinin maturasyonu ve fertilizasyonu sonrasındaki yarıklanmalarında, hücre iskeletinin yeniden organizasyonunun, nükleer ve sitoplazmik bölünme sırasındaki değişiklikleri yönlendirdiği gösterildi. Bu, oosit ve preimplantasyon embriyolarının sırasıyla mikrotübül, mikrofilament ve kromatin yapılarının immünfloresan işaretleme ve immünofloresan mikroskopta incelenmesi ile gerçekleştirildi.

Bu çalışmada, mikrotübüllerin, germinal vezikül (GV) evresindeki fare oositlerinin ooplazması boyunca nispeten tekdüze bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Benzer sonuçlar, fare (57, 58, 60) ve at (61) oositleri üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Mattson ve Albertini, 1990 ile Messinger ve Albertini, 1991' nin yaptığı çalışmalarda germinal vezikül bozulumu (GVBD)' na doğru sitoplazmik mikrotübüllerin, GV'ün kenarında yoğunlaşmaya başladıklarını ve buradan ooplazmanın subkortikal alanının içine uzandıkları gösterilmiştir (78, 79). Bazı türler üzerinde yapılan çalışmalarda ise GV evresindeki oositlerde mikrotübüllere rastlanmamıştır (62).

Mitoz sırasında mikrotübüller tam olarak yeniden düzenlenirler. Mitoz esnasında hücrede interfaz evresinde mevcut olan mikrotübül ağı yıkılıp mitotik iği oluşturmak üzere yeniden yapılır. Bu yeniden yapılanma, sentrozomun mitotik iğin karşıt kutuplarında, iki ayrı mikrotübül organize edici merkez (MTOC) oluşturacak şekilde iki katına çıkması ile yönlendirilir. Birçok hayvan hücresinde MTOC, perisentriolar materyal (PCM) olarak adlandırılan elektron yoğun materyallerce çevrelenmiş bir çift sentrioldan oluşur. Mayotik iğ

iplikçikleri kutbu elektron dens PCM'nin bantlarından oluşur (56, 76). Her mayotik bölünmenin metafazında, mikrotübüller sıralanmış kromozomları çevreleyen mayotik iğ iplikciklerinde yoğunlaşırlar. GVBD ve kromozom yoğunlaşması mikrotübül ağının yeniden organizasyonunun tamamlanması ile gerçekleşir. Diğer memeli türlerinin oositlerinde, mayotik yeterliliğin gelişimi ile ilgili kromozom çevresindeki mikrotübüllerin eş zamanlı birikimi olmasına karşın, bu toplanma için uyarım tam olarak bilinmemektedir (62, 63). Buna karşın mikrotübüllerin toplanmasının sentrozomların fosforilasyonu ile sağlandığı da bilinmektedir (64).

Mikrotübüllerin, MII aşamasındaki olgunlaşmış oositlerde iyi organize olmuş iğ iplikçikleri şeklinde buldukları gözlenmiştir. İğ iplikçiklerinin simetrik, bipolar, varil şekilli ve oositin korteksine yakın yerde lokalize olduğu gözlenmiştir. Benzer bulgular, gerek farelerle yapılan çalışmalarda, gerekse diğer türlerde de gösterilmiştir (fare: 60, 65, 66; insan: 67; inek: 68 ; domuz: 62). Ancak ratlarda mayotik iğ iplikçiklerinin bu türlerden farklı olarak uzamış ve konik şekilli olduğu gösterilmiştir (77).

Fertilizasyon esnasında sitoplazmik mikrotübüller pronükleus göçüne katılırlar (69, 70). İki pronükleer membran yıkıldığında çok sayıda MTOC'ler kromozomların 2 seti çevresinde bulunurlar ve bir çok yarım iğ iplikçiği bu MTOC'lerden oluşur. Daha sonra varil şekilli mitotik iğ iplikçiklerinin kutupları bu MTOC'lerden şekillenir (56, 80, 81). İn vitro fertilizasyonun ardından fare preimplantasyon embriyolarında mikrotübüllerin kompaksiyon süresince yeniden dağılım gösterdikleri gözlemlendi. Her bir blastomerde mikrotübüller interfaz süresince sitoplazma içinde ağ şeklinde dağılım gösterirken karyokinez süresince sadece mitotik iğ iplikçikleri şeklinde bir çift kromozom seti çevresinde gözlemlendi.

