

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**OOSİT MATURASYONU
VE
ARRESTİNDE
TUBAL SIVI KÜLTÜR ORTAMININ YERİ**

**DOKTORA TEZİ
HAYRUNNİSA YEŞİL**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER**

MANİSA 2013

TEŞEKKÜRLER

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında doktora programına başladığım Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde ilk danışmanım ve bu programa kabulümde imzası bulunan hocam Prof. Dr. Alpaslan Gökçimen'e,

Ross kitabını olduğu gibi istifademe sunmuş, doktora tez konusunun belirlenmesi sırasında çift danışmanlıklardan birini üstlenmiş, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalına yatay geçişime müsaade etmiş ve Prof. Dr. Seda Vatansever ile çalışmamda yönlendirici olmuş bulunan hocam Prof. Dr. Meral Öncü'ye,

Akademik hayatımın ilk kademesi; Yüksek Lisans Tezimde danışmanım olan ve sempatisi ile Histoloji ve Embriyoloji bilimine beni bağlayan Prof Dr. İbrahim Tuğlu hocama,

Kadrosuzluktan bunalıp akademik hayatı bırakmayı düşündüğüm zamanlarda bana moral ve cesaret veren, "*düşünme bunları moralini bozma haydi git çalış daha çok şey öğren*" diyen Prof. Dr Kemal Özbilgin hocama,

Bundan sonraki akademik hayatımda yöneticiliği ve hoşgörüsüyle unutamayacağım hocam Prof. Dr. Sevinç İnan'a

Özellikle yüksek lisansta olduğu gibi doktora programının tamamında da her zaman destekçim, en yakınımda olan, sorunlarımı açıkça paylaşabildiğim ve hiçbir maddi-manevi desteğini esirgemeyen aileme,

Yüksek lisans derslerinde korkulu rüyam, doktora tez konusunun belirlenmesinde 2. danışman olduğu halde etkili olan, CBÜ' ye yatay geçiş sonrası 1. danışmanım olan, sistematik çalışma ve analitik yaklaşımlarıyla Histoloji ve Embriyoloji bilimini zihnimde yeniden dizayn ettiren Prof. Dr. Seda Vatansever hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Arş. Gör. Hayrunnisa YEŞİL

ÖNSÖZ

İnfertil vakalarda oosit gelişiminde ve ayrıca tüp bebek merkezlerindeki kaliteli oosit eldesinde, kültür şartları önem kazanmaktadır. Özellikle in vivo ortama uygun kültür şartlarının olması oosit ve embriyo kalitesi için önemlidir. Hazır olarak alınan kültür vasatlarının içeriğinde bulunan protein, aminoasit, vb. maddelerin oosit ve embriyo kültürü için farklı olması gerekmektedir. Hatta oositin farklı dönemlerinde bile farklı içeriklere ihtiyaç duyulabilmektedir. Elde edilen oositin kültür ortamında in vivo ortama uygunluğu ve ayrıca transfer edilecek olan embriyonun uterus içi uyumu açısından kültür şartları ve uyumluluğu kaliteli oosit ve embriyo için önemlidir. IVF merkezlerine başvuran çiftlerden elde edilen oositlerin kalitesi toplandığı aşamada iyi olmasına rağmen, kültüre devam edilmesi ile oosit kalitesinde değişiklikler gözlenmesi yanı sıra, oosit arresti de en sık karşılaşılan problemlerdendir. Bununla beraber IVF merkezlerinde toplanan oositlerin gelişme evreleride farklı olabileceğinden, mayoz I evresinde olan oositler mayoz II evresine gelinceye kadar beklenmektedir. O nedenle farklı mayoz evresinde elde edilen oositlerin kültür ortamlarının farklı olması gerekliliğide önem kazanmaktadır. O nedenle farklı kültür ortamında kültüre edilecek olan oositlerin matürasyonlarını tamamlamaları veya arrestte kalmamaları incelenmiş olması oositin kültür şartlarının analizi için önemlidir.

Bununla beraber eş zamanlı olarak ovaryum dokularındaki mayozu kontrol eden faktörlerin kültür ortamındaki oositlerde de incelenmesi ile, kültür ortam farklılığının oosit gelişimi üzerine etkisi de incelenmiştir. Özellikle kültür ortamına tubal sıvı ilave edilmesi ile oosit kalitesindeki değişikliklerin incelenmesi çalışmamızın özgün değeri olarak düşünülmüş ve klinik açıdan kullanılabilirliği analiz edilmiştir. Yeni kültür ortamların gerekliliği açısından insan oosit denemeleri için bir ön çalışma olan çalışmamız, klinik denemeler sonrasında da yeni kültür vasatları gerekliliği doğabileceğinden, firmalarında yeni üretime geçmeleri sağlanacağından piyasa hareketliliği açısından da yaygın etkisi olacağını düşünmekteyiz.

Prof. Dr. Seda Vatansever
Arş. Gör. Hayrunnisa YEŞİL

ÖZET

Oosit matürasyonu embriyonik dönemde başlayıp, mayoz I'in profaz safhasında duraksar ve puberte ile birlikte gelişmeye başlayan foliküllerden fertilizasyon için uygun oositin atılımı gerçekleşir. Oosit gelişimi sırasında mayoz I ve Mayoz II evrelerini kontrol eden birçok moleküler mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalar sayesinde oositin bir fazdan diğer faza geçişi sağlanmakta ve fertilizasyon için olgun oosit gelişimi tamamlanmaktadır. Kadın infertilite sebeplerinden oosit matürasyonundaki aksaklıklar ve/veya oositin mayozun herhangi bir aşamasında duraksaması (arrestte kalması) sonucu fertilizasyonun gelişmemesi görülebilmektedir. Bu nedenle in vitro şartlarda oosit kültür ortamlarının geliştirilmesi gereklidir. Uygun kültür ortamlarının sağlayabilmesi ve kültür ortamındaki embriyo canlılığının korunabilmesi için, in vivo şartları mümkün olduğunca taklit edebilen kültür sistemlerine ihtiyaç vardır. Bu amaçlara yönelik IVF kültür vasatlarına ek olarak ko-kültür sistemleri de tercih edilebilmektedir. Bu veriler doğrultusunda çalışmamızda oosit kültür ortamında matürasyonu ve arresti üzerine tubal sıvı kültür ortamının etkisi ve bu ortamda kültüre edilmiş oositlerin embriyo geliştirebilme potansiyelleri de öngörülmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda superovulasyon işleminden sonra elde edilen mayoz I ve mayoz II evresindeki oositler, oosit kültür vasatı içerisinde kültüre edildi. İlk grupta mayoz I aşamasında Metafaz I oosit kültürü ve Metafaz I oosit kültürü + tubal sıvı ilaveli olan oositler, 2. gruptaki oositler ise mayoz 2 aşamasında olup Metafaz II oosit kültürü ve Metafaz II oosit kültürü + tubal sıvı ilaveli olan oositler kültüre edildi. Böylelikle toplam 4 grup incelendi.

Gruplar:

Grup 1: Metafaz I Oosit kültürü

Grup 2: Metafaz I Oosit kültürü + tubal sıvı ilaveli

Grup 1: Metafaz II Oosit kültürü

Grup 2: Metafaz II Oosit kültürü + tubal sıvı ilaveli

Kültürün 48. saatinde oositler whole mount immunohistokimyasal analiz yöntemi ile anti-siklin B, anti-MPF, ve anti-MOS dağılımları immunofleurosans

boyama tekniği ile incelendi. Eş zamanlı olarak apoptotik hücrelerde TUNEL yöntemi ile incelendi. Bununla beraber ovarian döngü sırasında salgılanan anti-siklin B, anti-MOS ve anti-MPF birincil antikorlarının dağılımları için yukarıda tarif edilen oosit eldesi ile eş zamanlı olarak ovaryum örnekleri alındı (5 adet fareden) ve rutin parafin takibi sonrasında elde edilen kesitlerde anti-siklin B, anti-MOS ve anti-MPF dağılımları indirekt immunoperoksidaz yöntemi ile incelendi. Ovarian doku kesit örneklerinde TUNEL yöntemi uygulanarak apoptotik hücre tanımı yapıldı.

Mayoz I döneminde alınan oositlerin tubal sıvı ile kültür sonrasında Mayoz II aşamasına geçtikleri gözlenirken, Mayoz II dönemindeki oositlerin tubal sıvı kültürü içinde canlılıklarını korudukları ve özellikle Emi salınımı ile her iki dönemdeki oositlerin canlılıklarının korundukları saptandı. Ovaryum dokusunda da Emi salgısı erken dönemde pozitif iken, MOS and Siklin-B salgılarının follikül gelişimi ile birlikte arttıkları saptandı.

Sonuç olarak oosit matürasyonunda Emi salgısı önemli iken, gelişen folliküllerde MOS ve Siklin-B salgılarının önemli olduğu ve oosit canlılığı ile ilişkili oldukları sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Oosit maturasyonu, oosit arresti, IVF, tubal sıvı

SUMMARY

Maturation of oocyte started at embryonic stage, it hesitated during prophase I of meiosis, started to develop in puberty with developing follicles. During the development stages of oocyte at meiosis I and meiosis II, many molecular mechanisms controls. These mechanisms also provided to transition from one phase to another phase of oocyte and was complemented by the development of mature oocytes for fertilization. Oocyte maturation problems and/or pauses of development of oocyte during meiotic stage (remain in arrest) could not be seen fertilization. Therefore, the culture condition for oocyte had to be develop. Provided appropriate culture media and to protect the viability of embryos cultured in vivo culture system that could mimic conditions were needed as much as possible. For these purpose, in addition to IVF culture medium, co-culture systems might be preferred. According to these data, in our study, we investigated to analyze the effect of tubal fluid culture system on oocyte maturation and embryo development potentials. For this purpose, after superovulation of mouse, meiosis I and meiosis II stage of oocytes would be cultured in culture condition. In the first group, oocytes with cumulus cells would be at stage of meiosis I, in the second group oocytes without cumulus cells would be at stage of meiosis II would be culture in medium with tubal fluid. A total of 6 groups would be examined.

Groups:

Group 1 : Metaphase I oocyte culture

Group 2 : Metaphase I oocyte culture + tubal fluid

Group 3 : Metaphase II oocyte culture

Group 4 : Metaphase II oocyte culture + tubal fluid

After 48 hour of culture, oocytes would be evaluated anti-cyclin B, anti-MPF and anti-MOS distribution using whole mount immunofleurosans staining technique. Apoptotic cells by TUNEL assay would be evamined with the same time. In addition, to analyze secreted anti-cyclin B, anti-MPF and anti-MOS distribution during ovarian cycle, ovarian tissue would also be collected (form 5 mouse) and after

routine paraffin embedding protocols, the sections would be stained to with anti-cyclin B, anti-MPF and anti-MOS using immunoperoxidase technique. In ovarian tissue sections, the apoptotic cells would be analyze using TUNEL assay.

While the oocytes taken during meiosis I were observed to pass to phase of meiosis II following the culturing in the tubal fluid ,the oocytes in meiosis II were noted to preserve their vitality in the tubal fluid culture and especially during both phases with the secretion of Emi.

Key word: Oocyte maturation, oocyte arrest, IVF, fallopian tube fluid

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

OMI	: Oosit Maturasyonunu inhibe edici madde
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
iNOS (NOS- 2)	: İndüklenebilir Nitrik Oksit
eNOS (NOS- 3)	: Endotelial Nitrik Oksit
cNOS	: Yapısal Nitrik Oksit
PGCs	: Primordiyal germ hücreleri
DNA	: Deoksiribonukleik asit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
OH	: Hidroksil
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNF-α	: Tümör neksoz alfa
TUNEL	: Terminal deoksinukleotidil transferaz [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end-labeling
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
KL	: Kit Ligand
mRNA	: Mesajcı RNA
LİF	: Lösemi inhibitör faktör
FGF2	: Fibroblast büyüme faktörü
BMP4	: Kemik Morfogenetik Protein 4
Lifra	: Lif reseptör a
Lifrb	: Lif reseptör b
RNA	: Ribonükleik Asit
İL-4	: İnterlökin-4
RT-PCR	: Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
GCN	: Germ Hücre Kistleri ve Yuvaları
PACAP	: pituitary adenylate cyclase activating polypeptides
TGF-β	: Transforming Growth Factor
P₅₃	: Tümör baskılayıcı gen

AMH/MIS	: Anti-Müllerian hormon
CSF	: Sitostatik faktör
APF	: Anafaz Uyarıcı Faktör
6-DMAP	: 6-dimethylaminopurine
PAS	: Periyodik Asit Schiff
LH	: Lüteinizan Hormon
ActA	: Aktivin A
FSH	: Follicle stimulating hormone
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GDF9	: Growth differentiation factor 9
BMP6	: Bone morfojenetik protein 6
BMP15	: Bone morfojenetik protein 15
EGF	: Epitelial growth factor
Bcl-2	: B-cell leukemia/Lymphoma-2 protein ailesi
bFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörünün
PBS	: Fosfat tampon solüsyon
DAB	: Diaminobenzidin tetrahidroklorit
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
Foxo3a	: Forkhead box O3A
SDF-1	: Stromal derived factor-1
AC	: Adenilat Siklaz
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü
PAI	: Plazminojen aktivatör inhibitörü
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinazı
cAMP	: Siklik Adenin Monofosfat
GJ	: Gap Junction- Geçit Bağlantıları
PDE	: Fosfodiesteraz
Cx	: Konneksin
ZP	: Zona Pellusida
RFLP4	: Ret Finger Protein-Like 4
ER	: Östrojen Reseptörü
GVBD	: Germinal Vezikül Yırılması

MI	: Metafaz 1
MII	: Metafaz 2
MPF	: Maturation Promoting Factor
MOS	: a proto-oncogene
İVF	: İn Vitro Fertilizasyon
GV	: Germinal Vezikül
PKA	: Protein Kinaz A
Ca+2	: Kalsiyum
CRE	: cAMP yanıt elementi
AC	: Adenilil Siklaz
COC	: Kümüls Ooforus Kompleksi
GC	: Guanilil Siklaz
sGC	: Soluble Guanilil Siklaz
pGC	: Particulate Guanilil Siklaz
CDK	: Siklin Bağımlı Protein Kinaz
NPPC/NPR2	: Natriüretik peptidC/natriüretik peptid reseptör2
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
İMPDH	: İyozozin monofosfat dehidrojenazın
IGF-1	: İnsülin büyüme faktörü
CL	: Korpus luteum
Rb	: Retinoblastoma
OPU	: Oocyte Pick Up
ICSI	: Intra-Cytoplasmic Sperm Injection
PI	: profaz 1
PVA	: Perivitellin alan
İVM	: İn Vitro Maturasyon
HCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
HMG	: İnsan Menapozal Gonadotropin
(GnRH-a)	: Gonadotropin salgılatıcı hormon analogları
PDGF	: Platelet orijinli büyüme faktörü

FF-MAS	: Folikül sıvısı kaynaklı mayoz aktive edici sterol
İVM	: İn Vivo oosit maturasyonu
İU	: İnternational unit
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
uFSH-hp	: Yüksek Pürifiye FSH
rFSH	: Rekombinant İnsan FSH



İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜRLER	I
ÖNSÖZ	II
ÖZET	III
İNGİLİZCE ÖZET	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
1.1. Ovaryum	2
1.2. Folikülogenezin Moleküler Yapısı	18
1.3. Mayotik Gelişim	37
1.4. İn vivo Oosit Maturasyonuna Etki Eden Faktörler	38
1.5. Mayotik Arrest	57
1.6. Foliküler Apoptoz	61
1.7. Hücre Döngüsü Molekülleri	63
1.8. Oosit Toplama Prosedürü (OPU)	69
1.9. İnfertilite ve Oosit Problemleri	75
1.10. Oosit Maturasyon Yetmezliği Sendromu	79
1.11. İn Vitro Maturasyon (IVM)	83
1.12. AMAÇ	93
2. GEREÇ VE YÖNTEM	96
3. BULGULAR	110
4. TARTIŞMA	132
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	138
6. KAYNAKLAR	139

Resim 1.	Erkek ve dişi gametlerin biraraya gelerek tek hücreli bir yapı olan zigotun oluşumu	1
Resim 1.1	Ovaryum dokusu ve gelişen foliküller	3
Resim 1.2	Ovaryum dokusunda germinal epitelyum altında sıralanmış primordiyal germ hücreleri ve onun şematik gösterimi (A, C) (1). Primordiyal folikülün diğer foliküller içerisinde gösterimi (B)	12
Resim 1.3	Ovaryum dokusunda te katlı kübik folikül hücreleri ile çevrelenmiş primer folikül ve onun şematik gösterimi (A, B).	14
Resim 1.4	Çok tabakalı primer folikül(A) (1) B: Çok tabakalı primer folikül şematik resmi (B)	14
Resim 1.5	Ovaryum dokusunda granüloza hücreleri ile çevrelenmiş sekonder folikül, onun şematik gösterimi ve dikkat çekici zona pellusida tabakası (B, C)	16
Resim 1.6	Ovaryum dokusunda granüloza hücreleri ile çevrelenmiş Graaf folikül, onun şematik gösterimi ve dikkat çekici boyuta ulaşmış Antrum (A, C) (1). Teka tabakasıyla çevrelenmiş Graaf folikül, korona radyata hücreleriyle çevrelenmiş ve henüz atılmamış sekonder oosit(C)	17
Resim 1.7	Kumulus korona değerlendirmesine göre Grade 1 oosit	70
Resim 1.8	Grade 3 olarak tanımlanan iki kumulus korona kompleksi	70
Resim 1.9	Lin'in sınıflamasına göre matür oositler	72
Resim 1.10	İmmatür bir oosit çevresinde koyu kompakt görünümü ile korona kumulus kompleksi (A), Postmatür oosit (B)	72
Resim 1.11	Matür ve normal özelliklere sahip bir oosit	72
Resim 1.12	Oval görünümlü ve kutup cisimciği fragmante bir oosit	75
Resim 1.13	ZP anomalisi (A), PVA'nın geniş olduğu bir MII oosit (B), Pervitellin alan geniş ve granüler (C, D).	76

Resim 1.14	Sitoplazmasında merkezi koyu granüler yapılanma gösteren bir MII oosit (A), Sitoplazmasında küçük vokuoller bulunan MII oosit (B), Kutup cisimciği fragmente merkezinde refraktil cisimcik içeren bir oosit (C).	77
Resim 1.15	Binovüler oosit (A), Fertilize olan binovüler oosit (B).	78
Resim 1.16	Binovüler embriyonun 2. ve 3. günlerdeki gelişimi (A, B).	78
Resim 1.17	Binovüler embriyonun 4. ve 5. günlerdeki gelişimi (A, B).	78
Resim 2.1	Vajinal smear HE boyaması. Çekirdeksiz ve büyük hücreler farenin östroz döneminde fare olduklarını gösterir nitelikte.	97
Resim 2.2	Oosit Eldesi. Servikal dislokasyonla sakrifiye edilen fare ovariyumu intraperitoneal olarak bulunduktan sonra (A), tuba uterina ile birlikte çıkarıldı (B, C). Ovaryum dokusu B de belirtilmiştir. Ovaryum dokusu steril PBS içine alındı (C). Yıkanan oositler oosit kültür vasatı içinde enektör iğne ucu yardımıyla foliküllerin patlatılması sağlanarak (D) oositler ağız pipetiyle toplandı (E) ve oosit kültür vasatına alınarak inkübatörde kültüre edilmek üzere alındı (F).	98
Resim 3.1	Mayoz I dönemi için oositler Fareden direkt alınan ovariyum dokusu içinde foliküller kültür ortamında görülmekte (A), Profaz 1 ve Metafaz I oositler (B), Profaz 1 oositte GV ayıt edilmekte (C), Profaz 1 oositler (D), Metafaz I aşamasında oosit (E, F) X400.	111
Resim 3.2	Tubal sıvı kültür ortamında Metafaz I oosit (A), 1. Polar cisimciği atmak üzere olan Metafaz I oosit (B). X400	112
Resim 3.3	Mayoz II dönemi için oosit eldesi, kültür ortamında Mayoz II 1. Polar cisimciğinin atılımı Metafaz I den Metafaz II ye geçiş (A), Metafaz II oositler (B).X400.	112
Resim 3.4	Tubal sıvı kültür ortamında Metafaz II ve profaz oositler (A, B) X400.	112

Resim 3.5	Kültür mediumunda kültüre edilen MI evresinde oositler (A), Tuba sıvısı ilave edilmiş kültür mediumunda kültüre edilen MII evresinde ve 1. polar cisimcik atılmış durumdaki oosit (B). X400	113
Resim 3.6	Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), Emi dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400	114
Resim 3.7	Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), MOS dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400	115
Resim 3.8	Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), MPF dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400	115
Resim 3.9	Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), Siklin B dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400	115
Resim 3.10	Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), Emi dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400	115
Resim 3.11	Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), MOS dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400	116
Resim 3.12	Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), MPF dağılımı (B), Faz kontrast görünüm (C). X400	116
Resim 3.13	Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), Siklin B dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400	116
Resim 3.14	Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz II	116

- oositler. DAPI boyaması (A), Emi dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400
- Resim 3.15** Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), MOS dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400 117
- Resim 3.16** Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), MPF dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400 117
- Resim 3.17** Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), Siklin B dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400 117
- Resim 3.18** Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), Emi dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C).X400 117
- Resim 3.19** Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz II oositler.DAPI boyaması (A), MOS dağılımı (B), Faz kontrast görünümü(C). X400 118
- Resim 3.20** Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), MPF dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400 118
- Resim 3.21** Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), Siklin B dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400 118
- Resim 3.22** Kültür ortamındaki Metafaz I dönemindeki oositlerde TUNEL boyaması. Oosit kültür vasatında kültüre edilen Metafaz I oositler (A, B). Kültür ortamına tubal sıvı ilavesi sonrasında kültüre edilen Metafaz I oositler (C, D). X400 121

Resim 3.23	Kültür ortamında Metafaz II dönemindeki oositlerde TUNEL boyaması. Oosit kültür vasatında kültüre edilen Metafaz II oositler (A, B). Kültür ortamına tubal sıvı ilavesi sonrasında kültüre edilen Metafaz II oositler (C, D). X400	122
Resim 3.24	Ovaryum dokusunda ovaryan foliküller A: X40, B: X200	123
Resim 3.25	Ovaryum örneklerinde Hematoksilen-Eosin boyaması. Ovaryum epitelinin altında primordiyal foliküler ve primer foliküller (A), primer foliküller (B), Multilaminar primer folikül (C), Sekonder folikül (D, E), Graaf folikül (F). X400	124
Resim 3.26	Ovaryum örneklerinde MOS dağılımı. Primordiyal foliküller (A), Primer Folikül (B), Sekonder Folikül (C), Graaf Folikül (D). X400	125
Resim 3.27	Ovaryum örneklerinde Siklin B dağılımı. Primordiyal foliküller (A), Primer Folikül (B), Sekonder Folikül (C, D, E), Graaf Folikül (F). X400	126
Resim 3.28	Ovaryum örneklerinde Emi dağılımı. Primordiyal foliküller (A), Primer Folikül (B), Sekonder Folikül (C, D), Graaf Folikül (E,F). X400	127
Resim 3.29	Ovaryum örneklerinde MPF dağılımı. Primordiyal foliküller (A), Primer Folikül (B, C), Sekonder Folikül (D), Graaf Folikül (E,F). X400	128
Resim 3.30	Ovaryum örneklerinde yapılan TUNEL boyamaları. Primordiyal folikül (A), Primer Folikül (B), Sekonder Folikül (C, D), Graaf Folikül (E), Millipore kiti Pozitif kontrol boyaması(F). X400	131