Oosit maturasyonu süresince fare oositlerinde gözlenen mikrofilament organizasyonu insan ve domuz üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde sunulan sonuçlarla benzerlik göstermektedir (56, 63, 71). Mikrofilamentler hem sitoplazmik hem de yüzey kutbunda bulunurlar. Yani mikrofilamentler, GV aşaması süresince korteksin hemen altında ve temel olarak ooplazmanın her tarafında dağılmış halde oldukları, GVBD girerken ve sonrasında ise oositin

subkortikal bölgesinde daha fazla yoğunlaştıkları gözlemlendi. Yapılan çalışmalar GV safhasından GVBD safhasına geçişte gözlenen bu değişikliklerin mikrofilementlerin, GVBD sonrasında kromatinin uygun pozisyona taşınmasında görev aldığını göstermiştir (62, 72, 73). İnsan oositlerinde yapılan bir diğer çalışmada da mikrofilementlerin kortekste ve GV çevresinde yoğunlaştığı gözlenmiştir (83). Mikrofilamentlerin oosit maturasyonu süresince rollerini belirlemek amacıyla araştırmacılar, mikrofilament bozucu ajan sitokhalasin B kullanmışlar ve kromozomların oositte periferal pozisyona normal göçlerini gerçekleştiremedikleri ve polar cisim gelişiminin olmadığını rapor ederek mikrofilamentin maturasyon süresine üstlendiği görevi belirlemişlerdir (72). Bu nedenle aktin filamentlerin, oolemanın hemen altında polar cisimciğin oluşacağı uygun periferal lokasyonu sağlayan iğ iplikciklerini temin ettiği açıktır. Çalışmamızda, gelişimin ilerlemesi ile metafaz II safhasına ulaşan oositlerde mikrofilementlerin temel olarak kortekste buldukları gözlemlendi. Özellikle hücre yüzeyine yakın yerde ve paralel konumlanan mayotik iğ iplikçığının üzerindeki bölgede mikrofilamentlerin konsantrasyonunda artma izlendi. Yapılan çalışmalarla bu bölgenin aynı zamanda mikrovillilerden yoksun ve kortikal granüllerle fakir bölgeler oldukları ve mikrofilamentlerin organizasyonundaki bu değişimin oositin fertilizasyonu için gerekli olduğunu gösterdi (62, 71, 75, 83, 84, 85, 86). Bir mikrofilement inhibitörü olan sitokhalasin D kullanılarak yapılan çalışmalarda, mikrofilementlerin fertilizasyonda spermin girişi için gerekli olmadığını fakat iğ iplikçiklerinin rotasyonu, polar cisim oluşumu ve pronükleusların yumurtanın merkezine doğru göç etmesinde önemli olduğu gösterilmiştir (56, 87). Dolayısıyla spermatozoa, mayotik iğ iplikçiklerinin üzerindeki mikrofilamentçe zengin ve mikrovillilerle fakir bu alanda fertilizasyonu sağlayamaz (56). Çeşitli memeli türlerinin olgun oositlerinde yapılan çalışmalarla da mikrofilamentlerin, mayotik iğ iplikçiklerinin üzerinde hücre korteksinde lokalize oldukları gösterilerek, mikrofilementlerce zengin bu alanın mayotik iğ iplikçiklerinin devamlılığından ve kromozomların periferal pozisyonundan sorumlu oldukları sonucuna varılmıştır (62, 73, 74).

Fertilizasyondan sonra mayotik yarıklanma iğ iplikçiklerinin ekvatorunda korteksin aktince zengin bölgesinde şekillenir. İki aktince zengin çıkıntının birisi büzülerek yok olurken diğeri büyüyerek II. polar cisimciğın formasyonuna neden olur ve iğ iplikçiklerinin rotasyonunu sağlar. Bu iki aktince zengin, mikrovillusça fakir alan, pronükleuslar yumurtanın merkezine doğru göç ettiğinde ortadan kaybolur, işte bu sırada çok sayıda mikrofilement pronükleusların çevresinde görünebilir. Her iki mayotik kromozom ve yumurta korteksi arasında oldukça yakın bir ilişki vardır. Her maternal kromozom, özellikle dağılmamış sperm kaynaklı kromozomlar kortikal mikrofilementlerin toplanmasını ve membranın hemen altında mikrovillus yüzeylerinin kaybolmasını indükler. Polar bodyler kromozomlarla ilişkili bu kortikal domainlerde ortaya çıkar (56).