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1	Değişik siklinler ve Cdk'lar hücre döngüsünün değişik aşamalarında görev almaktadır.	65
Tablo 1.2	Kumulus-korona kompleksine göre oosit matürasyonu sınıflaması	70
Tablo 1.3	Oosit matürasyonunun çevre hücrelerle birlikte değerlendirilmesi	71
Tablo 1.4	Ebner'e göre (1999) 1. kutup cisimciği sınıflaması	73
Tablo 2.1	Parafin doku takibi	100
Tablo 2.2	Oositler için Whole İmmunohistokimya	102
Tablo 2.3	Oositlerde TUNEL boyaması	103
Tablo 2.4	Hematoksilen- Eozin Boyaması	104
Tablo 2.5	İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi	106
Tablo 2.6	Ovaryum TUNEL Boyaması	108
Tablo 3.1	Kültür ortamında metafaz I ve metafaz II oositlerinin 48 saatlik kültür ortamlarındaki kültür sonrası MOS, Siklin B, MPF ve Emi immonufloresan yoğunlukları ile TUNEL pozitifliği.	119
Tablo 3.2	Metafaz I ve Metafaz II dönemlerinde oosit kültür vasatı ve/veya tubal sıvı ilave edilmiş kültür sonrasında gruptaki MOS, Siklin B, MPF ve Emi immunofloresan yoğunluklarının istatistiksel oranları. (mean±SD).	119
Tablo 3.3	Ovaryum örneklerinde MOS, Siklin B, MPF ve Emi immunoreaktivite yoğunlukları ile TUNEL pozitifliği.	129
Tablo 3.4	Ovaryum örneklerinde MOS, Siklin B, MPF ve Emi immunoreaktivite yoğunluklarının istatistiksel oranları. (mean±SD).	129

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa
Grafik 3.1	
Metafaz I ve Metafaz II dönemlerinde oosit kültür vasatı ve/veya tubal sıvı ilave edilmiş kültür sonrasında MOS, Siklin B, MPF ve Emi immunofloresan yoğunluklarının istatistiksel analizi. Değerler mean \pm SD olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı Siklin B dağılımı * ile belirtilmiştir.	120
Grafik 3.2	
Ovaryum dokusunda MOS, Siklin-B, MPF ve Emi immunoreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi. Değerler mean \pm SD olarak verilmiştir. P>0.05 olanlar * ile belirtilmiştir.	130

ŞEKİLLER DİZİNİ

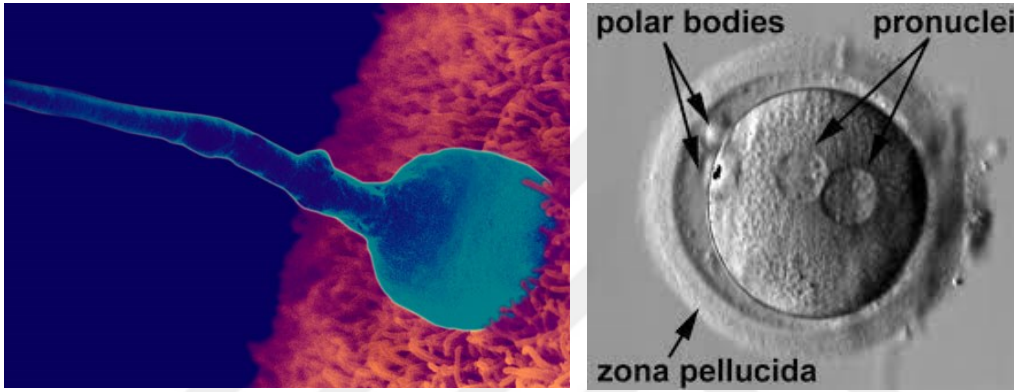
	Sayfa
Şekil 1	
Oogenez Aşamaları	4
Şekil 2	
Primordiyal germ hücreleri allantois tabanından ekstraembriyonik mezoderm içine doğru ilerleyip, bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ilerleyerek gonadal bölgeye göç ederler	5
Şekil 3	
Oogenez'de (KL)-c-kit bağlantısının şematik görünümü	7
Şekil 4	
FGF, LIF ve BMP4'ün PGC'lerdeki etkisinin şematize edilmiş şekli	8
Şekil 5	
Folikülogenez'de TNF ve GCN yuvalarının yıkımı	9
Şekil 6	
Folikülogenezde oosit ve onu çevreleyen granüloza hücreleri ve teka tabakası arasında karşılıklı iletişimde moleküler düzeyde şematize edilmiş çizim	21
Şekil 7	
Primordiyal Foliküllerden Primer Foliküle geçişte fonksiyon gören faktörleri gösteren çizim	22
Şekil 8	
Primordiyal folikül aktivasyonunun düzenlenmesi	23

Şekil 9	Lüteinizan hormonun (LH) plazminojeni aktif formu olan plazmine çevirmesi. tPA (Doku plazminojen aktivatörü), PAI (Plazminojen aktivatör inhibitörü)	25
Şekil 10	Doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve Teka tabakasındaki plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI)'nın ovulasyon üzerine etkisi	25
Şekil 11	Gonadotropinlerin (LH ve FSH) cAMP ve cGMP aracılığı ile oosit maturasyonu düzenlemesi. MAPK (Mitojen aktive edici protein kinaz), GVBD (Germinal Vezikül Yırılması)	26
Şekil 12	cAMP'nin granüloza hücrelerinden Gap Junctionlar aracılığı ile geçişi	27
Şekil 13	Cx26, Cx30, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 ve Cx57 gibi konneksinleri içeren ve bunlarla da sınırlı olmayan konneksinler, oosit ve granüloza hücre kompleksi içinde ekspres olurlar	28
Şekil 14	Oosit ve Granüloza hücreleri arasında şeffaf, glikoproteinden zengin Zona Pellusida	29
Şekil 15	GDF-9'un folikülogenezde rolü (A,B)	30
Şekil 16	GDF-9 ve BMP-15'in folikülogenezdeki rolü	31
Şekil 17	AMH'nın folikülogenezde rolü	34
Şekil 18	Östrojenin folikülogenezde rolü	35
Şekil 19	Kalsiyum salınımının folikülogenezdeki rolü	36
Şekil 20	Oosit mayotik maturasyonu ve aktivasyonu	38
Şekil 21	LH etkisi ile Germinal Vezikülün yırtılması	41
Şekil 22	Spermatozoa ile karşılaşmış sekonder oositin fertilize olması ve bunun sonucu oluşan ikinci polar cisimcik	41
Şekil 23	Oosit maturasyonunda MPFnin rolü	44
Şekil 24	Siklin B sentezi, MPF aktivitesi seviyesini mayotik maturasyonda kontrol eder	44
Şekil 25	Fare oositlerinde mayotik maturasyon sırasında, MPF ve MAPK aktivitesi. MPF aktivitesi kırmızı çizgiyle ve	45

	MAPK yeşil çizgiyle gösterilmektedir	
Şekil 26	Çekirdek zarının parçalanması	46
Şekil 27	Mikrotübüllerin ve kromozomların düzenlenimi	48
Şekil 28	Oositte Kalsiyum salınımı ve cAMP yolağı	50
Şekil 29	Oositte PDE9A yolağı ve cGMP	52
Şekil 30	Bu şemada iNOS ve eNOS sistemlerinin hCG enjeksiyonundan önce ve sonra farklılıklarını göstermektedir	53
Şekil 31	Emi 1'in CSF beklemesindeki rolünü gösteren şema	55
Şekil 32	MAPK ile Mos sentezi uyarılığını gösteren şema	56
Şekil 33	Natriüretik peptid C/ Natriüretik peptid reseptör 2 (NPPC/NPR2) sistemi yolağı	59
Şekil 34	CSF aktivitesi ve diğer moleküllerin aktivitesini gösteren şema	60
Şekil 35	Oositlerde Metafaz II arrest	60
Şekil 36	Foliküler apoptoz	62
Şekil 37	Hücre döngüsü	64
Şekil 38	Hücre Siklusu İnhibitörleri	65
Şekil 39	RB, E2F ve Cdk2 / siklin E aktivitesini gösteren şema	68
Şekil 40	Sitokinler, Büyüme faktörleri, IGF, Kemokinler, Wnt yolaklarının ilerleyişini gösteren şema	68
Şekil 41	Gonadotropinlerin (LH, FSH) oosit maturasyonu düzenlemesindeki fonksiyonunu gösteren şema	86

1.GİRİŞ

İnsan gelişimi fertilizasyonla başlar. Fertilizasyon, erkek gameti sperm (spermatozoon) ile dişi gameti oositin (ovum) bir araya gelerek tek hücreli bir yapı olan zigotu oluşturmaktadır (Resim 1). Gametogenez ise germ hücrelerinin erkek ve dişi gametlere dönüşümüdür (1, 2).



Resim 1: Erkek ve dişi gametlerin biraraya gelerek tek hücreli bir yapı olan zigotun oluşumu (3, 4).

Normal dişi fertilitesi oositin gelişmesi, olgunlaşması ve fertilizasyon için ovulasyon sürecini sorunsuz geçirmesine dayalıdır. Bu süreç oositin gelişimi sırasında oositin mayotik evreyi geçirmesi ve oosit matürasyonu dediğimiz olgunlaşma sürecini tamamlaması ile gerçekleşir. Oosit maturasyonu; mayotik duraklama sürecinin ortadan kalkarak oositin, mayozun Profaz I evresinden Metafaz II evresine geçmesini tarif eder. Bu durum bir takım destekleyici ve/veya inhibe edici faktörler tarafından düzenlenmekte olup, normal ovulasyon ve fertilizasyon için bu süreçlerin sorunsuz geçirilmesi gereklidir (5).

Fertilizasyona hazırlanan erkek ve dişi germ hücrelerinin sitoplazma ve kromozomlarında bir seri değişiklikler oluşur. Bunun iki temel amacı vardır;

a) Somatik hücrelerdeki diploid kromozom sayısının '46', gametlerdeki haploid kromozom sayısına '23' indirgenmesi, ki bu olay mayotik veya olgunlaşma bölünmesiyle gerçekleştirilir.

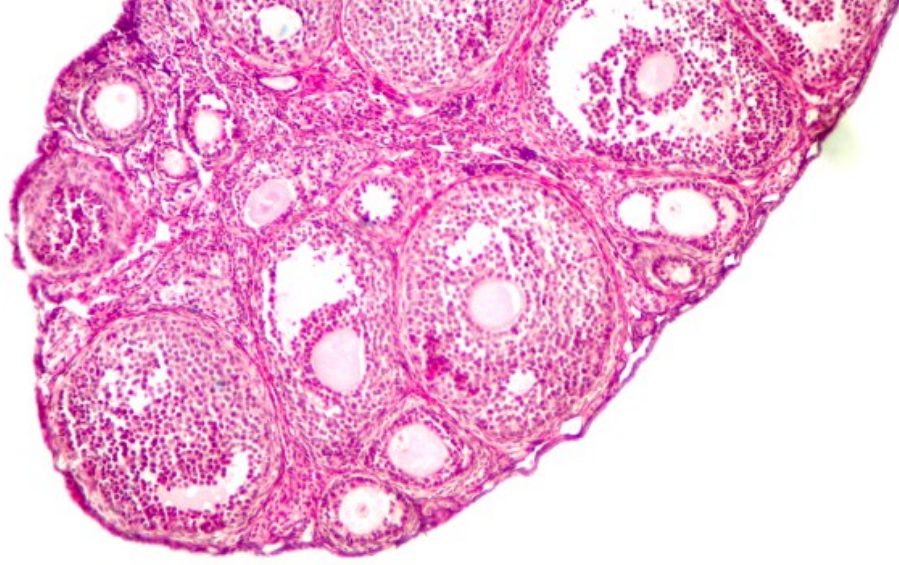
b) Döllenmeye hazırlık olarak üreme hücrelerinin biçiminin değişmesi gerekir. Erkek üreme hücresi sitoplazmasını kaybeder, baş, boyun ve kuyruktan oluşan, ince uzun bir hücreye dönüşür. Buna karşılık dişi üreme hücresi sitoplazma miktarını artırarak irileşir. Olgun bir oositin çapı 120 mikrondur.

İnsan somatik hücreleri 23 çift veya diploid sayıda kromozom içerir. 22 çift otozom (eş kromozomlar) 1 çift seks kromozomudur. Seks kromozomu XX ise dişi, XY ise erkektir. Her kromozom çiftinin biri anneden biri de babadan gelir (1, 2).

1.1. OVARYUM

Ovaryumda gametlerin üretimi (gametogenez) ve steroid yapıda hormonların üretimi (steroidogenezis) gerçekleşir. Dişilerde gametlerin üretimi 'oogenez' olarak isimlendirilir. Gelişen gametler 'oosit' olarak isimlendirilir. Olgun gametler ise 'ovum' olarak isimlendirilir. Ovaryum tarafından östrojen ve progesteron hormonları sentezlenir ve salgılanır. Östrojen iç ve dış genital organların büyümesini ve olgunlaşmasını sağlar ve pubertede karakteristik dişi özelliklerinin oluşmasında rol oynar (1, 6, 7).

Ovaryum korteks ve medulla bölgelerinden meydana gelir (1, 2) (Resim1.1).Ovaryumun merkezi bölümü medulla olarak isimlendirilir. Gevşek bağ dokusu, büyük kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler içerir. Ovaryumun medullayı çevreleyen periferik bölümü korteks olarak isimlendirilir. Hücreden zengin bir bağ dokusu içinde çeşitli aşamalarda bulunan ovarian foliküller yer alır. Ayrıca düz kas lifleri de gözlenir. Ovaryumda korteks medulla sınırı belirgin değildir. Ovaryum dıştan 'germinal epitel' ile sınırlıdır. Tek katlı kübik epitel şeklinde ve bazı bölgelerde ise tek katlı yassı epitel özelliğinde olan bir epiteldir (6) (Resim 1. 1).



Resim 1.1: Ovaryum dokusu ve gelişen foliküller (Tezden-Resim 3. 24).

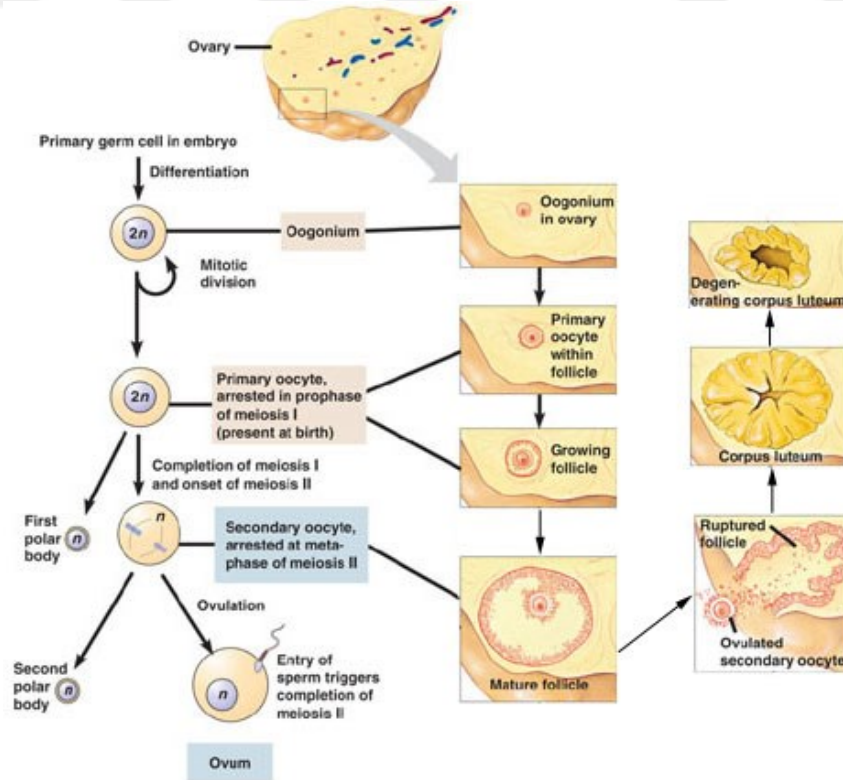
Eskiden germ hücrelerinin ovaryumları çevreleyen bu epitelden köken aldıkları düşünüldüğünden ‘germinal epitel’ olarak isimlendirilmiştir. Günümüzde ise germ hücrelerinin vitellüs kesesinden köken aldığı ve ovaryumlara göç ettiği bilinmektedir (1, 2).

Oogenez

Doğumdan önce; ilkel dişi cins hücresi olan oogonyumlar mitoz bölünmeyle çoğalırlar. Çoğalan oogonyumların bir bölümü büyüyerek primer oositleri oluşturur. Primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasının diploten safhasına gelirler ve burada bekleme sürecine girerler (1, 6, 7).

Doğumdan sonra; tüm primer oositler 1. mayoz bölünmenin profaz aşamasındadır. Ancak doğumdan sonra puberte döneminde folliküler gelişim ile 1. mayozu tamamlarlar. Puberteye kadar 1. mayozun profaz safhasında diploten aşamasında bekleyen primer oositlerin mayozu bitirip olgunlaşması oositi saran follikül hücrelerinden salgılanan oosit maturasyonunu inhibe edici (OMI) faktör tarafından sağlanır (1, 6, 7).

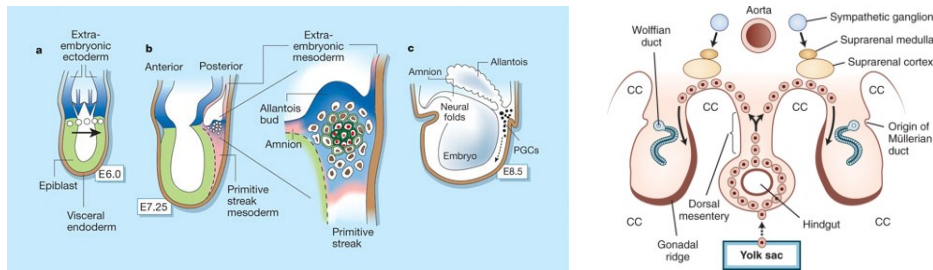
Doğumda 1-2 milyon kadar primordiyal follikül bulunur. Çocuklukta folliküllerin çoğu dejenere olur. Puberteye gelindiğinde ise ovaryum dokusunda yaklaşık 400.000 adet primordiyal follikül bulunur (1) (Şekil 1).



Şekil 1: Oogenez Aşamaları (8).

Doğumdan önce, ilkel dişi germ hücresi olan oogonyumlar mitoz bölünmeyle çoğalırlar. Oositler, Primordiyal germ hücrelerinden (PGCs) köken alır. İnsanlarda PGC prekürsörleri 4. Hafta başında umbilikal kese duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanmaları sırasında vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Bu olurken, primordiyal germ hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabarıntılara göç ederler. 6. Hafta sırasında primordiyal germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve gonadal kordonlara dahil olurlar. Yaklaşık 29. ila 33. gün arasında gonadal bölgeye ulaşırlar(13).Primordiyal germ hücrelerinin göçü, Stella, fragilis genleri ve BMP-4 tarafından düzenlenmektedir (6). Farelerde, PGC prekürsörleri, koitustan sonra 6,25. gün civarında proksimal epiblast içinde ortaya çıkar (12, 14). Koitustan yaklaşık 7,25. günden sonra, primordiyal hücre prekürsörleri allantoisin tabanından ekstraembriyonik mezoderm içine doğru göç ederler (10, 11) (Şekil 2). Embriyonik gelişimin 7,5-8,5. günleri arasında, ekstraembriyonik mezodermden bağırsak endoderm içine doğru göç ederler ve 9,5 günden 11,5 güne kadarda bağırsağın dorsal mezenterinden gonadlara doğru göç ederler (11, 12).

Primordiyal germ hücrelerinin çoğu gonadlara ulaşamaz, birçoğu dejenere olur. Aynı şekilde gonadların da ileri gelişimi için primordiyal germ hücrelerinin gonadlara ulaşmış olması gerekmektedir (6, 7, 15, 16).



Şekil 2: Primordiyal germ hücreleri allantois tabanından ekstraembriyonik mezoderm içine doğru ilerleyip, bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ilerleyerek gonadal bölgeye göç ederler (17).

Primordiyal germ hücreleri gelişmekte olan gonadlara ulaşır ulaşmaz oogoniumlara farklıdır. Bu arada mitoz ile hızlıca çoğalarak oogoniumların sayıları artar (6, 7, 15, 16). Oogoniumlar bölünerek hücre kümeleri oluştururlar ve hücreler arası köprüler aracılığı ile birbirleri ile ilişki kurarlar. Bu olaya kolonizasyon adı verilir. Hücreler arası köprülerin hızlı mitoz sonucu sitoplazmaların tam ayrılamamasına bağlı olduğu düşünülmektedir (15).

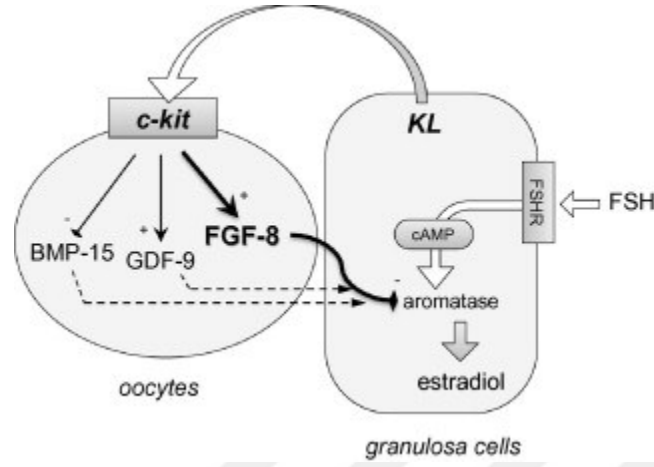
Primordiyal germ hücrelerinin çoğalması ile oogoniumların oluşumunu sağlayan faktörler; Reseptör tirozin kinaz (c-kit)/Kit Ligand, LIF, FGF2, IL-4, TNF- α , PACAP (Pituitary adenylate cyclase peptide) dir.

a) (c-kit)/Kit Ligand

c- kit reseptör tirozin kinaz PDGF/CSF-1/c-kit reseptör ailesi üyesine aittir. Kit-ligand (KL), faktörü reseptör olarak fonksiyon görür. KL, transmembran proteinleri gibi iki alternatif formda mRNA'lara eklenerek sentezlenir. KL ya sıvı form halinde proteolitik yarıklanmayla üretilebilir ya da hücre ile ilişkili molekülerde fonksiyon görebilir. c- Kit ligand reseptör kinaz ve KL, mutasyonları sonucunda gametogenez, melanogenez ve hematopoezde aksamalara neden olduğu bildirilmiştir. c-kit özellikle hücre salgılanması önemli iken, KL'nin mikroçevrede salgılandığı görülmüştür. Gametogenezde c-kit primordiyal germ hücrelerinde, spermatogoniada ve primordiyal ve gelişen oositlerde eksprese edilir (18).

Bununla beraber fare ovaryum dokularının in vitro ortamda kültürü sırasında BMP4 ilavesi ile primordiyal foliküllerin c-kit'i eksprese ettikleri ve kültüre devam edildiğinde hem primordiyal foliküllerin canlı kaldığı, hemde c-kit ekspresyonunun devam etmesi ile primer folikül olarak gelişimine devam ettiği gösterilmiştir (11).

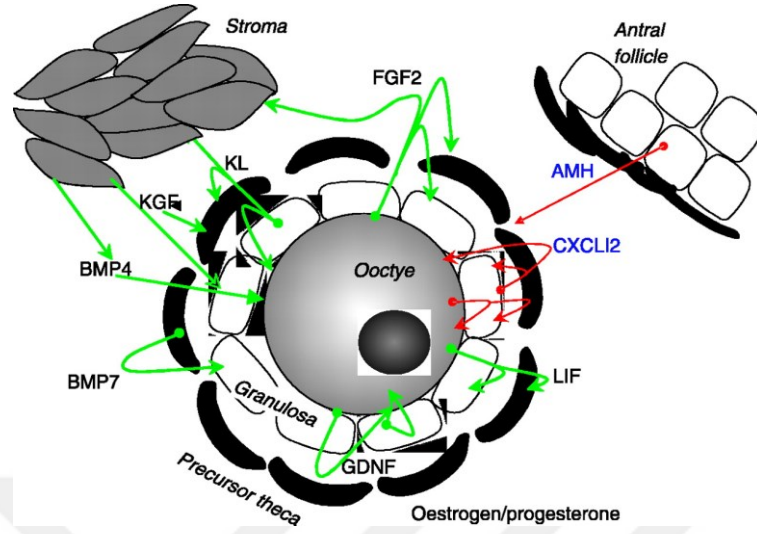
Bununla beraber kit ligand (KL)-c-kit bağlantısının oogenez ve folikülogenezde kiritik rol oynadıkları da bilinmektedir (Şekil 3)(19).



Şekil 3: Oogenez'de (KL)-c-kit bağlantısının şematik görünümü (20).

b) Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) ve Lösemi İnhibitör Faktör (LIF)

PGC'ler, gelişimin erken dönemlerinde farklılaşmaya başlarlar. Çoğalır ve gelişen gonadlara göç ederler. Sonuçta spermatogonium ve oogoniumların oluşumunu sağlarlar. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, PGCs'leri işaretleyerek 'nanos3 3'UTR' keşfedilmiştir. DsRed'in PGC spesifik ekspresyonunun yanısıra DsRed-nanos3 3'UTR hibrid mRNA'ları 1-2 hücreli safhasındaki embriyolarda üretildiği zaman bu ekspresyon fertilizasyondan sonra, 26 günden daha fazla uzatılmıştır. Buna benzer şekilde, zebra balığı PGC'lerindeki lösemi inhibitör faktör (LIF), bazik fibroblast büyüme faktörü (FGF2) ve kemik morfojenetik protein 4 (BMP4) eksprese edildiği gösterilmiş ve 3 haftadan daha uzun periyotlarda in vivo PGC gelişiminin etkilerinin arttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak FGF2'nin ekspresyonunun fertilizasyondan sonra 14 ve 21 günlüklerde PGC sayısını arttırdığını gösterilmiştir. BMP4 ekspresyonunun ise, 3 günlük embriyoların şiddetli ventralizasyonu ve ölümü ile sonuçlanmıştır (Şekil 4). LIF'in ekspresyonu PGC göçünün bozulması ile sonuçlanmıştır. Morfolino demonte deneyinde, PGC göçünün LIF reseptör a (LIFra) ile olduğu ancak LIFrb ile olmadığı gösterilmiştir. Zebra balığı PGC'leri stabilize bir mekanizma ve nanos3 3'UTR için uzun süreli mRNA ekspresyonuna sahiptir (21).



Şekil 4: FGF, LIF ve BMP4'ün PGC'lerdeki etkisinin şematize edilmiş şekli (22).

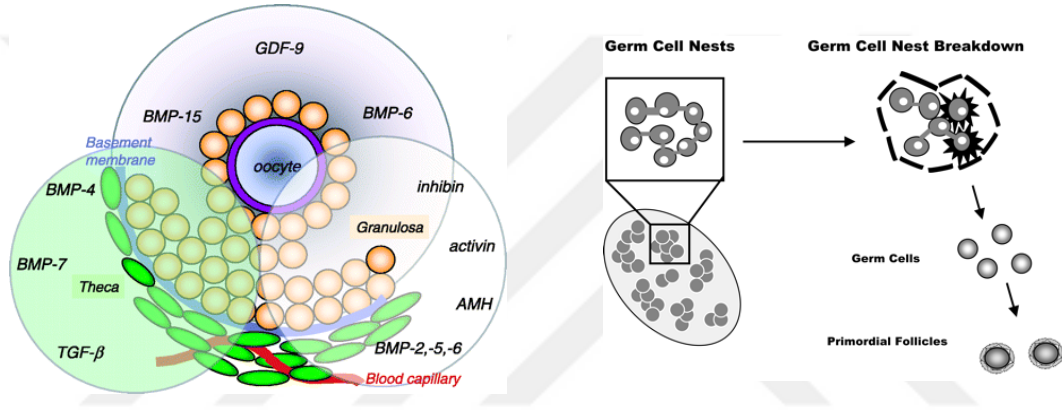
c) İnterlökin-4 (IL-4)

IL-4, bir pleiotropik sitokindir. Kültürde fare primordiyal germ hücrelerinin sayıları, doza bağımlı bir artışla stimüle edilir. Primordiyal germ hücreleri için mitojen olmasından ziyade hayati öneme sahiptir. IL-4 ve onun reseptörü için yapılan çalışmalarda, RT-PCR ve ELISA sonuçlarında IL-4 ve reseptörünün doğru zaman ve doğru yerde in vivo PGC sayılarını etkilediği gösterilmiştir (23).

d) Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

Embriyonik ve neonatal hayat sırasında primordiyal foliküllerin son bulunduğu inanılır. Doğumda, fare ovaryumunda, pregranuloza hücreleri tarafından çevrelenen oositler arasında iletişimsel demetler oluşur. Kısaca doğumdan sonra bu yapı, germ hücre kistleri ve yuvaları (GCN) olarak tanımlanır ve primordiyal folikül formunu kolaylaşması için yıkılır. TNF- α sayısız fonksiyonlarla yaygın bir protein ekspresyonu sağlar. TNF- α ovaryumda eksprese edilir ve sıçanlarda GCN yıkımı düzenleyebilir. Bu çalışmada, mutant hayvan modellerinde olduğu gibi in vitro ovaryum kültür sisteminde

kullanılan farelerdeki folikül formasyonunda ve GCN yıkımına katılan TNF- α araştırılmıştır. TNF- α ve her iki reseptörü (TNFRSF1A ve TNFRSF1B) neonatal fare ovaryumlarında eksprese edilir ve TNF'nin in vitro neonatal ekspresyonu ovaryumlarda oosit ölümünü destekler (Şekil 5). Yapılan bu çalışmada, fare oositlerinin hem TNF reseptörü hemde TNF- α - indüklü ölüm hassasiyetini eksprese ettiği gösterilmiştir. İlaveten TNFRSF1B, fare ovaryumunda TNF- α fonksiyonun önemli bir mediatörü ve folikülojenizde önemli regülatör olduğu gösterilmiştir (Şekil 5) (24).



Şekil 5: Follikülojenizde TNF ve GCN yuvalarının yıkımı (25, 26).

e) Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptides (PACAP)

Göç sırasında ve gonadal bölgeye varmalarından 2 gün sonra, primordiyal germ hücreleri aktif bir şekilde çoğalmaya başlar. Bazı büyüme faktörleri, örneğin kök hücre faktörleri ve lösemi inhibitör faktör (LIF), in vivo ve invitro hayatta kalmaları, çoğalmaları ve fare primordiyal germ hücrelerinin farklılaşmasında hayati öneme sahiptir. Benzer bir şekilde, kültürde, intrasellüler cAMP'nin artması, primordiyal germ hücre proliferasyonunun artmasının işaretlenmesi sayesinde takip edilir. Günümüzdeki çalışmalarda, pituitary adenylate cyclase activating polypeptides (PACAP-27 ve PACAP-38), sekretin-glukagon- vazoaktif intestinal polipeptid GH salınımı hormon ailesinin iki nöropeptidi, fare primordiyal germ hücrelerinin in vitro proliferasyonunu

stimüle eder. Primordiyal germ hücrelerine ve somatik hücrelere bağlanır (PACAP reseptör). Aynı hücrelerde adenilat siklaz aktiftir. Ayrıca, PACAP benzeri immunoreaktifler gonadal bölgelerde bulunmuş ve bunların çoğu germ hücre yüzeyinde tespit edilmiştir. Sonuç olarak, PCG proliferasyonu bazı bioaktif polipeptidler tarafından stimüle edilebildiği gösterilmiştir. Böylece erken gonadal gelişimde bazı bileşiklerin düzenleyici rolü olduğu saptanmıştır (27).

Oogenez prenatal maturasyon ve postnatal maturasyon olmak üzere iki evrede incelenebilir. İnsanda intrauterin hayatın 4. ayından sonra oogoniumlardan primer oositler oluşmaya başlar. Bu arada yüzeyel germinal (kölomik) epitelinin proliferasyonu ve invajinasyonları sonucu oluşan foliküler hücreler de oogonia ve primer oosit kümelerini sarmaya başlar. İntrauterin 7. aydan sonra artık hiç oogonia kalmamıştır ve her primer oosit ayrı olarak folikül hücrelerince sarılmıştır. Bu yapı artık primordiyal folikül olarak adlandırılır. Foliküler hücreler ve germ hücreleri arasında desmozom ve geçit bağlantıları (Gap junction) oluşmuştur (15). Tek katlı yassı foliküler hücreleri çevre bağ dokudan ayıran bazal lamina da oluşmuştur. Bu dönemde overde sadece primordiyal foliküller görülür. Artık mitoz ile çoğalma da biter. Oogoniumların bir bölümü büyüyerek primer oositleri oluşturur. Primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasının diploten safhasına gelirler ve burada puberteye kadar bekleme sürecine girerler (15).

Ovaryumların gelişmesiyle PGC leri çoğalmaya başlarlar. Sonunda 13,5. günde mayoza girerler ve primer oositleri oluştururlar (28, 29). Oositlerin birçoğu, 14,5 günde mayoza girer (30,31). Ve doğum sırasında birinci mayozun diploten safhasında arrest oluşur. Bu safhada, oositler primordiyal folikül şeklini oluşturmak için ayrı ayrı pregranuloza hücreleriyle çevrelenirler (12, 32).

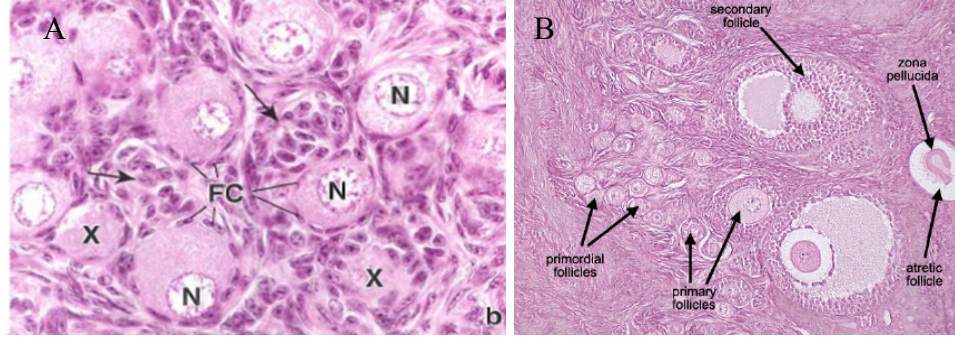
Germinal epitelin altında yoğun bağ dokusu yapısında 'tunica albuginea' bulunur. Ovariyan foliküller gelişen oosit için bir mikroçevre oluştururlar. Değişen boyutlardadırlar ve tek bir oosit içerirler. Folikülün boyutları oositin gelişim aşamasına göre değişir. Oogenezin erken aşamaları fetal dönemde başlar ve doğumda oosit birinci mayoz bölünmede beklemededir. Oosit ovulasyon ile birinci mayoz bölünmesini tamamlar ve ikinci mayoz bölünmeye girer. Spermle karşılaştıktan sonra yani fertilizasyon olayıyla ikinci mayoz bölünmesini tamamlar. Her menstrüel siklуста

normalde sadece tek bir oosit tam olgunluğa erişir ve ovaryumdan salgılanır. Üretken dönemde bir kadın 400 civarında olgun oosit üretir. Doğumda ovaryumlarda bulunan 600-800 bin primer oosit ise zamanla atrofiye uğrar. Atrezi olayı fetal hayatın beşinci ayında başlar ve oositi çevreleyen hücrelerin apoptozisi ile gerçekleşir (1).

Folikül gelişimi sırasında; a) Primordiyal folikül, b) Gelişen folikül; kendi içinde Primer folikül, Sekonder folikül şeklinde ayrılır ve c) Matür folikül (Graff folikülü) olarak üç farklı döneme ait folikül görülür.

a) Primordiyal foliküller:

Ovaryumda gelişimin tüm aşamalarında foliküller bulunur fakat primordiyal foliküller dominanttır. Primordiyal foliküller ilk olarak ovaryumlarda fetal gelişimin 3. ayında görülürler. Primordiyal foliküllerin erken evrede gelişimi gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır. Matür ovaryumda primordiyal foliküller korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında lokalizedirler. Primordiyal folikülde primer oosit tek katlı yassı folikül hücreleri tarafından çevrelenmiştir. Folikül hücreleri ise dıştan bazal lamina ile çevrelenmiştir. Oositin çapı yaklaşık 30 µm dir. Çekirdek büyük ve ekzantrik yerleşimlidir. Çekirdekte ince bir kromatin ağı ve bir veya daha fazla çekirdekçik gözlenir. Oositin sitoplazması 'ooplazma' olarak ta isimlendirilir. Ooplazmada 'Balbiani cisimcikleri' olarak isimlendirilen Golgi ve endoplazmik retikulum membranları, çok sayıda mitokondriyonlar ve lizozomların kümeleşmesi sonucu oluşan yapılar gözlemlenir. Ayrıca insan oositlerinde sitoplazmada 'annulate lameller' (düz lameller), çok sayıda küçük veziküller ve küçük sferik mitokondriyonlar gözlenir (Resim 1.2). Annulate lameller yapı olarak çekirdek zarına benzer, çekirdek zarı gibi porlar içerir (1, 16).



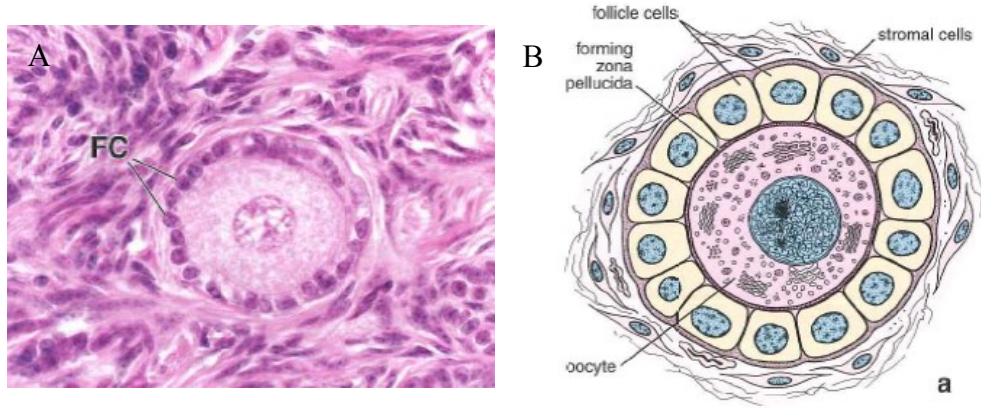
Resim 1.2: Ovaryum dokusunda germinal epitelium altında sıralanmış primordiyal germ hücreleri ve onun şematik gösterimi (A,C) (1). Primordiyal folikülün diğer foliküller içerisinde gösterimi (B) (33).

b) Gelişen Foliküller:

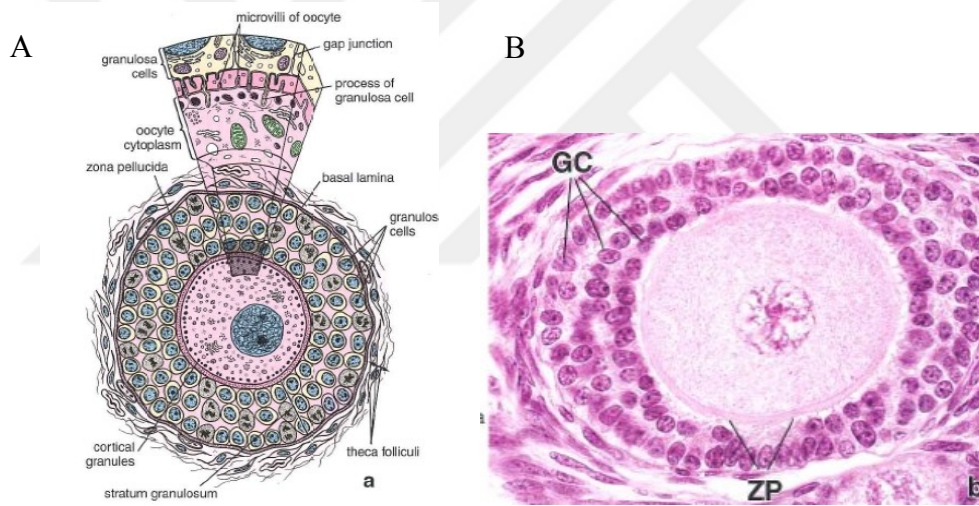
Primer foliküller:

Büyüyen folikülün ilk aşamasıdır. Oositin boyutları artar ve çevreleyen folikül hücreleri proliferasyon olarak kübik hücreler şekline dönüşürler. Folikül hücreleri kübik hücrelere dönüştüğü andan itibaren artık 'primer folikül' olarak isimlendirilir. Oosit büyürken oosit ve çevreleyen folikül hücreleri arasında 'zona pellüsida' adı verilen homojen, iyi boyanan asidofilik tabaka oluşur. Zona pellüsida jel benzeri bir tabakadır ve büyüyen oosit ve çevreleyen folikül hücreleri tarafından sekrete edilir. Zona pellüsida glikozaminoglikanlardan ve glikoproteinlerden zengindir ve (Periyodik asit

shiff) PAS boyası ile pozitif boyanır. Çevresinde tek sıralı kübik folikül hücreleri ile çevrili primer oosit ‘unilaminer primer folikül’ olarak isimlendirilir (Resim1.3). Folikül hücreleri dıştan bazal lamina ile sınırlıdır. Sonraki aşamada kübik folikül hücreleri hızlı bir şekilde proliferasyona uğrarlar ve çok tabakalı bir epitel oluştururlar. Çok tabakalı folikül epitel hücreleri aynı zamanda ‘granuloza hücreleri’ olarak isimlendirilirler ve bu tabaka ‘stratum granulozum tabakası’ olarak isimlendirilir (Resim1.4). Granuloza hücreleri dıştan bazal lamina ile sınırlıdır. Granuloza hücreleri arasında gap junctionlar aracılığıyla bağlantı kurulur. Hücreler arasında sıkı bağlantı kompleksleri bulunmadığı için kan-folikül bariyeri oluşmaz. Kandan bazı besin maddeleri foliküle ulaşabilir ve bu normal ovum ve folikül gelişimi için gereklidir. Bazal lamina çevresindeki stromal hücreler ‘teka folikülü’ tabakasını oluşturur. Teka folikülü iki tabaka şeklinde incelenir; teka interna ve teka eksterna olmak üzere. İçteki tabaka yani bazal laminayı hemen çevreleyen tabaka teka interna tabakasıdır ve yüksek oranda vaskülarize bir tabakadır. Teka interna tabakasında kübik salgı hücreleri bulunur. Tipik steroid sekrete eden hücre özelliğindedirler. Teka interna hücreleri LH (lüteinizan hormon) için çok sayıda reseptörler taşırlar. LH stimülasyonuna yanıt olarak teka interna hücreleri östrojen prekürsörü olan androjenleri sentez ve sekrete ederler. Salgı hücrelerine ilaveten teka internada fibroblastlar kollagen lifler ve çok sayıda küçük kan damarları bulunur. Teka internanın dışında teka eksterna tabakası bulunur. Teka eksternada esas olarak düz kas hücreleri ve demetler halinde kollagen lifler bulunur. Teka interna ve teka eksterna arasındaki sınır belirgin değildir. Primer folikül yapısında Balbiani cisimcikleri gözlenmez. Yani organeller sitoplazmada kümeler şeklinde gözlenmez. Sitoplazmada Golgi kompleksi, GER, mitokondriyonlar, küçük veziküller, multiveziküler cisimcikler ve çok sayıda serbest ribozomlar gözlenir. Ayrıca bazı lipit damlacıkları ve lipokrompigmenti gözlenebilir. Plazma membranının (oolemma) hemen altında ‘kortikal granüller’ gözlenir. Kortikal granüller proteaz içerirler ve fertilizasyon esnasında salgırlar. Oosit ile granuloza hücreleri arasında zona pellusidanın bulunduğu bölge ‘perivitellin aralık’ olarak isimlendirilir. Oositten çok sayıda düzensiz mikrovilluslar perivitellin aralığa doğru uzanırlar. Aynı zamanda granuloza hücrelerinin silindir tarzındaki uzantıları oosite doğru uzanırlar. Uzantılar oolemma ile temas edebilirler (1) (Resim1.4).



Resim 1.3: Ovaryum dokusunda te katlı kübik folikül hücreleri ile çevrelenmiş primer folikül ve onun şematik gösterimi (A,B) (1).