İn vitro fertilizasyon sonrasında elde edilen fare preimplantasyon embriolarında mikrofilamentlerin temel olarak hücre membranının hemen altında ve özellikle hücre-hücre temas bölgelerinde konsantre oldukları gözlendi. Mikrofilament yoğunluğu ikinci bölünme süresince hücrelerin birbiriyle temas etmeyen yüzeylerinde belirgin şekilde azaldı. Filamentlerin bu bölgede sürekli azalması sonraki embriyo gelişimi boyunca açık şekilde gözlendi. Benzer bulgular, gerek farelerle yapılan çalışmalarda gerekse hamster embriolarıyla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (fare; 80, hamster; 81, domuz: 82). Bu çalışmada mikrofilamentlerin hücre-hücre temas bölgelerinde serbest dış yüzeylerine oranla daha yüksek yoğunluğa sahip olduklarının gözlenmesi aktin hücre iskeletinin hücre-hücre ilişkisinde ve hücrelerin yassılaşmasında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (80).

Hücre iskeleti elemanlarından mikrotübül ve mikrofilamentlerde meydana gelen değişikliklerin, maturasyon süresince genetik materyalin yeniden organizasyonu ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada farede oosit maturasyonu süresince ve *in vitro* fertilizasyon sonrası elde edilen preimplantasyon embriolarında hücre iskeleti ile beraber kromatin dağılımı ve nükleus konumlanması da araştırıldı. Kültürün başlangıcında toplanan oositlerin hepsi germinal vezikül (GV) aşamasındaydı. Kültürün başlangıcında ovaryumdan toplanarak inkübe edilen GV-aşamasındaki oositlerin kromatin dağılımında

gözlenen değişikler profaz evresinde olan oositlerin mayoza kaldığı yerden devam etdebilmesi için gerekli olduğunu düşündürmektedir (2). Oosit kültüründen çeşitli zaman dilimlerinde fikse edilerek boyanan oositlerde nükleusun oositin merkezinde olduğu gözlemlendi. Gerek GV gerekse olgunlaşmış oositlerde kromatinlerin nükleolus çevresinde yoğunlaştıkları gözlemlendi. Bu gözlemler yapılan diğer çalışmalarla da desteklenmektedir (58, 59). Buna karşın tamamen büyüyen oositte kromatinin nükleusun her yerinde dağılmış olarak yer aldığı belirlenmiştir. Kültürün 8. saatinde kromatinler kondanse hale geldiler. 11. saatte ise kondanse olan kromatinlerin kalın kromozom yapılarını oluşturdukları gözlemlendi. 12-16.saatlerde ise oosit MII evresine ulaştı ve kromozomların metafaz evresinde iğ iplikçiklerinin üzerinde yığınlar oluşturdukları gözlemlendi. İn vitro fertilizasyon sonrasında elde edilen fare preimplantasyon embriolarının 1-7 hücreli blastomerlerinde blastomer nükleusları hücrenin merkezinde, merkezine yakın yerde ya da ara sıra hücre kontakt bölgelerine yakın yerde gözlemlendi. Reeve ve Kelly (81) 'nin yaptığı çalışmada 4 ve 8 hücreli blastomerlerde periferal olarak yerleşen nükleusların embriyonun merkezine yakın bölgede kümeler yaptıkları belirtilmiştir. Gözlemlenen nükleer göç, embriyo kompaksiyonunun zamanıyla uyumludur. Bu, embriyonik hücre farklılaşmasına yol açan erken embriyo gelişimi süresince önemli fizyolojik olaylardan birisidir. Embriyonik hücre nükleuslarının göçü embriyonik kompaksiyon süresince muhtemelen hücre iskeleti yapısının yeniden düzenlenmesine neden olur (81). Çalışmamızda nükleer göçün embriyo kompaksiyonu süresince mikrofilament ve mikrotübüllerin yeniden lokalizasyonu ile eş zamanlı olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada hücre iskeleti elemanlarından ooplazma içine dağılmış olan mikrofilament ve mikrotübüllerin oosit matürasyonu ve blastomerlerin interfaz evreleri süresince elde edilen görüntülerinde net şekilde ağ yapısı görüntülenememiştir. Bu, ooplazmanın gerek maternal determinatlar gerekse organel bakımından çok yoğun olması, oositin diğer vücut hücrelerinden daha büyük olması ve 100X lik büyütmede iki boyutlu görüntülerinde ağ yapısının yeterince floresan yansıma vermemesinden kaynaklanmaktadır.