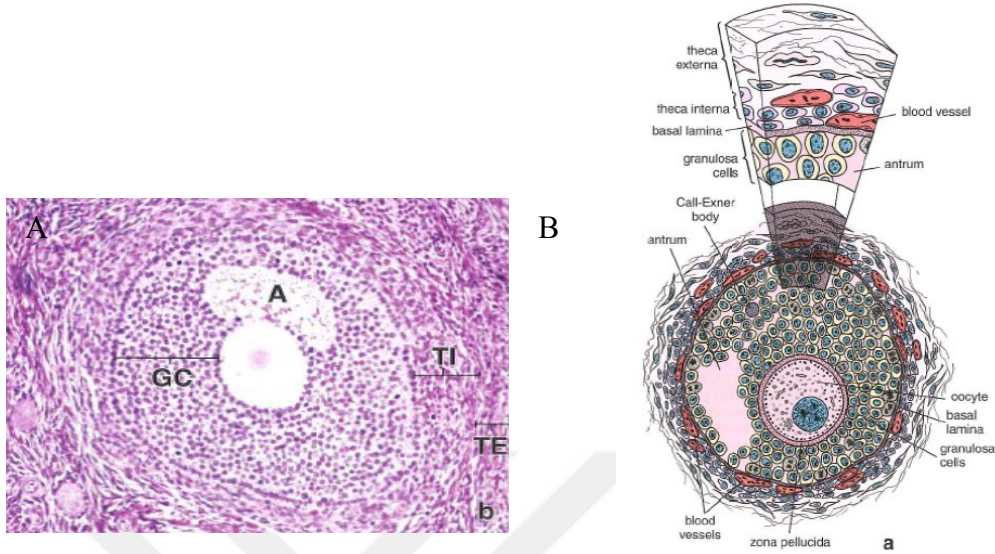


Resim 1.4: Çok tabakalı primer folikül(A) (1) B: Çok tabakalı primer folikül şematik resmi (B) (1).

Sekonder Foliküller:

Granuloza hücrelerinin proliferasyonu ve folikül boyutları artar. Oosit ve folikül boyutlarının büyümesi için bazı faktörler (FSH, epidermal büyüme faktör, insülin benzeri büyüme faktör 1 ve Kalsiyum iyonları) gereklidir. Stratum granulosum 6-12 sıralı olduğu zaman granuloza hücreleri arasında sıvı dolu kaviteler oluşur. Başlangıçta birkaç sıvı dolu boşluk görülür, daha sonra birleşerek tek ve büyük bir boşluk oluşur.

Hyaluronik asitten zengin bir folikül sıvısı ile dolu bu kavitelere 'antrum' adı verilir. Ve bu folikül artık 'sekonder folikül' ya da antral folikül olarak isimlendirilir. Oosit ekzantrik yerleşimlidir ve 125 µm çapındadır. Bu aşamada granuloza hücreleri tarafından oosit maturasyonunu 'oosit maturasyonunu inhibe edici madde' (OMI) sekrete edilir ve antral sıvıya salgılanır. Bu şekilde bütün foliküllerin maturasyonunu tamamlayarak graff folikülüne dönüşmesi engellenir. Çünkü sadece bir folikülün gelişimini tamamlayarak graff folikülüne dönüşmesi gerekir. Sekonder folikül çap olarak başlangıçta 0.2mm'dir, fakat geç aşamada 10mm veya daha fazla olabilir. Sekonder folikülde granuloza hücreleri arasında PAS-pozitif boyanan 'Call-Exner' cisimcikleri bulunur. Call-Exner cisimcikleri granuloza hücreleri tarafından sekrete edilir ve hyaluronik asit ve proteoglikanlar içerirler. Sekonder folikülün geç safhalarında folikül boyutları ve antrum boyutları artar. Oositin bulunduğu bölge dışında stratum granulozum uniform bir görünüm alır. Oositin bulunduğu bölgede ise granuloza hücreleri kümelenerek bir tepecik oluştururlar. Antruma doğru uzanan bu tepecik 'kumulus ooforus' olarak isimlendirilir. Oositi sınırlandıran, ışınal tarzda yerleşmiş kumulus ooforus hücreleri 'korona radiata' olarak isimlendirilir. Korona radiata hücrelerinden zona pellusidaya doğru mikrovilluslar uzanır. Mikrovilluslar oositin mikrovillusları ile gap junctionlar aracılığı ile bağlantı kurarlar. Korona radiata hücreleri ovulasyonda oosit ile birlikte atılırlar. Foliküler gelişim esnasında granuloza hücrelerinin yüzey mikrovillusları artar ve antruma bakan yüzeylerinde LH reseptörlerinin sayısı artar (1) (Resim 1.5).

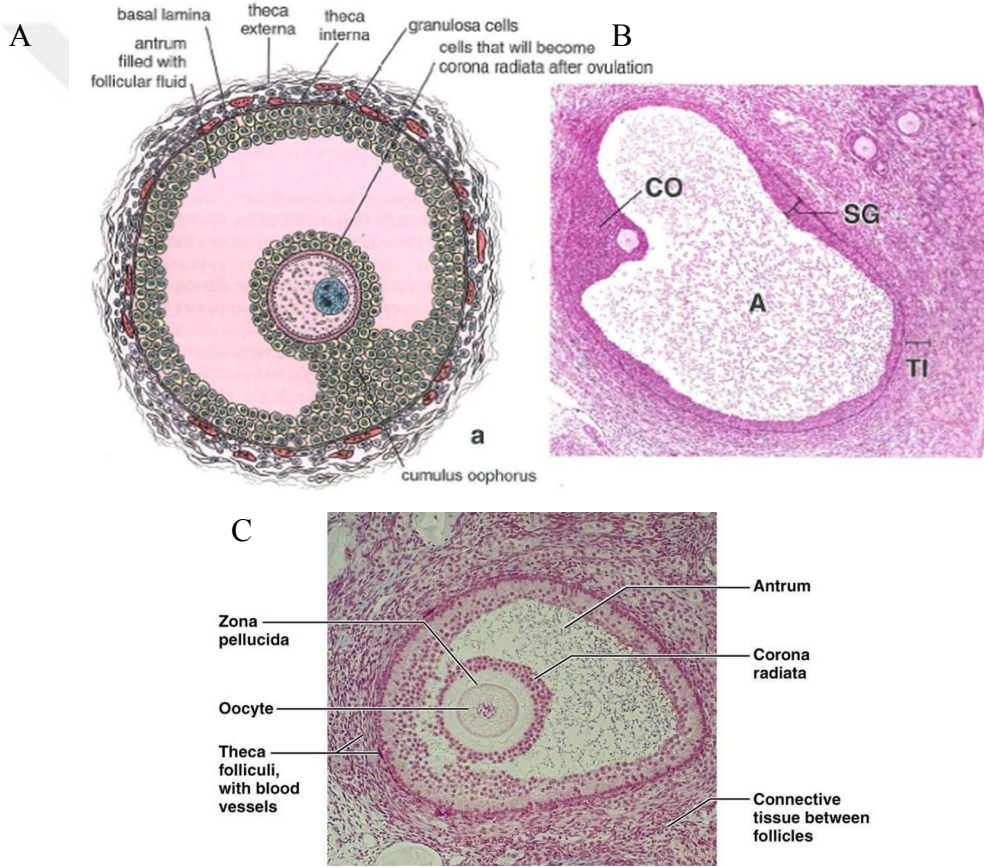


Resim 1.5: Ovaryum dokusunda granuloza hücreleri ile çevrelenmiş sekonder folikül, onun şematik gösterimi ve dikkat çekici zona pellusida tabakası (B,C) (1).

c) Matür folikül (Graff folikülü):

Çapı 10mm veya daha fazladır. Büyük boyutundan dolayı ovaryum korteksinin kalınlığı boyunca yayılabilir ve ovaryum yüzeyinde bir çıkıntıya neden olur. Folikül maksimum boyutlarına ulaştığı zaman granuloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Antrum boyutları arttığı için stratum granulosum oositin olmadığı bölgelerde daha ince görülür. Granuloza hücreleri arasındaki mesafeler artar ve kumulus – oosit kompleksi ovulasyona hazırlık olarak diğer granuloza hücrelerinden gevşer. Oositi tam olarak çevreleyen kumulus hücreleri artık tek sıra şeklinde korona radiata oluştururlar. Korona radiata hücreleri ve gevşek olarak birbirine tutunan kumulus hücreleri ovulasyonda oositle birlikte atılır. Bu periyotta teka tabakası çok önemlidir. Teka interna hücrelerinde lipit damlacıkları görülür ve hücreler tipik steroid salgılayan hücre özelliğindedirler. İnsanlarda LH stimülasyonu ile teka interna hücreleri tarafından östrojen prekürsörü androjenler salgılanır. Bu androjenlerin bir bölümü granuloza hücrelerinin düz endoplazmik retikulumuna transport edilir. FSH'a yanıt olarak granuloza hücreleri androjenleri östrojenlere dönüştürerek salgırlar. Östrojen

etkisiyle granuloza hücreleri prolifer olurlar ve folikülün boyutları artar. Foliküler ve sistemik kaynaklarda östrojen düzeylerinin artması gonadotropoların gonadotropin-releasing hormona duyarlılıklarını artırır. Ovulasyondan 24 saat önce adenohipofiz tarafından oldukça yüksek düzeyde FSH ve/veya LH salgılanır. LH pikine yanıt olarak granuloza hücrelerinin LH reseptörleri desensitize olurlar ve granuloza hücreleri artık LH'a yanıt olarak östrojen üretmezler. LH pikinden 12-14 saat sonra primer oosit 1. mayoz bölünmesini tamamlar ve sekonder oosit oluşur. Aynı zamanda birinci polar cisimcik oluşur. Yani Graaf folikülü sekonder oosit içerir (1) (Resim1.6).



Resim 1.6: Ovaryum dokusunda granuloza hücreleri ile çevrenmiş Graaf folikül, onun şematik gösterimi ve dikkat çekici boyuta ulaşmış Antrum (A,C) (1). Teka tabakasıyla çevrenmiş Graaf folikül, korona radiyata hücreleriyle çevrenmiş ve henüz atılmamış sekonder oosit (C) (34).

1.2. FOLİKÜLOGENEZİN MOLEKÜLER YAPISI

Overler endokrin ve ekzokrin karma fonksiyona sahip organlardır. Dişi germ hücresi olan oositin üretimi endokrin fonksiyonu iken, seks hormonları olan östrojen ve progesteronun üretimi ekzokrin fonksiyonudur. Folikül yapısı overlerin ana fonksiyonel ünitesidir. Folikülogenez, folikülün primordiyal fazdan başlayarak morfolojik olarak belirlenen primer, preantral ve antral fazları geçerek graaf veya preovulatar folikül fazıyla sonuçlanmasıdır. Ovulasyondan sonra folikül korpus luteuma dönüşür. Folikülogenez sırasında oositler büyürken granüloza hücreleri de çoğalır ve farklılaşır. Oositin sonraki gelişimi ve birincil mayotik bölünmenin tamamlanması, oositin fertilizasyon için tubalardan geçişi sırasında olur (35, 36).

Primordiyal germ hücreleri intrauterin folikülogenez sırasında çap olarak büyür ve mayotik olgunlaşmaya doğru gider. Bu işlev, primordiyal germ hücrelerinin 1. mayozun profaz aşamasının diploten safhasına ulaşır ve bu aşamada durması ile sonuçlanır. İntrauterin dönemde overlerde yaşayan her diktiyat oosit pregranüloza hücrelerinden oluşmuş tek katlı yassı hücre tabakası ile çevrilidir, bu hücreler daha sonra bazal lamina tarafından çevrilerek primordiyal folikülleri oluşturur. Doğumdan sonra primordiyal foliküllerin büyük çoğunluğu periyodik olarak 3 haftalık büyüme fazına girerler. Oositin büyümesiyle beraber tek katlı yassı görünümdeki granüloza hücreleri de kübik bir şekil alacak biçimde farklılaşır ve primer folikülü oluşturur. Granüloza hücrelerinin çoğalması, foliküler bazal membranın içinde çok katlı granüloza hücreleri tarafından çevrelenmiş preantral folikülleri oluşturur. Puberteden sonra gonadotropinler ve FSH'nin etkisi ile foliküllerin büyüme hızı artar ve granüloza hücreleri arasında birtakım boşlukların şekillendiği, antral foliküllerin oluşumu gerçekleşir. Geniş antral foliküller içerisinde bulunan oositler olgunlaşma için yeterli kabiliyete sahip olmalarına rağmen, kendilerini çevreleyen granüloza hücreleri ile etkileşimlerinden dolayı gelişmeleri durmuş olarak kalır. LH pikine cevap olarak gelişmesini tamamlamış oositler birinci mayoz bölünmelerini tamamlarlar, ilk polar cisimciği atıp, metafaz II de duraklamış hale gelirler. LH piki ovulasyonla oositin atılmasından dolayısıyla folikül gelişiminin bitmesinden sorumludur. Bir siklusta ovulasyonla sonuçlanan foliküllerin sayısı, büyüme için ortaya çıkan foliküllerle

karşılaştırılacak olursa daha az olacaktır. Çünkü bu foliküllerin çoğu atreziye uğrar. Foliküller gelişimsel fazların herhangi birinde atretik olabilirler ama preantral fazda bu daha sıktır. Oositin folikül içerisinde ölümü intrensek te olabilir, foliküler hücrelerin ölümünün neticesi de olabilir (37, 38, 39).

Folikülogenez ve oogeneze fertilizasyon ve embriyonik gelişim kapasitesine sahip matür oositi oluşturmak için gap junction tipi bağlantı kompleksleri aracılığıyla eş zamanlı iletişim ve koordinasyon sağlarlar. Oosit olmadan folikül oluşmaz ve oosit gelişimi çevresindeki granüloza hücreleri tarafından düzenlenir. Oositler folikül oluşumunu, düzenli granüloza hücre çoğalmasını, steroid yapımının düzenlenmesini ve gelişen folikülün üç boyutlu yapısının devam ettirilmesini sağlayan sinyalleri salgılar. Buna benzer olarak granüloza hücre sinyalleri mayotik duraklamayı düzenler, oosit büyümesini artırır ve mayoz ile oosit gelişiminin devamını kolaylaştırır (37, 38, 39).

Oosit gelişimi ve maturasyonu, gap junctionlar aracılığıyla granüloza hücrelerinin fonksiyonel haberleşmesi ve endokrin ve parakrin etkileşimine bağlıdır. Bu süreç, büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından düzenlenir (40). Memelilerde, bu kompleks düzenleme mekanizması, oogenezin erken safhalarından itibaren başlar. İn vitro koşullarda PGC' lerinden farklılaşması zor olduğundan, bu durum kısmen anlaşılabilmiştir (41). Buna ilaveten, kök hücre çalışmalarının gelişimi, biyomedikal uygulamaların varlığı ile oosit maturasyonunun anlaşılması veya oosit benzeri hücrelerin üretiminin yapılabildiği bildirilmiştir (41, 42). Yeni doğan fare ovaryumlarından üretilen oositler in vitro koşullarda normal gelişimine devam edebilirler. Gelişen ve olgunlaşan oositler uygun ortamlarda daha ileri gelişim gösterebilirler. Bunun tersine, PGC' lerinden oluşan oositler veya in vitro koşullardaki premayotik germ hücreleri, birinci mayoz bölünmenin profazında kalır ve maturasyonu tamamlamakta başarısız olurlar (42).

Primordiyal germ hücreleri, genital çıkıntılara ulaştıktan sonra, mitoz bölünmeler ile sayılarını arttırlır. Farede, bu hücreler transforming büyüme faktörü β (TGF β) süperailisi üyeleri etkisiyle hızla bölünürler (43). Fetal hayatın 20. haftasında germ hücrelerinin sayısı yaklaşık 7 milyona ulaşır. 3. ve 5. aylar arasında, ilk mayoz

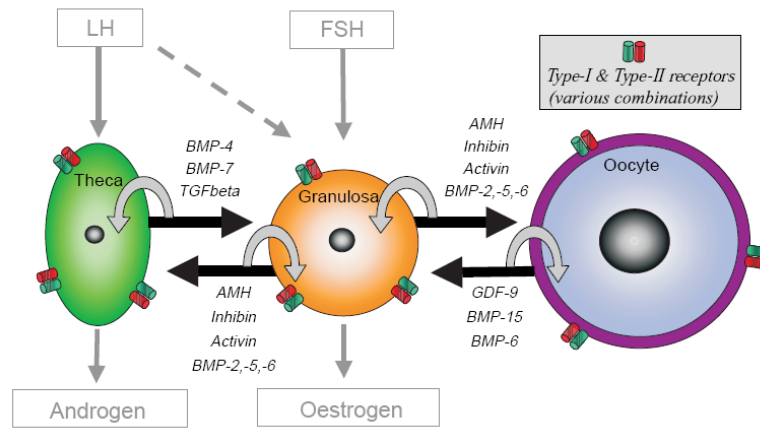
bölünmesine başlayan oogonia, hemen sonra 1. mayozun diploten evresinde duraklamaya girer ve puberte sonrasına kadar bu şekilde beklerler. Ancak aralarından bazıları apoptoza uğrar. Oosit ve etrafını çevreleyen yassı şekilli somatik hücrelerin oluşturduğu primordiyal foliküllerin sayıları doğum zamanı 2 milyona kadar inmektedir. Pubertede ise yaklaşık 300.000 adet folikül varlığı tanımlanmaktadır. Her iki cinsiyette de prenatal ve postnatal hayatta germ hücrelerinin yaşamaları için anti-apoptotik BCL2 ailesi üyeleri (Bcl2, Bcl6, BclX ve BclW) ve pro-apoptotik BAX proteininin dengede olması önemlidir. Bu dengedeki bir bozulma, patolojik sonuçlar doğurmaktadır. Örneğin; farede BclX yokluğu, her iki cinste de germ hücrelerinin tamamen kaybına; BclW yokluğu, dişide PGC'lerinde kısmi azalmaya sebep olmakta; Bcl2 yokluğu ise postnatal olarak oosit sayısının azalması ile sonuçlanmaktadır. Buna karşın, dişi farede BAX yokluğunda uzun bir üreme hayatı görülmektedir (43, 44).

Bundan önceki çalışmalar embriyonik ovaryumların ektopik transplantasyonu ile in vivo ve foliküllerin kültürleri ile in vitro çalışmalar yapılmış olup, embriyonik gelişimin 12,5 gününde alınan premayotik germ hücrelerinin kültürü ile olgun oosit elde edebilmişlerdir (45, 46, 47, 48). TGF β süper ailesinin bir üyesi olan Aktivin A (ActA) ovaryumda üretilmekte ve insanlar dahil birçok memeli türlerinde preantral foliküllerin gelişmesinde önemli bir modülatördür (49, 50). Folikülogenezisin lokal regülatörünün yanında, ActA FSH sentezini direkt olarak uyarabilir ve GnRH'un (Gonadotropin-releasing hormone) salınımını kontrol eder (51). ActA, granüloza hücrelerindeki FSH ve LH reseptörlerinin artışı da uyarabilir. Aromataz indüksiyonu ve progesteron üretiminde de aynı şekilde rol oynadığı da gösterilmiştir (51, 52). Böylece granüloza hücreleri, parakrin faktörlerin ana kaynağı gibi görev yapar ve oosit maturasyonunda en önemli parakrin etkiyi sağlayan hücre olduğu söylenebilir.

Zhi-Peng Zhang ve arkadaşları 2012 de, invitro koşullarda tam olarak premayotik dişi germ hücrelerinden basit bir metod ile matur oositleri elde edip maturasyonunu sağlamayı amaçlamışlardır. ActA'nın varlığında embriyonik ovaryumların eksplantasyonunun kültürü sırasında, tek tabakalı granuloza hücre kültürü ortamında gelişen eksplant kokültürde fertilize oositten morula ve blastosist aşamasına gelişiminin sağladığını bulmuşlardır (45). ActA'nın ilavesinin oosit maturasyonunun

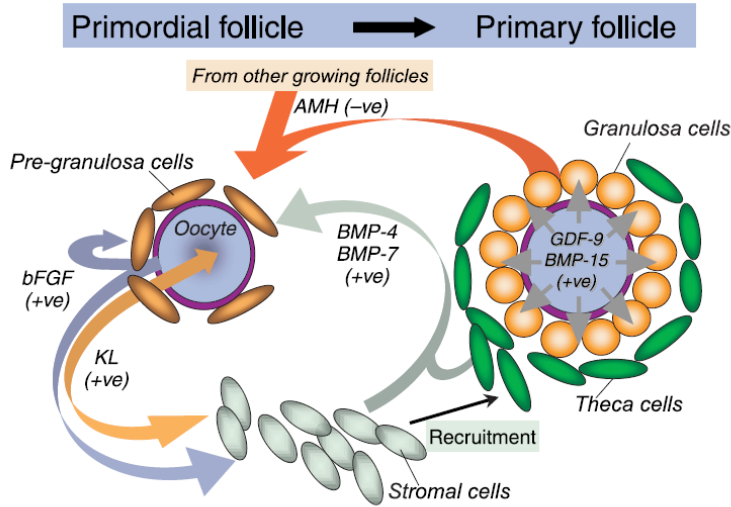
gelişimini tetiklediği ve bu tetikleme sırasında dişi germ hücrelerini aktive ederek oosit maturasyonun oluşumunu başarmışlardır (45).

Folikül gelişiminde, puberteden sonra hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofizden salgılanan folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH), ayrıca overde sentezlenen otokrin ve parakrin etkili lokal büyüme faktörleri, büyümeyi farklılaştıran faktör (Growth differentiation factor 9- GDF9), kemik morfojenik protein 6 (bone morfogenetic protein6 -BMP6), BMP7/BMP15, c-Kit, epitelial büyüme faktörü (EGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), anti-Müllerian hormon (AMH) rol alır (Şekil 6). Bu faktörler oosit ile çevre doku arasındaki ilişkiyi kontrol etmeleri yanısıra, iki yönlü olarak salgılanan faktörler sayesinde oosit ve çevre dokusu arasındaki iletişim sonucunda oosit maturasyonu ve foliküler gelişim sağlanmış olur. O nedenle bu faktörlerin oosit, granuloza hücreleri ve/veya teka hücrelerinden sentezlenip salgılandığı bilinmektedir (53, 54, 55, 56). AMH gelişmekte olan foliküllerin granuloza hücrelerinde sentezlenip parakrin etki göstererek diğer foliküllerin gelişimini inhibe etmesi ve dominant folikülün belirlenmesi açısından diğer faktörlerden ayrı bir yere sahiptir (57).



Şekil 6: Folikülogenezde oosit ve onu çevreleyen granuloza hücreleri ve teka tabakası arasında karşılıklı iletişimde moleküler düzeyde şematize edilmiş çizim (55).

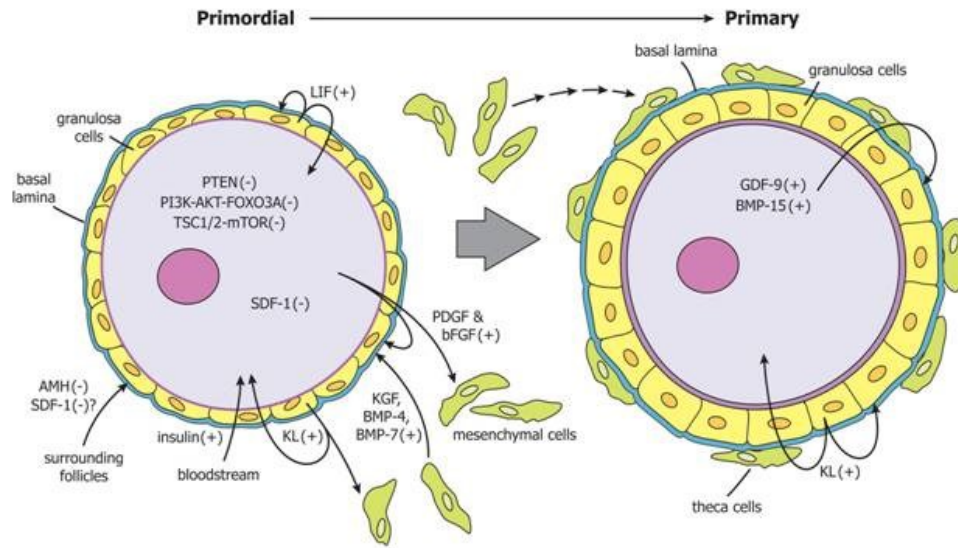
Primordiyal folikülden primer folikül oluşması gonadotropinlerden bağımsızdır. Bu aşamada etkin olabilecek faktörler araştırma konusudur. Pregranüloza hücrelerinden ve oositten salınan kit ligand (KL) ve bazik fibroblast büyüme faktörünün (bFGF) etkili olabilecek ilk lokal büyüme faktörleri olduğu düşünülmektedir (57). Primer folikül oluştuktan sonra foliküllerin ileri gelişimi gonadotropinlerin (FSH, LH) ve lokal büyüme faktörlerinin etkisi ile olmaktadır. Lokal büyüme faktörlerinden GDF-9, BMP-6, BMP-15 ve c-Kit oosit kaynaklıdır. AMH, EGF, bFGF, inhibin, aktivin, BMP-2, BMP-5, BMP-6 granüloza hücrelerince salgılanır. BMP-4, BMP-7, TGF β teka hücre kaynaklıdır. Tüm bu faktörler, otokrin ve parakrin etki gösterir ve bir büyüme faktörü kokteyli oluşturarak denge ve uyum içerisinde fonksiyon göstermeleri söz konusudur (Şekil 7) (53, 54, 55, 56).



Şekil 7: Primordiyal Foliküllerden Primer Foliküle geçişte fonksiyon gören faktörleri gösteren çizim (55).

Primordiyal folikül aktivasyonu folikülün etrafındaki mezenseimal hücreler, çevreleyen foliküler ve endokrin faktörler tarafından düzenlenir. Fosfat ve tensin homolog (phosphatase and tensin homolog-PTEN), Foxo3a (forkhead box O3A) ve stromadan gelişen faktör-1 (stromal derived factor-1-SDF-1) primordiyal oositler tarafından oluşturulur. Primordiyal oositler PDGF (platelet-derived growth factor) ve

bFGF’i sekrete ederek pregranüloza hücrelerini sekrete ederler ve KL’ın (kit ligand) sekresyonunu arttırlar. Pregranüloza hücreleri tarafından sekrete edilen KL oosit gelişimini ve folikül aktivasyonunu geliştirir ve mezeşimal hücrelerinde ileri gelişiminde fonksiyon görür. Kerasinosit büyüme faktör (keratinocyte growth factor-KGF), BMP-4 ve BMP-7 çevredeki mezenşimal hücreler tarafından sekrete edilir ve folikül aktivasyonunu stimüle eder. AMH ve SDF-1 gelişen folikül çevrelerinden sekrete edilir ve primordiyal folikül aktivasyonunu negatif yönde etkiler. İnsülin folikül aktivasyonunu ilerletir. Primer foliküller, granüloza hücre proliferasyonunu, KL ekspresyonunu ve teka formasyonunu arttırmak için GDF-9 ve BMP-15’i sekrete ederler (58) (Şekil 8).



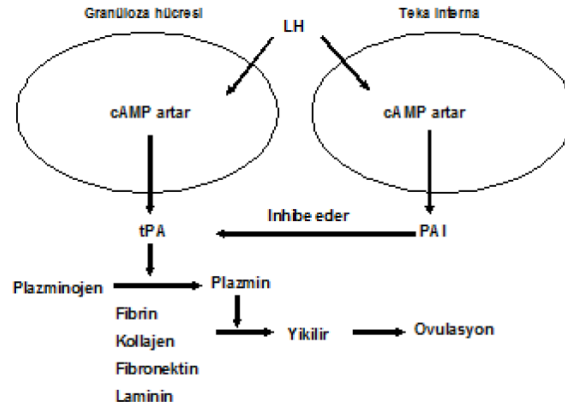
Şekil 8: Primordiyal folikül aktivasyonunun düzenlenmesi (58).

Amélie Juanchich ve arkadaşlarının, mikroRNAların (miRNA) Farklı Ekspresyonlarının Tanımlanması ve Balık Over Gelişiminde Potansiyel Hedefleri üzerine 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada; yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda, tek iplikli RNA molekülü olan ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan miRNA ovulatuvar döngüde farklı evrelerde farklı rolleri olduğunu göstermişlerdir. miRNA'lar kodlamayan RNA'lardandır, yani DNA'dan transkripsiyonu yapılan ama proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer

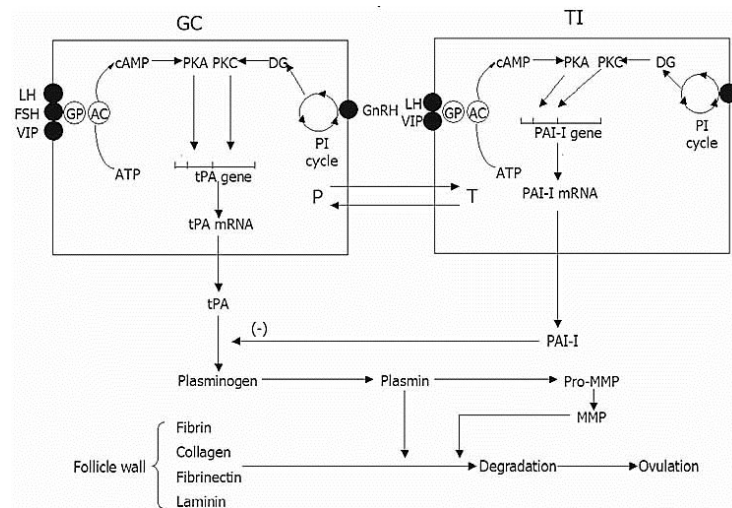
transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. Olgun miRNA moleküller bir veya daha çok mesajcı RNA (mRNA) ile kısmî tamamlayıcıdır ve başlıca işlevleri gen ifadesini aşağı ayarlamaktır. 1993'te Lee ve çalışma arkadaşları tarafından Victor Ambros laboratuvarında keşfedilmişler, ancak mikroRNA terimi ilk 2001'de kullanıma girmiştir(59). Amélie Juanchich ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada 3800 miRNA tespit edilmiş ve oogenez sırasında 13 miRNA ların farklı ekspresyonları olduğu saptanmıştır. Gökkuşığı alabalığında, 13 matür miRNA'nın tüm sekanslarının metafaz II oositinden salınan miRNA olduğu belirlenmiştir (59). Eksprese edilen genlerin (9391 gen) yaklaşık %60'ı previtellogenizasyon sırasında yüksek oranda eksprese edildiği saptanmış ve genlerin birçoğunun maturasyon sırasında eksprese edildiği görülmüştür (1271 gen). 584 gen ise vitellogenik safha sırasında eksprese edildiği saptanmış ve 4464 gen foliküler gelişim ve oosit maturasyonu sırasında eksprese edildiği gösterilmiştir (59). Bununla beraber oogenez boyunca alabalık ovaryumunda immature safhada 13 miRNA tanımlanmıştır. Özellikle metafaz II safhasında olan gökkuşığı alabalıklarında 13 miRNA eksprese edildiği ve hem miR-202 ve miR-202* testiste ve ovaryumda güçlü bir şekilde eksprese edilip diğer hiçbir dokuda saptanmamış olması, bu iki miRNA'nın özellikle gametogeneizde anahtar rol oynadıkları sonucuna varılmıştır. miR-29'nin ise mature ovaryumda previtellogenik ovaryuma göre 35 kez daha çok eksprese edildiği gözlenmesi üzerine özellikle oogeneze önemli olabileceği savunulmuştur.

Folikül Stimülan Hormon (FSH) etkisiyle gelişen granüloza hücreleri östrojen salgılar. Serum seviyesi artmakta olan östrojen, menstrüel siklus sonunda artan östrojenin luteinizan hormon (LH) üzerindeki (-) geri bildirim etkisinden farklı olarak, ilk önce (+) geri bildirim etki ile LH salınımını uyarır. LH ovulasyonun gerçekleşmesi ve ovulasyondan sonra oluşan korpus luteumdan progesteron salgılanabilmesi için kilit role sahiptir. Oosit maturasyonu LH salınımı ile başlar ve LH en üst seviyeye ulaştıktan yaklaşık 10-12 saat sonra ovulasyon gerçekleşir. LH ve progesteron prostaglandinleri ve proteolitik enzimleri aktive ederek folikül duvarındaki kollajenin yıkılmasını, kumulus hücre ekspansiyonunu ve ovulasyonun gerçekleşmesini sağlar. LH granüloza hücrelerinde G-protein üzerinden adenilat siklazı (AC) aktive eder. AC ise cAMP'yi artırır. Artan cAMP protein kinaz A aracılığı ile doku plazminojen aktivatörünün (tPA)

sentezlenmesine neden olur. tPA, plazminojeni plazmine çevirir. Plazmin de folikül duvarındaki fibrin, kollajen, fibronektin ve lamininin yıkılmasına sebep olarak ovulasyonu kolaylaştırır. Bu arada LH teka hücrelerinde benzer yol üzerinden plazminojen aktivatör inhibitörünün (PAI) sentezinde rol oynar (Şekil 9, Şekil 10). PAI'ü tPA'nün plazminojeni aktif formu olan plazmine çevirmesine engel olduğundan, tampon bir yolak oluşturmaktadır (60, 61, 62).

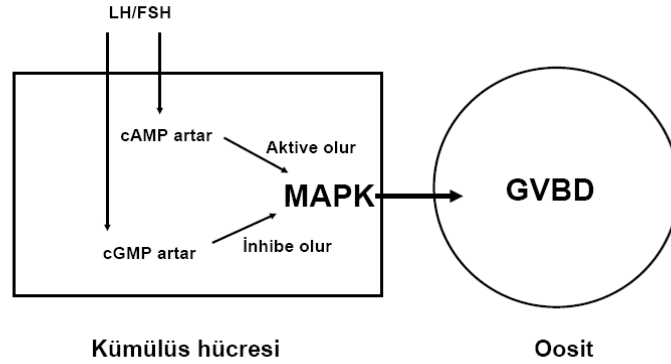


Şekil 9: Lüteinizan hormonun (LH) plazminojeni aktif formu olan plazmine çevirmesi. tPA (Doku plazminojen aktivatörü), PAI (Plazminojen aktivatör inhibitörü) (60).

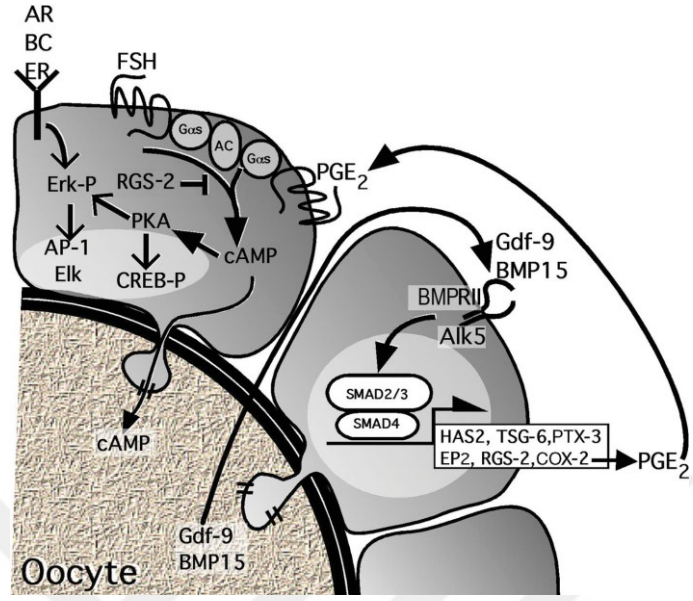


Şekil 10: Doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve Teika tabakasındaki plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI)'nın ovulasyon üzerine etkisi (63).

Gonadotropinler granuloza hücrelerinde G-protein bağlı reseptörlere bağlanır. Adenilat siklaz aktive olur, cAMP artar. Kumulus hücrelerinde artan cAMP, mitojen aktive edici protein kinazı (MAPK) aktive eder. Mayoz bölünmede ilerleme başlar. Granuloza hücrelerinde artan cAMP steroid sentezini de artırır. Steroidler de oosit maturasyonun devamı için gereklidir (64, 65). Granuloza hücrelerinde artan cAMP Geçit bağlantıları (GJ) aracılığı ile oosit içerisine de girer (Şekil 12) (65,66). Menstrüel siklusun ortalarında salınan LH etkisi ile granuloza hücreleri ve oosit arasındaki GJ'lar azalır. GJ'lardaki azalma ile cAMP'nin oosit içine girerek oositteki miktarının artması engellenmiş olur (66). Fosfodiesteraz'lar (PDE) cAMP'yi yıkar, inhibisyonun inhibisyonu aracılığı ile mayoz bölünmenin ilerlemesinin başlamasına katkıda bulunur (Şekil 11, Şekil 12). Bu arada granuloza hücrelerinde artan cGMP MAPK'ı inaktive eder ve immatür ovulasyonu önler (61, 62, 65).



Şekil 11: Gonadotropinlerin (LH ve FSH) cAMP ve cGMP aracılığı ile oosit maturasyonu düzenlemesi. MAPK (Mitojen aktive edici protein kinaz), GVBD (Germinal Vezikül Yırtılması) (60).

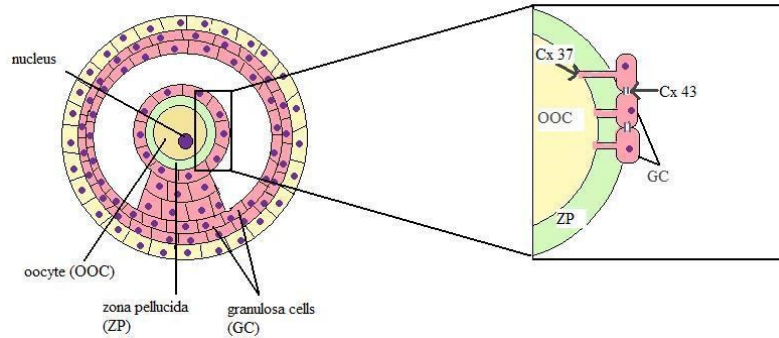


Şekil 12: cAMP'nin granüloza hücrelerinden Gap Junctionlar aracılığı ile geçişi (67).

Folikülogenezde etkili olan mekanizmalar ve faktörler;

a) Oluklu Bağlantılar (Gap junctions)

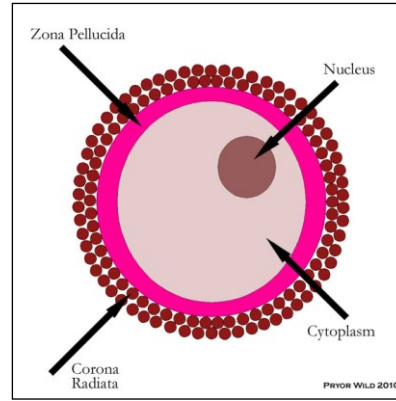
Over foliküllerinin gelişmesinde gap junction tipi bağlantıların rol oynadığı kesindir. Memeli oositlerinin büyümesi sırasında gap junctionlar sayesinde çevredeki foliküllerle devamlı bir iletişim vardır. Aminoasitler, glukoz metabolitleri ve nükleotidler, gap junction tipi bu bağlantılar aracılığıyla büyüyen oosite taşınırlar. Bunlara ek olarak tam gelişmiş oositin mayotik maturasyonunu sağlayan sinyaller de oosit ile granüloza hücreleri arasındaki gap junction tipi oluklu bağlantılarla sağlanır (Şekil 12). Cx26, Cx30, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 ve Cx57 gibi konneksinleri içeren ve bunlarla da sınırlı olmayan konneksinler türe bağımlı olarak oosit ve granüloza hücre kompleksi içinde eksprese (genetik sentez) olurlar, fakat herhangi birinin esansiyel olup olmadığı konusunda açık bir bilgi yoktur. Gja4 geni haraplanarak Cx37'si yok edilmiş farelerin yaşadığı ve over foliküllerinin preantral faza kadar normal bir şekilde geliştiği görülmüştür, fakat matür graaf folikülü aşamasına kadar hiç gelişmez ve ovulasyon gonadotropin uyarılarına rağmen başlamaz (Şekil 13) (68,69,70).



Şekil 13: Cx26, Cx30, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 ve Cx57 gibi konneksinleri içeren ve bunlarla da sınırlı olmayan konneksinler, oosit ve granüloza hücre kompleksi içinde eksprese olurlar (71).

b) Zona Pellusida

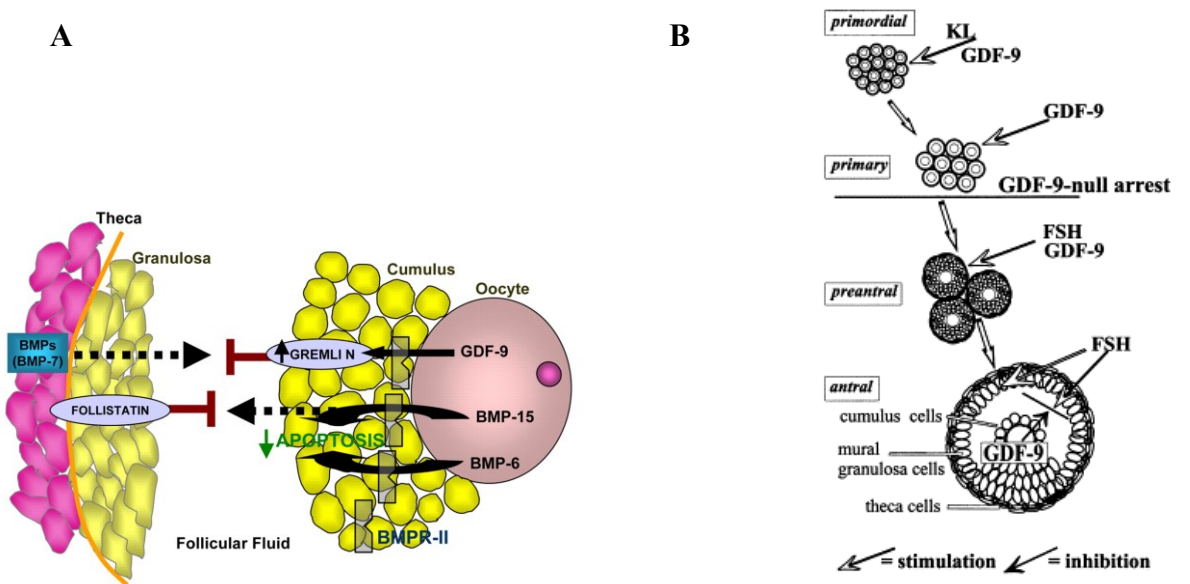
Büyüyen foliküllerin önemli bir parçası da oositi, çevresindeki granüloza hücrelerinden ayıran ekstrasellüler zona pellusidadır. Zona pellusida oosit ve granüloza hücreleri tarafından sentezlenir ve ilk olarak primer folikülde tespit edilir. Oosit büyüdükçe zona pellusida genişlik olarak büyür. Kalınlığı olgun folikül aşamasına kadar ortalama 18 mikrometreye ulaşır. Matriks üç sülfatlanmış glikoproteinden oluşur, ZP1, ZP2, ZP3. ZP2 ve ZP3 yaklaşık olarak eşit ve ana parçaları oluşturur, ZP1 ise zona kütlelerinin % 15 ± 10 'unu oluşturur (Şekil 14). Normalde zona pellusida üç proteinden oluşurken (ZP1/ZP2/ZP3), zona pellusida oluşumunda ZP3'ün esansiyel olduğunu düşündüren ZP1/ZP3 veya ZP2/ZP3 kombinasyonu zona matriksini oluşturabilir. Bununla birlikte ZP1/ZP3 matriksi çok incedir ve folikülogenezisin antral fazının geç dönemlerine kadar devam etmez. ZP2 veya ZP3'ten yoksun oosit gelişir fakat folikülogenezin sonraki aşamalarında yapıları bozulur ve gonadotropinlerle stimüle ovulasyonda tubalarda zonasız oositler görülür. Bu oositler her ne kadar in-vitro ortamda döllenerek blastokist oluşturabilse de transfer edildiklerinde henüz canlı bir doğum görülmemiştir (70, 72, 73).



Şekil 14: Oosit ve Granüloza hücreleri arasında şeffaf, glikoproteinden zengin Zona Pellusida (74).

c) Büyüme ve farklılaşma faktörü 9 (GDF-9)

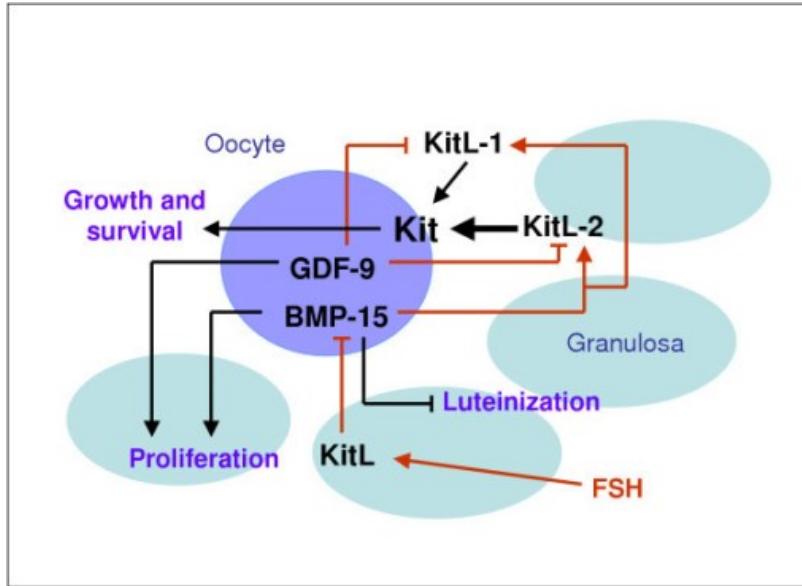
Dönüştürücü büyüme faktörü (Transforming growth factor β -TGF β), folikül gelişiminin kritik dönemlerinde rol alan büyüme faktörlerinden bir grubu oluşturur. TGF β ailesi TGF β , activin, inhibin, müllerian inhibe edici substans (Müllerian inhibiting substance-MIS), büyüme ve gelişme faktörü 9 ve kemik morfogenetik proteinlerinden oluşur. Bu faktörler hücre büyümesi, morfogenezi, hücre farklılaşması ve apoptoz gibi biyolojik olaylarda çok önemli rol oynarlar. Over folikülü, GDF-9 olmadan primer fazı geçemez. GDF-9 uygulanmış immatür ratlarda primer ve küçük preantral foliküllerin daha çok arttığı fakat primordiyal foliküllerin azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın, GDF-9'un primordiyal folikülleri matürasyon için aktive etmesi sonucu olduğu düşünülmüştür. GDF-9, folikül gelişiminin diğer basamaklarını etkilemez (Şekil 15). Bunun aksine FSH preantral folikül sayılarını artırırken primer ve primordiyal foliküllerin sayısını etkilemez. Bu da FSH'ın temel etkisinin daha olgun foliküller üzerine olduğunu düşündürür. Bunun sonucu olarak folikül gelişiminin erken evrede oosit kaynaklı uyarıların, sonraki evrede ise gonadotropinlerin baskın olduğu iki farklı aşamada gerçekleştiği düşünülür (Şekil 15) (70, 75, 76, 77, 78).