Farede, sıçanda, domuzda ve insanda yapılan çalışmalarla fertilize olmamış oositlerde mikrotübül ve mikrofilament topluluklarının normal dağılımının başarılı bir fertilizasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir (62, 63, 71, 73, 84, 85, 86). Webb 1986, Funahashi 1996, Kim 1996, yaptıkları çalışmalarda yaşlı yada uygun olmayan koşullarda matüre edilen oositlerde, kromatinin mikrofilamentlerden zengin bölge dışında lokalize olabileceği ve bunun ileride normal olmayan embriyonik gelişime neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir (71, 88, 89). Dolayısıyla *in vivo* elde edilen oositlerde, *in vitro* matürasyonu yapılan oositlerden farklı olarak anormal mikrofilement birikimi ve metafaz kromatinlerinin uygunsuz pozisyonu gözlenebilir. Bu anormalliklerdeki artışın muhtemelen fertilizasyon sonrasında normal olmayan embriyonik gelişime neden olacağı düşünülebilir. Matürasyon sırasında uygun olmayan kültür koşulları mikrotübül ve mikrofilement gibi bazı sitoplazmik organellerin eksik matürasyonuna sebep olabileceğinden, gelişimin durmasına IVF'nin ve embriyo transferinin gerçekleşmemesine neden olabilir (63).

Sonuç olarak, bu çalışma ile fare oositlerin matürasyonu ve *in vitro* fertilizasyonu sürecinde hem mikrotübül hem de mikrofilamentlerin genetik materyalin yeniden organizasyonu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Oosit hücre iskeletinin, diğer sitoplazmik organellerin yeniden dağılması ve yapılanmasında üstlendiği roller düşünüldüğünde başarılı bir fertilizasyon ve sonrasında devam eden preimplantasyon embriyo gelişimi için yaşamsal roller üstlendiği söylenebilir. Hücre iskeleti elemanlarından mikrotübüller ve mikrofilemetlerin hücre içindeki organizasyonları ve ooplazma içindeki diğer organellerle olan ilişkilerinin aydınlatılması IVM, IVF, oosit ve embriyo dondurma, ICSI gibi yardımcı üreme tekniklerinde başarılı sonuçların alınması için göz önüne alınması gereken önemli konulardır.

ÖZET

***IN VITRO* FERTİLİZASYON SÜRECİNDE FARE OOSİT VE EMBRİYOLARINDAKİ HÜCRE İSKELETİNDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLER**

Ökaryotik hücrelerin değişik şekillere adapte olabilmeleri, hareketlerini yönlendirip koordine etmeleri ve hücre organellerinin hücre içinde yer değiştirmeleri, sitoplazmanın her tarafına yayılmış olan protein yapıda filamentlerin oluşturduğu kompleks ağ sayesinde gerçekleştirilir. Bu ağ, hücre iskeleti olarak adlandırılır. Hücre iskeleti oldukça dinamik bir yapıda olup, devamlı olarak hücrenin şeklinin değişmesi, bölünmesi, mitozda kromozomların ayrılması ve hücrenin çevresel etkilere cevap vermesini organize eder.

Hücre iskeletini, üç tip filament meydana getirir. Bunlar; mikrotübüller, ara filamentler ve mikrofilamentler (aktin filamentler) dir. Aktin filament (mikrofilament) hücre göçünden membran transportuna kadar geniş bir alanda fonksiyon üstlenmektedir. Ökaryotik hücrelerde, özellikle filamentoz (F-aktin) aktinin, hücrelerin şekillerin korunması ve hücrelerin göçü, büyümesi, polarizasyonu, organel taşınımı, endositoz\ekzositoz, replikasyon ve gen regülasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Mikrotübüllerin ise mayoz bölünmenin gerçekleşmesi, kromozomların yeniden organizasyonu, sitoplazmik organellerin ve küçük veziküllerin taşınması gibi temel fonksiyonları gerçekleştirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak germ hücrelerinin matürasyonu, fertilizasyonu ve erken embriyo gelişimi süresince gerek mikrofilamentlerin gerekse mikrotübüllerin üstlendikleri roller hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Bu çalışmada invitro fertilizasyon süresince hücre iskeletinde meydana gelen değişiklikler immünfloresan yöntemler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışma ile fare oositlerin matürasyonu ve *in vitro* fertilizasyonu sürecinde hem mikrotübül hem de mikrofilamentlerin genetik materyalin yeniden organizasyonu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Oosit hücre iskeletinin,

diğer sitoplazmik organellerin yeniden dağılması ve yapılanmasında üstlendiği roller düşünöldüğünde başarılı bir fertilizasyon ve sonrasında devam eden preimplantasyon embriyo gelişimi için yaşamsal roller üstlendiği söylenebilir. Hücre iskeleti elemanlarından mikrotüböller ve mikrofilemetlerin hücre içindeki organizasyonları ve ooplazma içindeki diğer organellerle olan ilişkilerinin aydınlatılması IVM, IVF, oosit ve embriyo dondurma, ICSI gibi yardımcı üreme tekniklerinde başarılı sonuçların alınması için göz önüne alınması gereken önemli parametreler olduğu açıktır.