Şekil 15: GDF-9'un folikülogenezde rolü (A, B) (79, 80).

d) Kemik morfojenetik protein 15 (Bone morphogenetic protein 15: Bmp15)

Oositin salgılanan parakrin faktörler over folikülünün erken gelişim aşamasında ve antral folikülün morfojenik gelişiminin belirlenmesinde önemli rol oynar. Bmp15 aynı zamanda GDF-9b olarak da bilinir ve oositlerde X'e bağımlı gen tarafından eksprese edilir ve üretilen protein GDF-9 ile yüksek derecede homoloji (%52) gösterir. Bmp15 geni ilk olarak primer folikül içindeki oosit tarafından eksprese olur ve oluşan protein granüloza hücre proliferasyonunu stimüle eder. Ek olarak Bmp15 selektif olarak FSH tarafından indüklenmiş progesteron üretimini inhibe eder. Bmp15'ten yoksun dişi farelerde ovulatuvar defektlere bağlı olarak, fetus boyutları azalmış doğum vardır. Bmp15^{-/-}, GDF-9^{+/-} veya Bmp15^{-/-}, GDF-9^{-/-} çift mutantlı fareleri muayene ve karakterize ederken Bmp15 ve GDF-9 proteinlerinin over fonksiyonlarında sinerjik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bmp15'i eksik fareler ovulasyon ve folikülogenezin geç dönemlerinde açık defektlerle birlikte subfertilidir. GDF-9 ve Bmp15'in koyunlarda ovulatuvar fonksiyon kaybı gibi kesin bir rolü vardır ki molekül immunizasyon yoluyla ya da genetik eksiklik yoluyla over yetmezliğine yol açar (Şekil 16) (70, 81, 82).



Şekil 16: GDF-9 ve BMP-15'in folikülogenezdeki rolü (83)

e) **Sitostatik Faktör (CSF)**

Masui ve Markert'in çalışmasında iki hücreli embriyoda blastomerlerden birine aynı yumurtanın sitoplazması mikroenjekte edildiğinde injeksiyon yapılan blastomerde yarıklanma dururken, enjeksiyon yapılmamış blastomerde yarıklanmanın devam ettiğini gözlemladiler. İnjeksiyon yapılmış blastomerin "mitotik aparatının" metafazda beklediğini saptadılar. Kontrol olguda ise immatür oositin veya erken embriyodan alınan sitoplazmanın enjeksiyon yapılmış olan blastomerin yarıklanmasını inhibe etmediği görüldü. Olgun oositlerin sitoplazmasından elde edilen hipotetik faktör geçici olarak "Sitostatik Faktör" olarak adlandırıldı. Mayoz II arrested oosit= Sitostatik faktör arrest= Matür oosit= Metafaz arrested oosit= CSF-arrested oosit= Fertilize olmamış yumurta tanımlarının hepsi aynı anlamı taşır. CSF, tek bir molekül veya proteinden öte yumurtada bulunan bir aktiviteyi tanımlamaktadır. Bu hücre bölünme inhibitörünün oosit matürasyonu sırasında salgısı artmakta, Mayoz II'de aktive olmakta fakat fertilize veya parthenogenetic aktivasyonla birlikte de inaktif hale gelmektedir. Bu yapı ile ilgili bilgilerimizin çoğu *X.laevis* 'le yapılan çalışmalardan gelmektedir. Fare çalışmaları da bu canlıda yapılmış olan çalışmaları desteklemektedir (84).

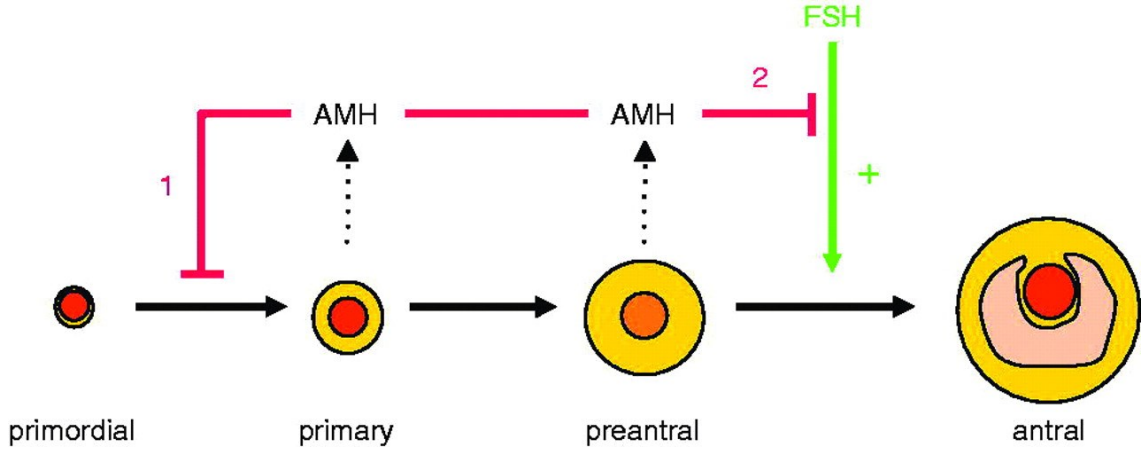
f) **Halka Parmak (Ret Finger Protein-Like 4- RFPL4)**

Gelişen embriyoda oositin erken mitotik ve mayoz bölünmeleri; zamanla üretilen hücre döngü düzenleyicileri, bunların proteozomal yıkım yoluyla temizlenmesine bağlıdır. Ret Finger Protein-Like 4 (Rfpl4) geni, B30.2 parçasına sahip RING finger-like proteini kodlar. Bu gen germ hücrelerine özgün genlerin in siliko araştırması sırasında bulunmuştur. İmmunhistokimyasal ve immunfloresans yöntemlerle görülmüştür ki RFPL4 büyüyen oositlerde birikir ve erken embriyonik ayırım sırasında aniden yok olur. Birçok Ret Finger (halka parmak) içeren protein gibi RFPL4 de E3 ubikuitin ligazdır (70). Ekspresyonunun özgünlüğü ve etkileşimleri RFPL4'ün Siklin B1'i proteozomal yıkım için yönlendirdiği düşünülmüştür. Bu da oositin mayoz

sırasındaki hücre siklusunun kontrolü için anahtar olaydır ve embriyodaki oositin mitoza geçişinde çok önemlidir (70, 75, 76, 77, 78, 81).

g) Anti-müllerian hormon (AMH)

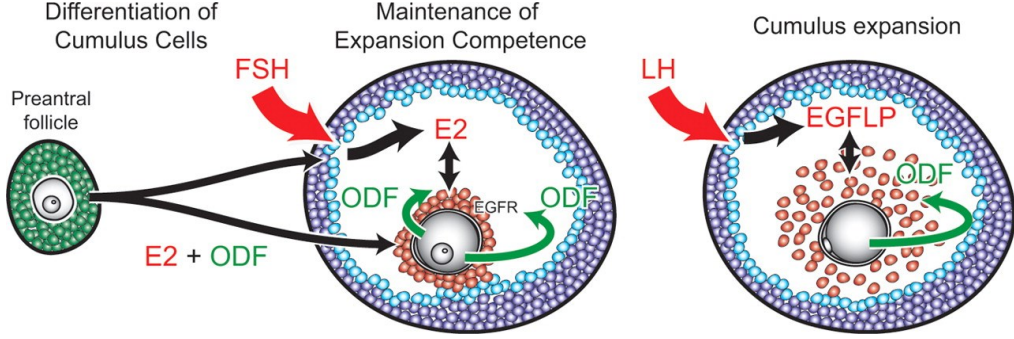
Anti müllerian hormon (AMH), doğumdan sonra sağlıklı ve yavaş büyümekte olan foliküller içindeki granüloza hücrelerinde eksprese olur. AMH, aynı zamanda müllerian inhibiting substance (MIS) olarak da bilinir ve TGF β ailesinden olup dimer yapısında glikoproteindir. Overlerde AMH sadece doğumdan sonra büyüyen foliküllerin granüloza hücrelerinde eksprese edilir. AMH mRNA'sı ve proteini, büyümeye başlamış sıçan, fare, koyun ve insan foliküllerinin granüloza hücrelerinin sitoplâzmasında saptanmıştır. Preantral foliküllerde ekspresyon çok kuvvetli iken antral ve preovulatuvar foliküllerde azalmıştır. Primordiyal fazda veya atretik foliküllerde ekspresyon hiç yoktur. İnsan overinde AMH proteinin granüloza hücrelerinde ekspresyonu 36 haftalık gestasyonel yaştan menapoza kadar primordiyal folikül hariç folikülogenezisin bütün basamaklarında gösterilmiştir. Birincil fazdan itibaren gözlenen artış geniş preantral ve küçük antral bölümlerde pik yaparken daha geniş antral foliküllerde azalır. Siklik aktifleştirme sırasında AMH foliküllerin FSH'ya duyarlılığını azaltırken, ilk aktifleştirme sırasında, AMH primordiyal foliküllerin büyüme havuzuna doğru aktifleşmelerini inhibe eder. Granüloza hücresindeki AMH, FSH bağımlı aromataz aktivitesinin indüksiyonunu ve LH reseptör ekspresyonunu inhibe eder (Şekil 17). Ayrıca AMH eksikliği olan farelere FSH tedavisi uygulandığında over foliküllerinin daha fazla ve daha çok geliştiği gözlenmiştir. Bu yüzden AMH over folikül büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (70, 85, 86, 87, 88).



Şekil 17: AMH'nin folikülogenezde rolü (89).

h) Östrojen

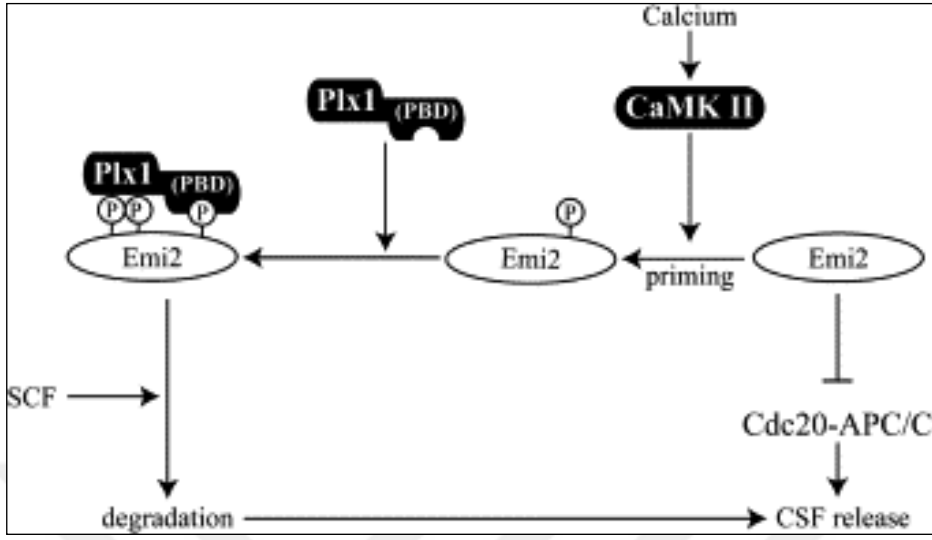
İnsan overinde, sağlıklı antral folikül granüloza hücreleri ve özellikle dominant foliküllerden preovulatar folikül granüloza hücreleri seviyesinde immunreaktif ER (östrojen reseptörü) ekspresyonu olur. Dominant olmayan foliküllerin granüloza hücreleri de LH piki zamanında ER pozitif olabilir. Pelletier ve El-Alfy, insan üreme organlarındaki ER'lerin hücrel lokalizasyonunu belirlemişlerdir. Büyüyen foliküllerin (primerden olgun foliküle kadar olan bütün basamaklarda) granüloza hücrelerinin nükleusunda, interstisyel bezlerde ve overin yüzey epitelinde ERb immunreaktivitesini saptamışlardır. Teka, interstisyel bez ve over yüzey epitelinde ERa varlığı çekirdek boyası ile gösterilmiştir. Açıkçası östrojen müllerian memeli komplekslerinin büyümesinin ve farklılaşmasının desteklenmesinde hayati rol oynar. Östrojenlerin oynadığı rolde over folikül gelişiminin senkronizasyonu ile siklus ortası gonadotropin piki eşit öneme sahiptir. Ayrıca DES (Diethylstilbestrol) ile tedavi 200-300 mm çapından daha geniş foliküllerin büyüme hızını artırırken atrezi hızını azaltır. Östrojenlerin over foliküllerindeki granüloza hücrelerinin apoptozunu inhibe etme yeteneğinin gösterilmesi antiatretik olabileceği fikrini desteklemiştir (70, 90, 91)(Şekil 18).



Şekil 18: Östrojenin folikülogenezde rolü (92).

i) Kalsiyum:

Geleneksel teoriye göre steroidler nükleer reseptörlere bağlandıktan sonra gen transkripsiyonunu aktive edip protein sentezini başlatırlar. Bununla beraber östrojenlerin overlerde klasik olmayan başka bir yolu kullanabilme ihtimali vardır. Granüloza hücrelerinde olduğu gibi oositte membran aracılı, genomik olmayan östrojenik etkilerin varlığı dışlanmamalıdır. Bu yönüyle 17 β -estradiol etkisiyle intrasitoplazmik kalsiyum değişimi bu olasılığı kuvvetle destekler. Spesifik olarak intrafoliküler östrojen direkt olarak klasik olmayan yoldan insan oositinin gelişimsel potansiyelini etkilediği düşünülmektedir. Tesarik and Mendoza germinal vezikül yırtılması (GVBD) sırasında intrasellüler kalsiyum salınımlarının, amfibilerde görülen işleve benzer şekilde 17 β -estradiol aracılığı ile düzenlendiğini göstermişlerdir (Şekil 19). Fertilizasyon prosedürleri yardımıyla mikromanüplasyon uygulanan insan oositleri aspire edilince GVBD'ye uğramadığı görülmüştür (70, 90).



Şekil 19: Kalsiyum salınımının folikülogenezdeki rolü (93).

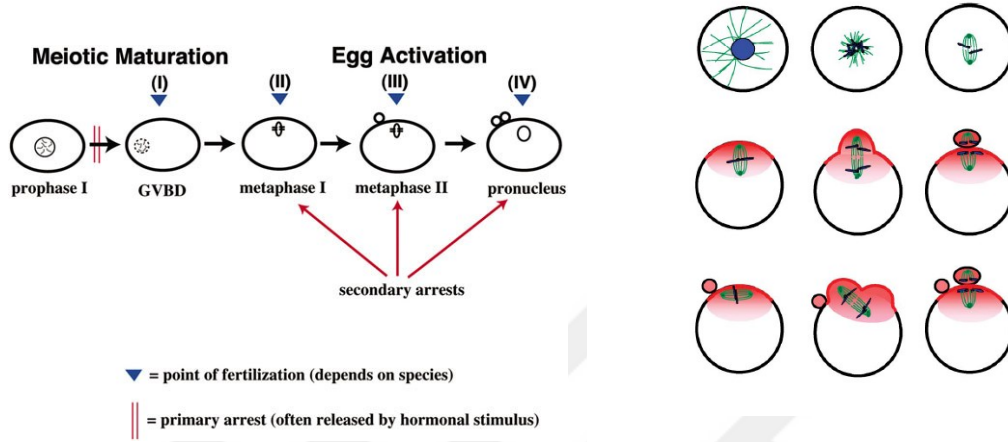
1.3. MAYOTİK GELİŞİM

Memelilerde mitoz bölünme ile çoğalan oogoniumlar, fetal yaşam esnasında ilk mayotik bölünmeye başlar. Fakat doğumdan önce veya hemen sonra 1. Mayoz bölünme profaz safhasında durur. Bu dönemde germinal vezikül (GV) olarak isimlendirilen yapı oluşmuştur. Mayoz bölünme, puberteyi takiben ovulasyondan kısa bir süre önce veya oositler foliküllerden alınıp uygun bir medyuma bırakıldığında sitoplazmik olgunlaşmayı düzenleyici faktör (Maturation Promoting Factor; MPF) etkisi ile tekrar başlar. Ovulasyondan hemen önce, memeli oositleri olgunlaşmanın son fazını tamamlamadan fertilize olma ve fertilizasyon olsa dahi erken embriyonik gelişme yeteneğine sahip değildir (94). Mayozun tekrar başlaması germinal vezikülün yırtılması (GVBD) ve bunu takiben ilk polar cismin atılması ile karakterizedir. Bu dönemde ovulasyona uğrayan oosit, fertilizasyona kadar 2. Mayoz bölünmenin metafaz safhasında bekler. Fertilizasyon mayotik bölünmenin tamamlanmasını uyarır ve 2. Polar cisim atılır. Fertilizasyon sonrası erkek ve dişi pronükleuslar oluşur. Bu dişi ve erkek pronükleusların füzyonu ile fertilizasyon olayı tamamlanır (95).

Mayotik gelişim oosit büyümesi sırasında iki basamakta gerçekleşir. Germ hücre ilk önce germinal kese yırtılmasını yapabilecek GVBD yeteneği kazanır ve metafaz I'e doğru ilerler sonra da Metafaz II'ye ilerleme yeteneğini kazanır. Oositte başlayan mayozun devamı ve tamamlanması üç ana faktörün koordineli çalışmasını içerir: Maturasyonu sağlayan faktör (Maturation Promoting Factor- MPF), MOS ve Mitojen aktive eden Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase- MAPK). Farelerde MPF aktivitesi GVBD'yi izler ve protein fosforilasyonunu sağlayan olaylar kaskatını başlattığına inanılır ki bu da oositi mayotik olaylara yönlendirir. MOS/MAPK yolu, Metafaz I ve Metafaz II'deki uygun içcik oluşumundan, Metafaz I-Metafaz II transisyonunda DNA replikasyonunun baskılanmasından, Metafaz II'deki duraklamanın devamlılığından sorumludur (86, 95).

In vitro fertilization (IVF) oosit maturasyonu ve insanın erken gelişim dönemine ait bir pencere açar. Yardımcı üreme teknikleri kontrollü folikül gelişimi ve oosit maturasyonu için eksojen hormon stimülasyonunu içermektedir. Toplandığında oositler

maturasyon özelliklerine göre analiz edilirler ve görünümüne dayanarak GV, MI veya MII olmak üzere sınıflanırlar (Şekil 20). Bu morfolojik kategoriler kabaca mayotik gelişim dönemleriyle ilişkilidir. MII dönemine geçemeyen oositler immatürdürler ve fertilizasyon başarıları gösteremezler.



Şekil 20: Oosit mayotik maturasyonu ve aktivasyonu (96, 97).

1.4. İN VİVO OOSİT MATURASYONUNA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Oositleri mayoz bölünmede duraksatan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. İnhibe edici sinyallerin var olduğu birçok çalışma ile bildirilmiştir. Bu sinyaller; TGF- β , Anti-Mülleriyan hormon, aktivin, inhibin ve folistatin bu aşamada işlevi olduğu düşünülen moleküller ve peptidlerdir.

Temel çalışmalar AMH'nun foliküler hormon yapımında etkili olduğunu göstermiştir. Hayvanlardaki çalışmalarda, AMH'nun aromataz aktivitesini, granuloza hücrelerinde FSH'ın stimüle ettiği LH reseptör sayısını azalttığı görülmüştür. Teka hücrelerinde testesteron yapımını azaltır. AMH'nun büyüme sırasında, preantral ve erken antral foliküllerden salındığı gösterilmiştir. Ovaryan aktivite üzerine düzenleyici etkisi vardır (98).

AMH, over rezervinin değerlendirilmesinde, granuloza hücreli tümörlerin saptanması ve takibinde, puberta prekoks ve gecikmiş pubertanın tanınmasında, kriptoorşit ve anorşit tanısında, her yaşta erkek gonad fonksiyonunun değerlendirilmesinde klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (99, 100, 101).

Mayoz I tamamlandıktan sonra oosit içerisinde sitostatik faktörler (CSF) de birikip artmaya başlar. CSF tek bir faktör değildir, özellikleri araştırılmakta olan bir grup faktörün ortak adıdır. Mayoz II'de artmaya başlar ve metafaz II'de duraksamaya neden olurlar. Normalde mitozda anafaz uyarıcı faktörün (APF) etkisi ile metafazdan anafaza geçiş mümkün iken mayoz II'de progesteronun da etkisi ile artan CSF'ler sebebiyle APF'ün bu etkisi önlenir ve metafaz II'deki bekleyiş gerçekleşir. Fertilizasyon gerçekleşir ise CSF'lerin inhibitör etkileri ortadan kalkar ve mayoz kaldığı yerden devam eder (102, 103).

Maturasyon inhibitörleri, foliküler hücreler tarafından sentezlenen ve mayoz bölünmenin durdurulmasını sağlayan biyolojik ürünlerdir. Mayes'in bildirimleri doğrultusunda, α -amanitin, 5,6-dichloro-1-B-D-ribofuranosyl benzimidazole gibi bazıları RNA transkripsiyonuna engel olurlar ve transkripsiyon inhibitörleri adını alırlar. Cyclo-heximide, Puromycin gibi bazı inhibitörler de protein sentezine engel olarak etki gösterirler. Fosfataz inhibitörleri ise MPF komponentlerinin fosforilasyonunu kontrol altında tutarak etki gösterirler. Bunlara örnek olarak, Okadaikasit, Vanadate, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), Butyrolactone ve Roscovitine gösterilebilir. Ayrıca adenosin ve hipoksantin gibi pürinler de inhibitör etkide olup mayozun durdurulmasına yardımcı olurlar(104).

Bu güne kadarki klasik görüş yaşam süresince kullanılacak olan oositlerin doğuma kadar oluştuğu ve sonra oluşumunun ortadan kalktığı şeklindeyken son yıllarda farelerde ve aşağı omurgalı bazı türlerde (*Xenopus laevis*) yapılan çalışmalar oositlerin sürekli olarak yok oluşunun sanılandan daha fazla olduğunu ve memeli yaşamının erken yıllarında ve reproduktif dönemde, küçük bir grup germ hattı kök hücresi tarafından tekrar üretildiğini ortaya konmuştur (105). Çocuk ve yetişkin fare ovaryumları aktif mitotik germ hücelerine sahiptir. Oosit dejenerasyonu (atezisi) ve boşluğunun oranından taban alır ve havuzun yeniden doldurulmasına ihtiyacı vardır. Prepubertal dişi farelerinin tedavisi, mitotik germ hücre hattında toksikant bisulfan eliminasyonu ile oluşur. Primordiyal foliküller indüklenen atrezi haricinde erken yetişkin dönemde rezerve edilir (105).

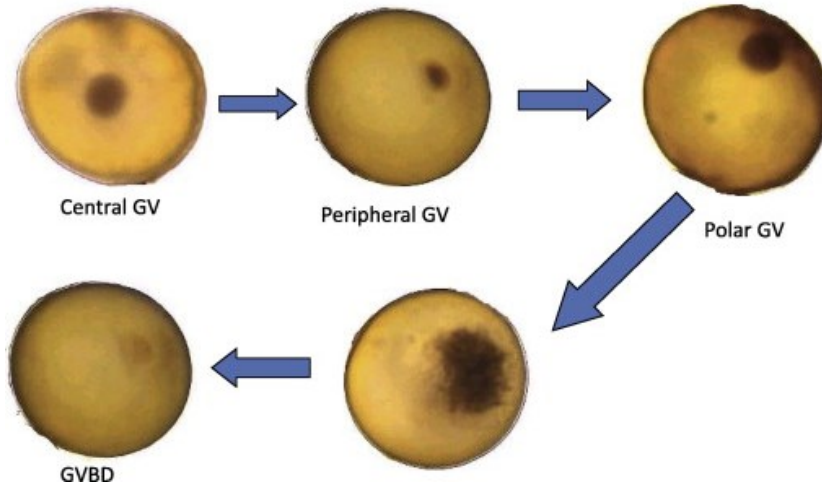
Byung Chul Jee ve arkadaşlarının (2010) sunduğu bir olguda 35 yaşındaki bir hastadan, kontrollü ovaryan stimülasyon sonrası Germinal vezikülünün yırtıldığı

(GVBD) aşamada oosit toplanmış ve mekanik (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) ya da kimyasal (kalsiyum iyonofor) uygulama ile mayotik arrestin önlenemediği bildirilmiştir. Hiçbir oositin olgulaşmadığı ve anti-tubulin antikoru ile negatif boyandığı gözlenmiştir. Sonuç olarak ta Profaz 1 safhasındaki maturasyon arrestinin infertilite nedenlerinden biri olabileceği düşünülmüştür. Oosit arrestine bağlı infertilite vakalarında oosit maturasyon arrestinin anlaşılabilmesi için normal gelişim ve altında yatan nedenler ve/veya mekanizmaların incelenmesi ve ayrıca uygun in vitro ortamların hazırlanması, oosit gelişimi ve fertilizasyon problemlerinin çözülmesi ile in vitro fertilizasyon başarı oranlarının artışına neden olacağından umut verici çalışmalardır (106).

Pek çok araştırmacı oosit maturasyonunu, oositin mayoz bölünme sırasında profaz I evresinden metafaz II evresine kadar olan olaylar zinciri olarak kabul etmektedir. Olgunlaşma süreci nükleer ve sitoplazmik maturasyon olarak incelenmektedir (60, 66, 107, 108).

Nükleer Maturasyon

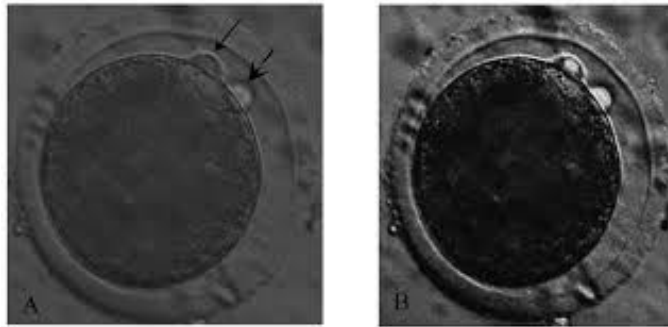
Nükleer maturasyonun başlaması için LH tetikleyici bir role sahiptir, ancak maturasyonun devamı için başta östrojen olmak üzere steroidlere de ihtiyaç bulunmaktadır (60,108). Profaz I'de bekleme halinde iken çekirdek zarı henüz yırtılmamış hücre çekirdeğine germinal vezikül (GV) denilmektedir. Oosit maturasyonunda ilk gelişen olay germinal vezikül yani hücre çekirdek zarının yırtılmasıdır (GVBD) (Şekil 21). GVBD, LH uyarısı ile başlamaktadır.



Şekil 21: LH etkisi ile Germinal Vezikülün yırtılması (109).

Ardından, kromozom yoğunlaşması, iğ iplikçikleri oluşumu, homolog kromozomların metafaz plağı üzerinde yerleşmesi gerçekleşmektedir. Metafaz I sonrasında anafaz I ve telofaz I gerçekleşerek sonuçta asimetrik sitokinezis oluşarak sekonder oosit ve 1. polar cisim gelişir. İnterfaz evresine girilmeden (tekrar kromozomal replikasyon oluşmaz) 2. mayoz bölünme başlar. İkinci mayoz bölünmenin metafaz-II evresinde ikinci bir duraksama olur ve ovulasyon bu esnada gerçekleşir. Spermatozoon penetrasyonu ile 2. mayoz bölünme tamamlanır (60, 66, 107, 108).

Sonuçta oluşan iki hücreden biri sitoplazma yönünden zengin olup gerçek oositir. Diğeri ise sitoplazmanın az bir kısmını alan ancak yine de mitokondriyon, ribozom ve kortikal granüllere sahip olan, 2. polar cisim adıyla bilinen hücredir (Şekil 22) (60, 66, 107, 108).



Şekil 22: Spermatozoa ile karşılaşmış sekonder oositin fertilize olması ve bunun sonucu oluşan ikinci polar cisimcik (110).

Sitoplazmik Maturasyon

Birinci polar cismin oluşmasıyla birlikte perivitellin boşluk genişler ve şekillenir. Mitokondriyonların sayısı artar ve yapısal değişimleri oluşur. Golgi komplekslerinden kortikal granül salınmasıyla birlikte ooplazma granüllü bir hal alır. Başlangıçta merkezi olarak yer alan mitokondriyonlar oositin gelişimi ile birlikte periferal bir konuma sahip olmaktadır. Mitokondriyonların, sitoplazmik maturasyonda anahtar rolü üstlendikleri bilinmektedir. Hücre içi metabolik olaylarda, hücre farklılaşmasında ve hücre proliferasyonunda mitokondriyonlar etkin rol oynamaktadırlar (107).

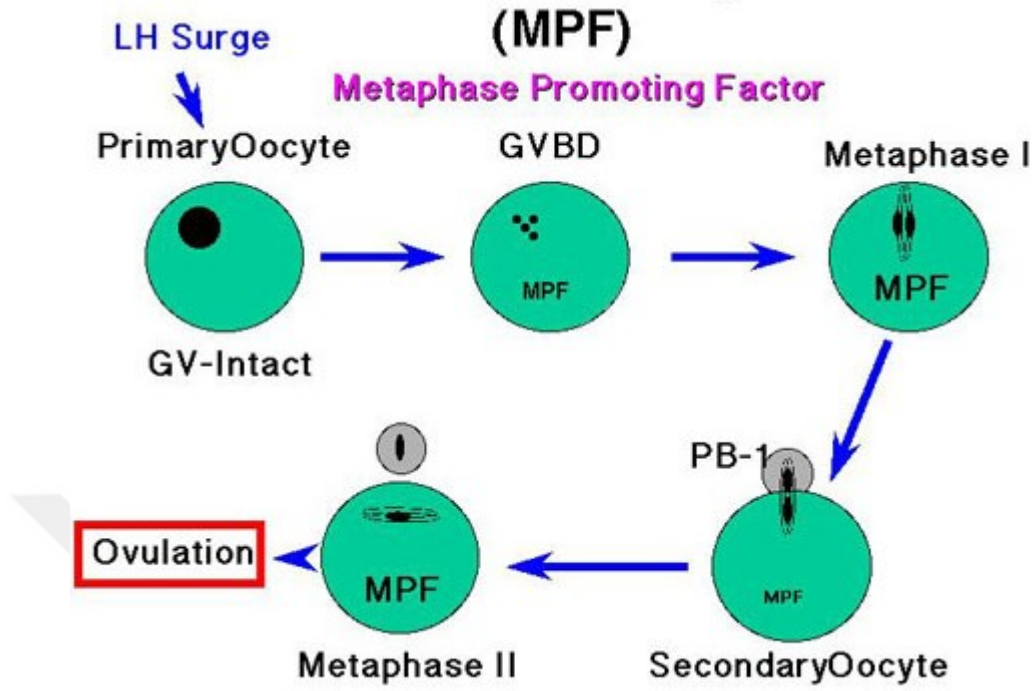
Başarılı bir fertilizasyon için; oosit ve folikül büyümesi, kromozom düzenlenmesi ve ovulasyon olaylarının eşzamanlı ve uyumlu bir biçimde gerçekleşmesi gerekmektedir. MPF bu noktada önemli bir rol oynamaktadır.

Mayotik süreçte rol oynayan moleküller ve faktörler şunlardır;

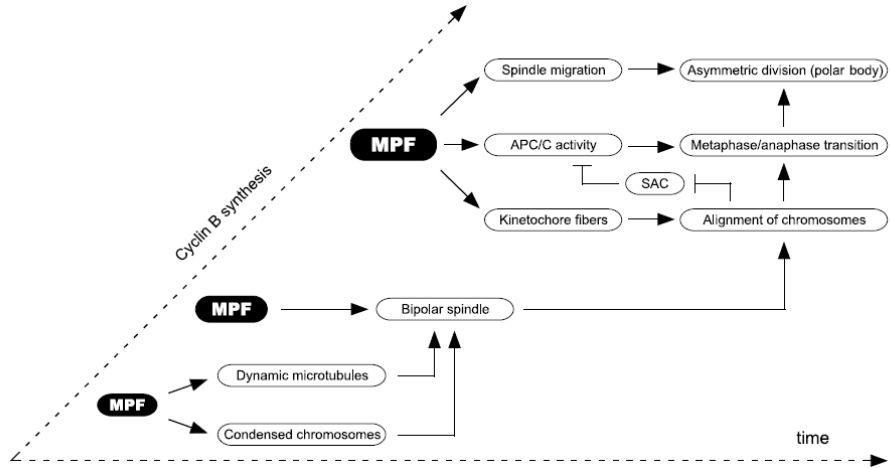
- a) MPF
- b) PKA (PROTEİN KİNAZ A)
- c) cAMP
- d) Adenil Siklaz
- e) G proteinleri
- f) Kalsiyum
- g) Fosfodiesterazlar
- h) cGMP
- i) Guanil Siklaz
- j) NO
- k) Nitrik Oksit sentaz
- l) Emi
- m) MOS
- n) Siklin B
- o) Fyn

a) MPF:

Maturasyonda en etkili molekül olan MPF, ilk olarak 1971 yılında Yale Üniversitesi'nden Yoshio Masui ve Clement Markert tarafından kefedilmiştir. Önceki çalışmalarında progesteronun kurbağa oositlerine dışardan verildiğinde maturasyonu başlattığını ancak oosit içine enjekte edildiğinde aynı etkiyi yaratmadığını gözlemleyen araştırmacılar, progesteronun yalnızca hücre yüzeyine yakın bölgede tanınabileceği sonucunu çıkarmışlardır. Bunun da hücre içinde bir sinyal yaratabileceği fikrinden yola çıkan Masui ve arkadaşları, progesteronla muamele edilmiş matür oositlerden aldıkları 10–20µl kadar sitoplazmayı henüz olgunlaşmamış kurbağa oositlerine enjekte etmişlerdir. Sonuç olarak sitoplazmayı alan oositin bir hormon muamelesi olmadan maturasyona gittiğini gözlemlemişlerdir. Böylece sitoplazmada, hormonal uyarımdan sonra maturasyonu başlatan bir faktör olduğunu ortaya koyan araştırmacılar bunu **Olgunlaşmayı düzenleyici faktör (Maturation Promoting Factor - MPF)** adını vermişlerdir (111) (Şekil 23). Birkaç yıl sonrasında MPF Xenopus cinsi kurbağalarda da bulunmuş ancak 1976'dan sonra çeşitli türlerden amfibi olmayan canlılarda da varlığı gösterilebilmiştir (112). Daha sonraki çalışmalar MPF'nin yalnız üreme hücrelerinde değil somatik hücrelerde de bulunduğunu ve G2-M geçişini tetiklediğini ortaya koymuştur. Buna göre MPF, M fazında genel bir düzenleyici olarak rol oynamaktadır (111). Günümüzde MPF'nin, Cdk1(p34cdc2) ve Siklin B moleküllerinin birleşmesinden meydana geldiği bilinmektedir. (111). Hücre siklusunun farklı dönemlerinde fonksiyonlaşan, oosit mayozunun anahtar düzenleyicisidir. MPF aktivitesi mayoz I'in profaz ve metafazı sırasında artar çünkü SiklinB1 mRNA'sı artar ve SiklinB1 ile kompleks yapmış p34Cdc2 defosforile olur. Oosit mayoz I'e doğru ilerlerken SiklinB1'in proteozomal yıkımı ile MPF geçici olarak aktiflenir(Şekil 24). Daha sonra birçok oosit mRNA'sı'nın translasyonu (örneğin SiklinB1 ve Mos) ve Cdc25 fosfataz ile Cdc2 kinaz aktifleşmesi olur bu yüzden MPF aktivitesi metafaz II'de fazladır (70, 86, 95, 111).



Şekil 23: Oosit maturasyonunda MPF'nin rolü (113).

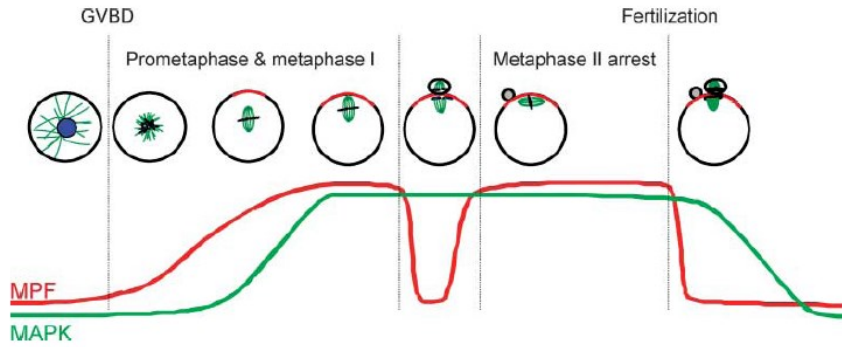


Şekil 24: Siklin B sentezi, MPF aktivitesi seviyesini mayotik maturasyonda kontrol eder (114).

GV safhasında MPF miktarı az, GVBD aşamasında yüksektir. Metafaz I'de en yüksek düzeye ulaşır ve arkasından anafaz-telofaz aşamasında, bu faktörün aktivasyonunda hızlı bir kayıp görülür. Oositin M II safhasına girmesiyle seviyesinde

tekrar artış meydana gelir. Bu artış ve azalışlar oositin gelişim dönemlerinin bir sonucu değil daha çok sebebidir (70, 111).

Döllenme sırasında oosit ile sperm birleşmesi; Ca^{+2} seviyesini arttırarak, Ca^{+2} - kalmomodulin kinaz I'yi aktive ederek ve ubiquitin proteozom yoluyla yıkım için SiklinB1 ve MOS'u yönlendirerek, oositin metafaz II'deki duraklamasını çözer. Ovulasyondan hemen önce MPF aktivitesi artar, germinal vezikül yırtılır ve oosit mayoz I'i tamamlar (Şekil 25). MPF aktivitesi aslında mayoz ve mitoz sırasında hücre siklusunun ilerlemesini kontrol eden fosfatazlar tarafından kontrol edilir. Cdc25b sentezi yapamayan mutant erkek fareler fertil olmalarına rağmen dişileri infertildir. Çünkü oositler kalıcı olarak mayoz I'de duraklarlar (86, 95).



Şekil 25: Fare oositlerinde mayotik maturasyon sırasında, MPF ve MAPK aktivitesi. MPF aktivitesi kırmızı çizgiyle ve MAPK yeşil çizgiyle gösterilmektedir (115).

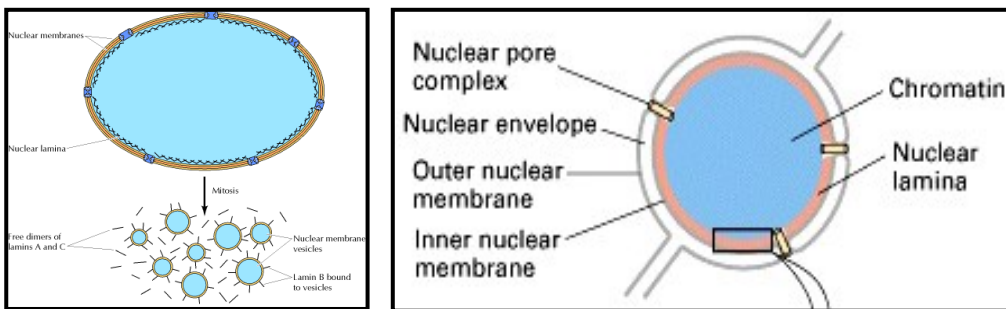
Mayozun kaldığı yerden tekrar başlaması ve maturasyon süreci fosforilasyon ve defosforilasyon olayları tarafından hücresel aktivitelerin ürünü olan kinaz ve fosfatazların kontrolünde gelişir (111).

MPF'nin Fonksiyonları

Çekirdek zarının parçalanması, golgi aygıtının fragmentasyonu, histonların fosforillenmesi, kromozomların yoğunlaşması (kondensasyonu), mikrotübüllerin düzenlenmesi, anafazın başlatılması gibidir. Ancak henüz MPF'nin tüm fonksiyonları aydınlatılamamıştır.

Çekirdek Zarının Parçalanması

MPF aktive olduğunda çekirdek zarının iskeletini oluşturan laminin filamentlerini dimerlerine bölerek depolimerizasyonunu sağlar. Ayrıca çekirdek iç zarını ve çekirdek porlarını da fosforlayarak çekirdek zarını küçük parçalar halinde sitoplazmaya dağılmasını sağlar. Çekirdek zarı geride küçük keseler ve çift katlı zar parçacıkları bırakarak hızla ortadan kaybolur. Çekirdekçik de sitoplazmayla temas eder etmez ortadan kalkar. Kanıtlar, çekirdek zarı artıklarının endoplazmik retikulum aracılığıyla emilip kardeş hücreler arasında paylaştırıldığını göstermektedir. Aynı kaderi işlevi Cdk1 tarafından durdurularak fragmentasyona giden Golgi aygıtı da paylaşır. B-tip laminler çekirdek zarından oluşmuş veziküllere bağlı kalırken, A ve C tip laminler sitoplazmaya dağılır (Şekil 26) (111, 116).



Şekil 26: Çekirdek zarının parçalanması (117).

Histonların Fosforillenmesi

MPF'nin ayrıca kromatin iplikleri oluşturan ve DNA'nın paketlenmesinde görev alan temel proteinlerden histonların fonksiyonunda da etkisi vardır. Histon H1, MPF tarafından fosforillenebilmektedir. Yapılan son araştırmalar H1'in fosforillenmemesinin kromozom yoğunlaşmasını engellemediğini ancak H3'ün fosforilasyonunun gerekli olduğunu ortaya koymuştur (111, 116).

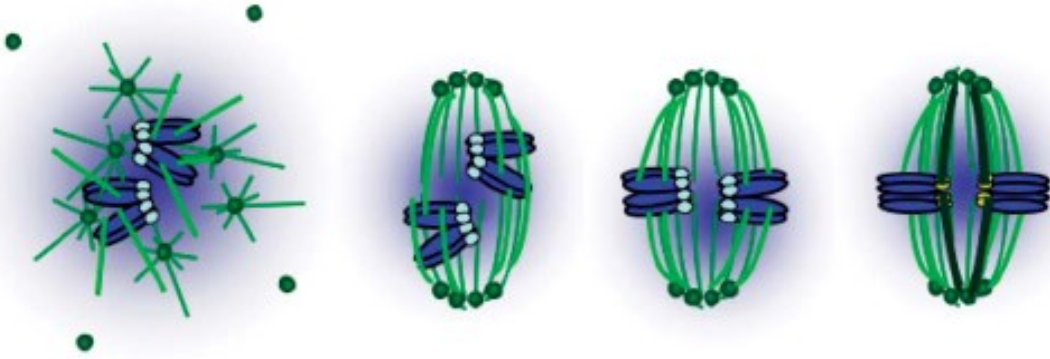
Kromozomların Yoğunlaşması

Sentez fazında DNA replikasyonunu takiben **kohezin** adlı moleküller kardeş kromatidleri birbirine tutturarak bir arada kalmalarını sağlar. Hücre M fazına girdiğinde kohezinler sentromer bölgesi dışında tüm kromozom boyunca ortadan kaybolarak yerini **kondensin** adı verilen proteinlere bırakır. MPF aktive olduğunda kondensinleri fosforilayarak aktif hale getirir. Bu olaylar sonucu kromozomlar yoğunlaşarak kısalır ve metafaz plağında yerini alır (111).

Mikrotübüllerin Düzenlenmesi

Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi mayotik içciğin oluşumunu da tetikler. Profazın başında Cdk1'in aktivasyonu, S fazında DNA gibi duplike olmuş sentrozomların birbirinden ayrılmasını sağlar. Anafaz sırasında kutuplara geç eden sentrozomlar bir yandan da içcik oluşumunda gerekli beta-tubulin ve diğer proteinleri düzenler. Mikrotübül yıkım hızı mitoz sırasında yaklaşık 5–10 kez artarken sentrozomlardaki mikrotübül sayısı da artar. Bu nedenle interfaza göre daha ince ve ve daha çok sayıda, radyal dizilimli mikrotübüller meydana gelir. Bu işlemler Cdk'in mikrotübül ilişkili proteinleri veya Aurora ve Polo benzeri kinazları fosforlamasıyla gerçekleşmektedir. Çekirdek zarının yıkılmasının ardından içcik mikrotübülleri kromozomların kinetokor bölgelerine tutunurlar. Kinetokorlardaki motor proteinler kromozomları - uca (sentrozoma) doğru çeker. Ters yönlü motor proteinler ve uzayan mikrotübüller ise kromozomları ters yöne hareket ettirir. Sonuç olarak kromozomlar

ileri geri hareketlerle ekvatoryal düzleme yerleşirler. Bir noktada her iki kutuptan gelen mikrotübüller kendi taraflarındaki kardeş kromatidlerin kinetokorlarına tutunarak bir denge kurarlar (Şekil 27). Kromozomlar ekvatoryal düzlemde ve kardeş kromatidler farklı yönlerde bakacak şekilde son şekil alınır (111).