SUMMARY

CYTOSKELETAL CHANGES OCCURRED DURING *IN VITRO* FERTILIZATION PROCESS IN MOUSE OOCYTES AND EMBRYOS.

Eucaryotic cells contain a proteinous filamenteous network which help cells to adopt their shape, to coordinate the movement of the cells and their organelles within the cytoplasm. This prominenet network is called “cell skeleton”. It has a very dynamic structure and make cell to change their shape, to divide, to separate the chromosomes during mitosis and to respond to the environmental factors.

Three types of filaments make the cell skeleton; microtubule, intermediate filaments, and microfilaments (mostly actin). Actin filaments function in cell migration and membrane transport. F-actin (filamenteous actin) has been shown in eukaryotic cells in which they regulate the cell shape, cell migration, growth and polarization, organelle transport, endo-and exocytosis, replication and gene regulation. On the other hand, microtubuli take place in meiotic division, reorganization of chromosomes, transportation of cytoplasmic organelles and small vesicles. However, there is still not enough information about the role of microtubules and microfilaments in the maturation of germ cells, fertilization and early embryo development. The aim of the present study was the find out the alteration of cell skeleton of mouse oocytes during *in vitro* fertilization process using immunofluoresence staining techniques.

The present study demonstrated that both microtubules and microfilaments were closely related to the reorganization of genetical material during *in vitro* fertilization process and oocyte maturation process in mice. Bearing in mind the role of oocyte cell skeleton in the distribution and formation of cytoplasmic organelles, it has crucial roles in a succesfull fertilization and following preimplantation embryo development. To understand the organization of microtubules and microfilaments in oocytes and their relationship with other organelles in ooplasm is important parameters in a succesfull assisted

reproductive techniques such as IVF, IVM, cryopreservation of oocytes and embryos and ICSI.

KAYNAKLAR

1. Güneş, H.V.,: Moleküler Hücre Biyolojisi. Kaan Kitabevi. I Baskı. ISBN: 975-6787-05-8, Sayfa: 86-121, 2003.
2. Tremoleda JU, Schoevers EJ., Stout TA., Colenbrander B., Bevers MM.,: Organisation of the cytoskeleton during *in vitro* maturation of horse oocytes. Mol Reprod Dev 60: 260-269, 2001.
3. Sun, QY., Schatten, H.,: Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. Reproduction 131: 193-205, 2006.
4. Gallicano GI.,: Composition, regulation, and function of the cytoskeleton in mammalian eggs and embryos. Front Biosci. I; 6: D 1089-108, 2001.
5. Bobinnec, Y., Marcaillou, C., Morin, X., Debec, A.,: Dynamics of the endoplasmic reticulum during early development of *Drosophila melanogaster*. Cell Motility and Cytoskeleton 54: 217-225, 2003.
6. Terasaki, M.,: Redistribution of cytoplasmic components during germinal vesicle break down in starfish oocytes. Journal of Cell Science 107: 1797-1805, 1994.
7. Roeder AD., Gard DL.,: Confocal microscopy of F-actin distribution in *Xenopus* oocytes. Zygote 2: 111-124, 1994.
8. Tereda, Y., Morito, Y., Tachibana, M., Morita, J., Nakamura, SI., Murakami, T., Yaegashi N., and Okamura, K.,: Cytoskeletal dynamics during mammalian gametogenesis and fertilization: Implications for human reproduction. Reproductive Medicine and Biology. 4: 179-187, 2005.
9. Pollard, T.D., Earnshaw W.C. Cell Biology. Elsevier Science (USA) ISBN: 0-7216-3997-6, Sayfa: 557-617, 2002
10. Cooper, G.M., Hausman, R.E.,: Hücre (Moleküler Yaklaşım). (Çeviri Editörü: Sakızlı, M., Atabey, N.,) İzmir Tıp Kitabevi, üçüncü baskı. ISBN: 9944-5148-0-2, sayfa: 435-482, 2006
11. Basu, R., Chang, F.,: Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips. Current Opinion in Cell Biology , 19: 88-94, 2007.

12. Kierszenbaum, A.L., (Çeviri editörü: Demir R.) Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Palme yayıncılık ISBN: 9944-341-02-9, Sayfa: 23-35, 2006.
13. Junqueira L.C., Carneiro J.,(Çeviri editörü: Aytakin Y., Solakoğlu S.) Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri ISBN: 975-420-467-5, Sayfa: 43-51, 2003.
14. <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/microfilaments/images/microfilamentsfigure1.jpg>
15. http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/actin_filaments_intro.htm
16. Dedova, I.V., Nikolaeva, P.O., Safer, D., De La Cruz, E.M., dos Remedios, C.G.,: Thymosin β 4 Induces a Conformational Change in Actin Monomers. Biophysical Journal Volume 90: 985–992, February 2006.
17. Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., Pollard, TD.,: Crystal Structure of Arp2/3 Complex Science Vol 294: 1679-1684, 23 November 2001.
18. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.,: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing 4. baskı. ISBN: 0815332181, sayfa 907-982, 2002
19. Katsumoto, T., Mitsushima, A., Kurimura T.,: The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. Biol Cell.68(2): 139-146, 1990.
20. http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/intermediate_filaments.htm
21. Desai, A., Mitchison, T.J.,: Microtubule polymerization dynamics. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13: 83–117, 1997.
22. Childs, G. V.,: http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/microtubule_intro.htm, 2001.
23. Karp G.,: Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ 4. baskı. Sayfa: 346-358, 2005.

24. Vale R.D., Reese T.S., Sheetz M.P.: Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42: 39-50, 1985.
25. Seiler, S., Nargang, E.F., Steinberg, G., Schliwa, M.: Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal* Vol.16 No.11 pp.: 3025–3034, 1997.
26. Bannai, H., Inoue, T., Nakayama, T., Hattori, M., Mikoshiba, K.: Kinesin dependent, rapid, bi-directional transport of ER sub-compartment in dendrites of hippocampal neurons *Journal of Cell Science* 117: 163-175, 2004.
27. Çolgar U.: *Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite*. İstanbul medikal yayıncılık 1. baskı ISBN: 975-6395-65-6, Sayfa: 9-29, 2006
28. Johnson, M., Everitt, B.: *Essential Reproduction*. Blackwell Scientific Publications, Third edition, ISBN: 0-632-02183-7, Sayfa: 75-101, 1988.
29. Şeftalioğlu A.: *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi*. Tıp&Teknik yayıncılık Ltd. Sti. 3. baskı, ISBN: 975-94823-1-2, Sayfa: 7-86, 1998.
30. Sadler, W.T.: *Langman Medikal Embriyoloji (Çeviri: Başaklar A.C.)*. Palme yayıncılık, dokuzuncu baskı. ISBN: 975-8982-12-5, sayfa: 3-50, 2005
31. Gougeon, A.: Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews*. Vol. 17, No. 2 121-155, April, 1996.
32. Oktay, K., Briggs, D., Gosden, R.G.: Ontogeny of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Expression in Isolated Human Ovarian Follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 82, No. 11 3748-3751, 1997
33. Erickson, G.F.: Normal regulation of ovarian androgen production. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 11: 307-312, 1993.
34. Tong, J.: *Effects of Chilling on The Physiology and Development of Mouse Oocytes and Zygotes*. A Thesis Presented to The Faculty of Graduate Studies of The University of Guelph, September, 1999.

35. Howlett, S.K., Bolton, V.N.,: Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 87: 175-206, 1985.
36. Scultz, R.M.,: Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays* 15: 531-538, 1993.
37. Elder, K., Dale, B.,: *In Vitro* Fertilization. Cambridge University Press.2. baskı. ISBN: 0521778638, Sayfa: 1-7, 2000.
38. Çıray, N.,: Yardımla Üreme Laboratuvarı Pratik Bilgiler. ISBN: 975-288-395-8, Ankara, 2003
39. Uysal, P.,: İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi (IVF-ET) ve Etik. *T Klin J Med Ethics, Law and History*, 11: 41-44, 2003.
40. Dhawan, A.,: The Role of Oocyte- and Embryo- Secreted Factors in Cumulus Cell Differentiation and Their Relationship to Embryo Quality and Developmental Competence. Department of Cellular and Molecular Medicine Faculty of Medicine Ottawa, Ontario. January, 2000.
41. Speroff, L., Glass, R., Kase, N.,: *Clinical Gynecologic Endocrinology* 5.edition. Williams and Wilkins, Baltimore, MD., 1994.
42. <http://www.gata.edu.tr/cerrahibilimler/kadindogum/SSS/INF4.html>
43. Brackett, B.G., Williams, W.L.,: Fertilization of rabbit ova in a defined medium. *Fertil Steril* 19: 144-155, 1968.
44. <http://www.jinekolognet.com/tup-bebek-tarihce.asp>
45. Bavister B.D.,: Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction* 124, 181–196, 2002.
46. Brinsden, P.R., *A Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. 2. edition. Taylor & Francis, ISBN: 1-85070-000-1, Sayfa: 91-102, 1999.
47. Bağış, H., Arat S., Odaman H., Sağırkaya H.,: Yardımcı Üreme Teknikleri ve Transgenik Hayvan Üretiminde Kullanılan Yöntemler. *Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü*, Sayfa:16-47, 2005.
48. Austin, C.R., Short, R.V., *Hormonal Control of Reproduction*. Cambridge University Press. Second edition. ISBN: 0521275946. Sayfa: 91-114, 1986.

49. Hofker, M.H., Deursen J.V.,: Transgenic Mouse Methods and Protocols. Humana Press Inc. ISBN 0-89603-915-3, Sayfa: 9-50, 2003
50. Lim, E.A., Choi, T.S.,: A Phenotypic Study of Murine Oocyte Death In Vivo. Journal of Reproduction and Development, Vol. 50, No. 2, 2004
51. Ke-Gang Z., Xiao-Qian M., Yong Y., Yuan-Song YU., Dai-Cheng L., and Yun-Long L.,: Requirements of Src Family Kinase During Meiotic Maturation in Mouse Oocyte” Mol Reprod and Dev. 74: 125–130, 2007
52. Nishi, Y., Takeshita, T., Şato, K., and Araki, T.,: Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during *in vitro* maturation. J. Nippon Med Sch 70 (5), 2003.
53. Vergara, G.J., Irvvin, M.H., Mofatt, R.J, Pinkert C.A.,: *In vitro* fertilization in mice: Strain differences in response to superovulation protocols and effect of cumulus celi removal. Theriogenology; 47: 1245-1252, 1997.
54. Schatten, H.,: Germ Cell Protocols: Volume 1: Sperm and Oocyte Analysis. Humana pres. ISBN: 1588291219, Sayfa: 151-215 ,2004
55. Veselska. R., Janisch R.,: Cortical Actin Cytoskeleton In the Human Oocytes: A Comparison with the Mouse Oocytes. Scripta Medica (BRNO) - 74 (4): 265-274, 2001.
56. Maro, B., Kubiak, J., Gueth, C., De Pennart, H., Houliston, E., Weber, M., Antony, C., Aghion, J.,: Cytoskeleton organization during oogenesis, fertilization and preimplantation development of the mouse. Int J Dev Biol. Mar;34(1):127-37, 1990.
57. Wassarman, P.M., Fujiwara, K., (}. Immunofluorescent anti-tubulin staining of spindles during meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*. J. Cell Sci. 29: 171-188, 1978.
58. Mattson, B.A., Albertini, D.F.,: Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during the meiotic prophase. Mol Reprod Dev 25: 374-383, 1990.
59. Hinrichs, K., Schmidt, A.L., Friedman, P.P., Selgrath, J.P., Martin, M.G.,: *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fuorescence microscopy. Biol Reprod 48: 363-370, 1993.

60. Messinger, S.M., Albertini, D.F.,: Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte. *J Cell Sci* 100: 289-298, 1991.
61. Tremoleda, J.L., Schoevers, E.J., Stout, T.A.E., Colenbrander, B., Bevers, M.M.,: Organisation of the Cytoskeleton During *In Vitro* Maturation of Horse Oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 60: 260-269, 2001.
62. Kim, N.H., Funahashi, H., Prather, R.S., Schatten, G., Day, B.N.,: Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 43: 248-255, 1996.
63. Kim, N-H., Chung, H.M., Cha, K-Y., Chung, K.S.,: Microtubule and microfilament organisation in maturing human oocytes. *Human Reprod* 13: 2217-2222, 1998.
64. Wickramasinghe, D., Ebert, K., Albertini, D.F.,: Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Dev Biol* 143: 162-172, 1991.
65. Schatten, G., Simerly, C., Schatten H.,: Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. June; 82(12): 4152-4156, 1985.
66. Zi-Yu Zhu, Da-Yuan Chen, Jin-Song Li, Li Lian, Lei Lei, Zhi-Ming Han, Qing-Yuan Sun: Rotation of Meiotic Spindle Is Controlled by Microfilaments in Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction* 68: 943-946, 2003.
67. Pickering, S.J., Johnson, M.H., Braude, P.R.,: Cytoskeletal organisation in fresh, aged, and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod* 3: 978-989, 1988.
68. Aman, R.R., Parks, J.E.,: Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 50: 103-110, 1994.

69. Maro, B., Howlett, S.K., Webb, M.: Non-spindle microtubule organising centers in metaphase II-arrested mouse oocytes. *J Cell Biol* 101: 1665-1672, 1985.
70. Schatten, H., Schatten, G., Mazia, D., Balczon, R., Simerly, C.: Behaviour of centrosomes during fertilisation and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 105-109, 1986.
71. Webb, M., Howlett, S.K., Maro, B.: Parthenogenesis and cytoskeleton organisation in aging mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* 95: 131-145, 1986.
72. Longo, F.J., Chen, D.Y.: Development of cortical polarity in Mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol* 107: 382-394, 1985.
73. Kim, N.H., Day, B.N., Lee, H.T., Chung, K.S.: Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation, and fertilisation in the porcine oocyte. *Zygote* 4: 145-149, 1996.
74. DiMaggio, A.J.Jr., Lonergan, T.A., Stewart-Savage, J.: Cortical granule exocytosis in hamster eggs requires microfilaments. *Mol Reprod Dev* 47: 334-340 1997.
75. Terada, Y., Simerly, C., Schatten, G.: Microfilament stabilization by Jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilisation in mice. *Mol Reprod Dev* 56: 89-98, 2000.
76. Szollosi, D., Calarco, P. and Donahue, R. P.: Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 11: 521-541, 1972.
77. Albertini, D. F.: Cytoplasmic reorganization during the resumption of meiosis in cultured preovulatory rat oocytes. *Dev-Biol.* 120 (1): 121-31, 1987
78. Mattson, B.A., Albertini D.F.: Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during the meiotic prophase. *Mol Reprod Dev* 25: 374-383 1990.

79. Messinger, S.M., Albertini, D.F.: Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte. *J Cell Sci* 100: 289-298, 1991.
80. Ducibella, T., Ukena, T., Karnovsky, M., Anderson, E.: Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *The Journal Of Cell Biology*; 74: 153-167, 1977.
81. Suzuki, H., Azuma, T., Koyama, H., Yang, X.: Development of Cellular Polarity of Hamster Embryos during Compaction. *Biology of Reproduction* 61, 521–526, 1999.
82. Wang, W-H., Abeydeera, L.R., Prather, R.S., Day B.N.: Actin filament distribution in blocked and developing pig embryos. *Zygote*, 8: 353-358, 2000.
83. Kim, N-H., Chung H.M., Cha, K-Y., Chung K.S.: Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes *Human Reproduction* vol.13 no.8, 2217–2222, 1998.
84. Edwards, R.G.: Colchicine induced heteroploidy in the mouse. *J. Exp. Zool.*, 37: 317–348, 1958.
85. Maro, B., Johnson, M.H., Webb, M. et al.: Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the centrosomes, the cytoskeleton and plasma membrane. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 92: 11–32, 1986.
86. Kim, N.-H., Chung, K.S., Day, B.N.: The role and distribution of microtubule and microfilaments during fertilization and parthenogenesis. *J. Reprod. Fertil.*, 111: 143–149, 1997.
87. Maro, B., Johnson, M.H., Pickering, S.J., Flach, G.: Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *Embryol. Exp. Morphol.* 81: 211-237, 1984.
88. Funahashi, H., Kim, N.-H., Stumpf, T.T., et al.: The presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 54: 1412–1419, 1996.

89. Kim, N.-H., Moon, S.J., Prather, R.S., et al.: Cytoskeletal alteration in aged oocytes and parthenogenesis. *Mol. Reprod. Dev.*, 43: 513–518, 1996.

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DENEY HAYVANLARI
ETİK KURULU

Sayı : :B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/144
Konu : Hayvan Etik Kurul Hk.

14/09/2006

Sayın Doç.Dr.Eray BULUT

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA;

14/09/2006 tarih ve 82 sayılı "In Vitro Fertilizasyon Sürecinde Fare Oosit ve Embriyolarındaki Hücre İskeletinde Meydana Gelen Değişiklikler" isimli Yüksek Lisans Tezi Projesi Etik Kurulumuzca uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. Erol SEZER(üye)
-TMMU-

Doç.Dr. Sinan GÜRSOY (üye)

Prof.Dr. Dilek ÖZTÜRK (üye)
-TMMU-

Yrd.Doç.Dr. İhsan HUBBEZOĞLU (üye)

Prof.Dr. Şahinde ELAĞÖZ (üye)

Yrd.Doç.Dr. Saliğ ÇETİNKAYA (üye)
-EMEKU-

Doç.Dr. Pınar ERSEL CAN (üye)

Uzm.Vet.Dr. Yücel YALMAN(Başkan Yrd.)

Doç.Dr.Eray BULUT (üye)

Doç.Dr. M.Kemal YILDIRIM (Başkan)