Şekil 27: Mikrotübüllerin ve kromozomların düzenlenimi (114).

Mayoz Bölünmenin Sonlanması

Parçalanmış siklinlerden dolayı MPF aktivitesi azalır. Aktivitesi artan fosfatazlar, MPF tarafından fosfatlanan proteinlerdeki fosfatları kopartmaya başlarlar. MPF'nin inaktivasyonu sonucu nükleer veziküller kromozomlara yapışır, kromozomlar nükleer zarla çevrelenir, tek tek kromozomları saran zarlar birbiriyle kaynaşır, çekirdek zarı yeniden oluşur, integral membran proteinleri yerlerini alır ve por proteinleri yeniden birleşir, kromozomlar dekonpanse olur ve çekirdek içindeki yerlerini alır, çekirdekçik oluşur, rRNA genleri sentezlenmeye başlanır, miyozin iplikleri defosforilasyonla aktif hale gelir, ve en sonunda sitokinez gerçekleşir (111).

b) Protein Kinaz A (PKA)

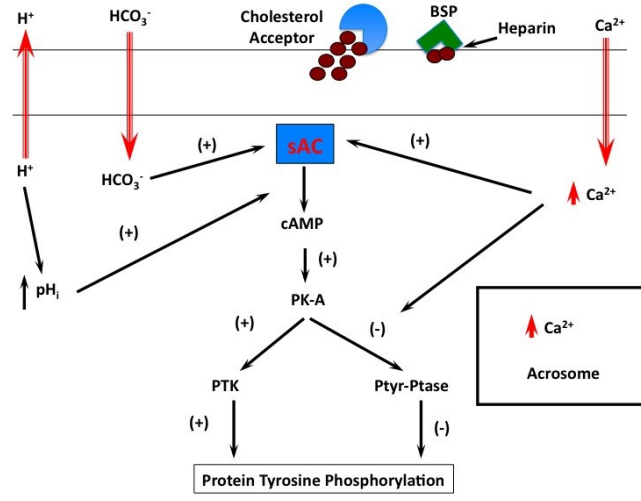
1977 yılında Maller ve Krebs, protein kinaz A (PKA)'nın spesifik bir inhibitörünün GVBD'yi tetiklediğini belirleyerek PKA'nın maturasyondaki rolünü ortaya çıkarmışlardır.

Daha sonraki alışmalar, PKA'nın MPF'nin inaktif halde tutulmasında dolaylı yoldan etkileri olduğunu göstermiştir (112). Günümüzde MPF aktivitesinin, PKA tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (112, 118, 119). PKA, tam olarak belirlenememiş birtakım aşamalardan sonra fosfataz CDC25 ve kinaz WEE1/MYT1 aktivitelerini düzenler (118). Bu moleküllerden CDC25, CDK1'in 14 ve 15. aminoasitlerini defosforile ederken WEE1/MYT1, fosforile eder. Baska bir deyişle WEE1/MYT1 aktif iken MPF inaktif haldedir; Oosit mayozu sürdüremez (mayotik arrest).

c) Siklik Adenin Monofosfat (cAMP)

Siklik Adenin Monofosfat (cAMP), oosit olgunlaşmasını düzenleyen anahtar moleküldür (122). 1958 yılında Sutherland tarafından, hormonal uyarımın ardından işlev gören ikinci mesajcı olarak görev aldığı belirlenmiştir (şekil 28). cAMP,  farklı mekanizma ile hücre içi reaksiyonları düzenlemektedir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir: cAMP bağımlı protein kinazı (PKA) aktive ederek başka hedef bir proteinin aktivitesini düzenleyebilir. PKA aracılığıyla cAMP yanıt elementi (cAMP respons element, CRE) adlı protein ile etkileşip spesifik bir genin transkripsiyonunu başlatarak, direkt olarak iyon kanallarını açıp kapatarak hücre içi reaksiyonları düzenlemektedir (111, 120).

Oosit içi yüksek cAMP düzeylerinin fare oositlerinde maturasyonu engellediği ilk olarak 1974 yılında Cho ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş, daha sonra denizyıldızı, xenopus ve diğer memeli türlerinde de aynı etki gözlenmiştir (120, 121). 1983 yılında, Bornslaeger ve Schultz, oosit içindeki cAMP düzeyleri yüksek tutularak maturasyonun engellenebileceğini göstermiştir (121). Mayotik arrest süresince yüksek olan cAMP düzeylerinin maturasyonun erken dönemlerinde düştüğü bilinmektedir (118).



Şekil 28: Oositten Kalsiyum salınımı ve cAMP yolağı (123).

d) Adenil Siklaz

Sığırlarda yapılan bir çalışma bunlardan AC 1 izoformunun yalnız kumulus hücrelerinde AC 8'in yalnız mural granüloza hücrelerinde, AC 3, 4, 6 ve 9'un ise her iki tip hücrede de bulunduğunu göstermiştir (115). Fare ve sıçanlarda yapılan analizlere göre de oositlerde; AC1, AC3 ve AC9 izoformlarının mevcut olduğu; genetik olarak AC3 izoformundan yoksun farelerde oositlerin ovaryum folikülleri içindeyken bile maturasyona gittiği gözlemlenmiştir (118).

e) G proteinleri

G proteinleri α , β ve γ olarak 3 alt birimden oluşmaktadır. Diğer guanin bağlayıcı proteinlerle karıştırılmamaları için çoğunlukla heterotrimerik G proteinleri olarak adlandırılırlar. Ras gibi GTP ilişkili proteinler monomerik G proteinleri olarak isimlendirilmektedir.

Oosit içinde yüksek düzeylerdeki cAMP'nin kaynağı son yıllara kadar tam olarak bilinmemekteydi. 2002 yılından sonraki çalışmalar bu kaynağın büyük ölçüde oositin kendisi olduğunu ortaya koymuştur. Science'da yayınlanan bir makalede, Mehlmann ve

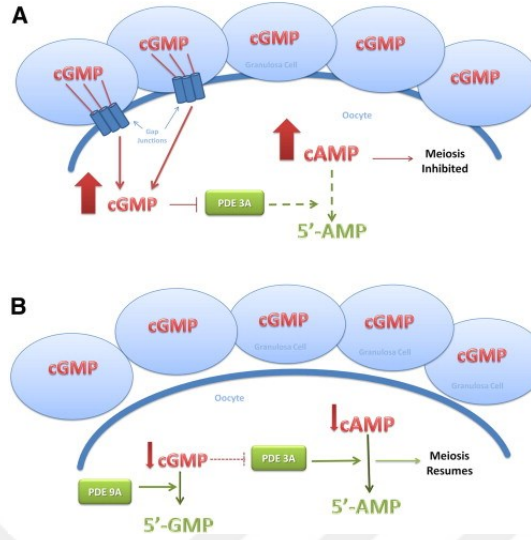
arkadaşları yeni bir teknik kullanarak, Gs'nin alt ünitesini inhibe eden bir antikoru antral folikül içindeki GV aşamasında oosite enjekte etmişler ve oositin folikül içindeyken maturasyonunu tamamladığını gözlemlemişlerdir (124). 2004 yılında Kalinowski ve arkadaşları, yine Mehlmann önderliğinde bir çalışmada Gs'nin dominant negatif bir formunu oositlere enjekte etmiş ve aynı sonuçları almıştır (125).

f) Kalsiyum

Webb ve arkadaşları, kumulus hücrelerinde sağlanan hücre içi kalsiyum artışının oositte de Ca^{2+} iyonlarının artmasına yol açtığını ve bu etkinin aradaki oluklu bağlantılar işlevsel kaldığı sürece devam ettiğini göstermişlerdir (126). Koyunlarda COC'lara LH uygulandığında Ca^{2+} düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir. Fakat aynı etki EGF uygulanması sonucunda görülmemektedir. Hücre içi kalsiyumu arttıran ajanlardan Quin 2-AM'nin kendiliğinden gerçekleşen maturasyonu engellediği bildirilmiş ancak daha sonra bu ajanın toksik etkileri ortaya çıkarılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda yine kalsiyum miktarını arttırıcı ajanlardan BAPTA-AM'nin maturasyonu engellemediği gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalarda etken maddeler kültür medyumuna verilmiş ve ajanların Ca^{2+} arttırıcı etkileri hem kumulus hem de oositlerde gerçekleşmiştir (127).

g) Fosfodiesteraz (PDE)

Maturasyonun gerçekleşmesiyle ilgili bir başka çekici hipotez de LH uyarımının oosit PDE'lerini aktive ederek cAMP hidrolizini arttırmasıdır (118). PDE süper ailesi 19 farklı gene sahip 10 aileyi kapsamaktadır (Şekil 29). Halkasal nükleotidler hücrelerde çok çeşitli fonksiyonları yerine getirmekle görevli olduklarından bunlarla ilişkili fosfodiesterazların da çok çeşitli olmaları beklenen bir sonuçtur. Her aile birbirinden enzimatik özellikleri, aktivatörleri ve inhibitörleri ile her aile içindeki genler de spesifik doku ve hücrelerde bulunuşu hücre hatta hücre içi yerleşimleriyle birbirlerinden ayrılmaktadır. Bu farklılıklar nedeniyle bir hücrenin birincil mesajcıya vereceği yanıtı belirlemede PDE'lerin etkisi büyüktür (128).



Şekil 29: Oositte PDE9A yolağı ve cGMP (129).

h) Siklik Guanozin Monofosfat (cGMP)

PDE3'ün cGMP ile inhibisyonunun cAMP düzeyini ve PKA aktivitesini arttırdığı bilinmektedir (130) (Şekil 29). cGMP'nin PDE aktivitesini baskıladığı 1984 yılında, fare oositlerinde gösterilmiştir (118). Sıçan oositlerinde, izole edilmelerinin ardından PDE aktivitesinde bir düşüş meydana geldiği ve buna cGMP seviyelerinde düşüşün de eşlik ettiği 2001 yılında Richard ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır (122).

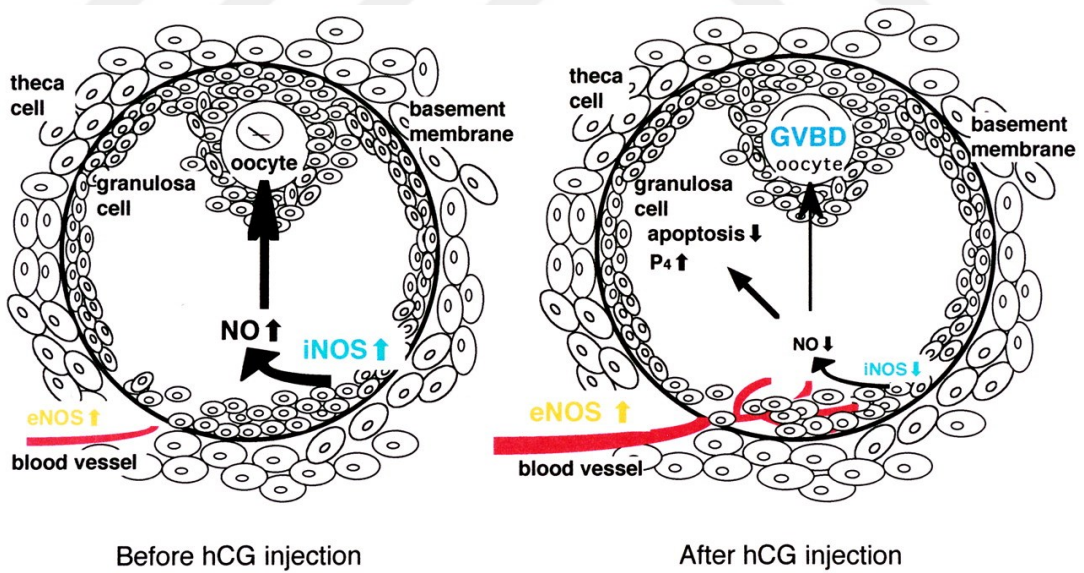
i) Guanil Siklaz (GC)

Guanil Siklaz (GC), sitoplazmada serbest olarak bulunabilir. Bu tip GC'ye çözünebilir (soluble) guanil siklaz (sGC) adı verilmektedir. GC, bazen de hücre yüzeyinde bir reseptöre bağlı olarak bulunabilir. Bu tipe de particulate GC (pGC) denilmektedir (111).

j) **NO (Nitrik Oksit)**

NO, arjinin aminoasidinden sentezlenir. Sentezden hemen sonra hücreden dışarı difüze olan NO, yakındaki hücreleri lokal olarak etkileyebilir. NO, stabil olmayan yapısından dolayı ancak birkaç saniye olan yarı ömrü nedeniyle kısa etki süresine sahiptir (111).

Nakamura ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, nitrik oksidin oositte mayotik maturasyonu engellediğini ve sonuçta iNOS-NO-cGMP ekseninin oosit mayotik maturasyonda çok önemli roller oynadıklarını göstermektedir. (131,132) hCG enjeksiyonu teka tabakasındaki eNOS ekspresyonunu artırırken, eNOS kökenli NO, preovulatar foliküllere kan desteğini artırır. Bunun tersine, intrafoliküller NO konsantrasyonunun azalan indüklemesiyle, iNOS ekspresyonu granüloza hücrelerinde azalmıştır. Bu değişimler granüloza hücrelerindeki progesteron üretimini desteklediğini ve granüloza hücrelerini apoptozdan koruduğunu ve oosit mayotik maturasyonuna yardımcı olduğunu kanıtlamışlardır (Şekil 30).



Şekil 30: iNOS ve eNOS sistemlerinin hCG enjeksiyonundan önce ve sonra farklılıklarının gösterimi (133).

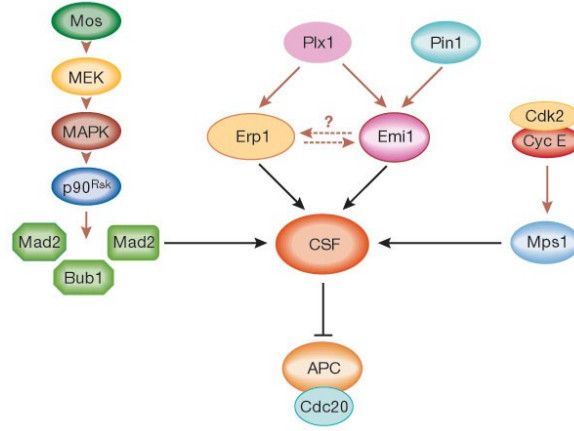
k) Nitrik Oksit Sentetaz (NOS)

NO sentezinden sorumlu olan üç enzimden ikisinin (eNOS ve iNOS) ovaryumlarda sentezlendiği immünohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir. Her iki NOS formunun da oosit olgunlaşmasında rol aldığı düşünülmektedir (134). Yapılan araştırmalara göre, eNOS sentezi daha çok teka hücre tabakasında, iNOS sentezi ise daha çok granülozalarda meydana gelmektedir (131). Sığırlarda, mRNA ile yapılan analizlerde de her iki enzimin de hem matür hem immatür oositlerde sentezlendiği gösterilmiş, yalnızca immatür oositlerde olmak kaydıyla, nNOS'unda sentezlendiği ortaya konulmuştur (135).

Nitrik oksidin oosit maturasyonundaki rolünün araştırılması ilk olarak 1998 yılında Jablonka-Shariff ve Olson tarafından ortaya konmuştur. eNOS geni silinmiş (eNOS knock out) farelerle yaptıkları çalışmada bu tip farelerde metafaz II'ye geçen oosit sayısının, normal farelerdekilere kıyasla daha az olduğunu ve oositlerin çoğunun metafaz I'de kaldığını görmüşlerdir. Ayrıca pek çok oosit de şekil bozukluğu göstermiş ve hücre ölümüne gittiklerinin sinyallerini vermiştir (136).

l) Emi

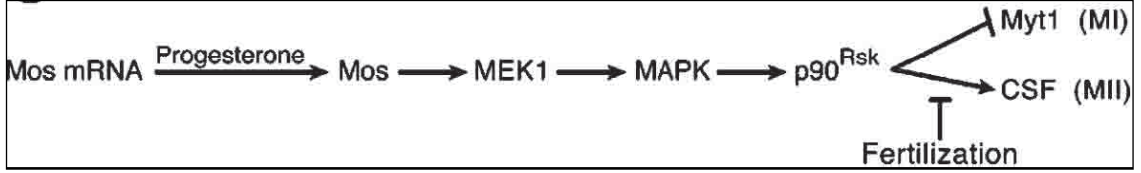
Emi1' in CSF beklemesindeki rolü ilk kez Reimann ve arkadaşları tarafından 2002 yılında tanımlanmıştır. Emi1 oosit maturasyonu ve ilk embriyonik bölünme sırasında saptanmıştır. P. Jackson (Stanford, CA, USA) metafaz II evresindeki bekleme aşamasında olan hücrelerde Emi1' tanımlanmıştır. Aynı zamanda Emi1'le ilişkili diğer proteini (Erp1/Emi2) de saptanmıştır. Erp1/Emi2, ilk kez 2005 yılında Schmidt, Tung ve arkadaşları tarafından Xenopus oositlerinde, metafaz II bekleme noktasının güçlü APC (Anaphase Promoting Complex) inhibitörü olarak gösterilmiştir (Şekil 31). Bu nedenle, Jackson Erp1/Emi2'inin indirekt delesyonu sonucunda Emi1'in azalması ile CSF nin beklemeden çıkışını indüklemiştir. Lorca matür oositlerde Emi1 proteininin belli seviyelerde iken, metafaz II'den çıkarken azaldığını gözlemiştir. Bununla beraber peptidyl-prolyl izomeraz Pin1'in bu proteini degradasyondan koruduğunu da göstermiştir(137).



Şekil 31: Emi 1'in CSF beklemesindeki rolünü gösteren şema (137).

m) MOS

Progesteron stimülasyonu maternal mRNA'dan MAPK ile, Mos sentezini uyardığı gösterilmiştir. Mos MAPK'yı aktive eden MEK1 (MAPK kinaz)'i; o da p90Rsk'ı (serin/treonin protein kinaz) aktive ettiği gözlenmiştir (Şekil 32). MAPK oosit matürasyonuna Mayoz I'de Myt1 inhibisyonunu sağlayarak katkıda bulunmuştur. Aynı zamanda bu yol, fertilize olmamış yumurtada CSF'nin etkinliğini de sağlamıştır. Oositler mayotik hücre döngüsünün bu noktasında, döllenmeyi bekleyerek, birkaç gün durabilir. MOS'un özellikle mayoz I'in bitişine yakın sentezlendiği ve metafaz I-anafaz geçişi ile metafaz II arrestinde Cdk1/Siklin B aktivitesinin korunması için gerekli olduğu ortaya koyulmuştur. Mos, hücre sinyal mekanizmalarında merkezi rol oynayan MAP kinaz yolunu aktive ederek fonksiyon gösterdiği saptanmıştır (Şekil 32). Sinyal yolundaki proteinler MOS-MEK-ERK-Rsk şeklinde sıralanmaktadır. Rsk, iki yoldan MPF aktivitesini koruyarak fonksiyon göstermektedir. Bunlar; siklin B sentezinin uyarımı ve siklin B yıkımının engellenmesidir. İkinci fonksiyonunu, anafaz tetikleyici bir protein kompleksi olan Mad/Bub proteinlerini, M fazı mayotik iğcik kontrol noktasında gerçeğine benzer şekilde inhibe ederek yerine getirdiği saptanmıştır. Böylece oosit metafaz II'den anafaz aşamasına geçemez. Bu aşamadaki oositler fertilizasyonu bekleyerek birkaç gün boyunca yaşamını devam ettirebildikleri gözlenmiştir. (111).



Şekil 32: MAPK ile Mos sentezi uyarılığını gösteren şema (111)

n) Siklin B

Mayotik matürasyon sırasında siklin B seviyesi maksimum iken Cdk1(p34cdc2) seviyesi sabit kaldığı gözlenmiştir. MPF'nin pozitif uyarıcı etkisinin tersine siklik adozin monofosfat (cAMP), oositin germinal vezikül halinin sürdürülmesinden sorumlu olup mayotik matürasyon sırasında siklin B seviyesi maksimum iken Cdk1 (p34cdc2) seviyesi sabit kaldığı görülmüştür. MPF'nin pozitif uyarıcı etkisinin tersine siklik adozin monofosfat (cAMP), oositin germinal vezikül halinin sürdürülmesinden sorumlu tutulmuştur. **P39 MOS**, **siklin B** ile bir araya gelerek MPF'yi aktive veya stabilize etmiştir. **MISS** (MAPK interacting and spindle stabilizing) fare oositlerinde metafaz II'nin stabilitesini kontrol eder. Diğer bir MAPK olan **DOC1R** (Deleted in oral cancer one related), insan tümör süpressör geninin farelerdeki homologudur. DOC1R, MOS/MAPK yolağı ve MPF tarafından mayotik maturasyon sırasında fosforilasyonu düzenlediği gösterilmiştir. DOC1R ve DOC1R-GFP füzyonu mayotik maturasyon sırasında mikrotübüllerde lokalize olduğu saptanmıştır. MPF, MOS'un ve Emi2 nin fosforillenmiş seviyelerini kontrol ettiği bildirilmiştir. Anafaz ilerletici kompleksin (APC) Emi1 bağımlı düzenlenimi (erken mitotik inhibitör1), profaz 1 den metafaz 1 e geçişi kontrol ettiği saptanmıştır. Emi1 in azalması siklin B yıkımını arttırdığı gösterilmiştir. MPF'nin aktivasyonunun azalması 1.mayoz bölünmeye girişi geciktirdiği saptanmıştır (138).

o) Fyn

Oosit matürasyonunda etkili olan bir diğer molekül **Fyn** olduğu gösterilmiştir. Fyn, Src ailesine aittir. İn vivo koşullarda oosit matürasyonu sırasında Fyn kinaz eksikliği nedeniyle mayotik hücre siklusunun bozulduğu kanıtlanmıştır. Fyn, mikrotübül polimerizasyonu ve içciklerin stabilizasyonunu sağladığı saptanmıştır (139).

1.5. MAYOTİK ARREST

Mitozla sayıları 7 milyona kadar ulaşan oogonyumlar, primer oosite dönüşerek mayoz bölünmeye girerler. Profaz I'de kroosing over ile kardeş kromatid değişiminin ardından diplotende uzun yıllar sürecektir bir duraklama evresine girerler (119).

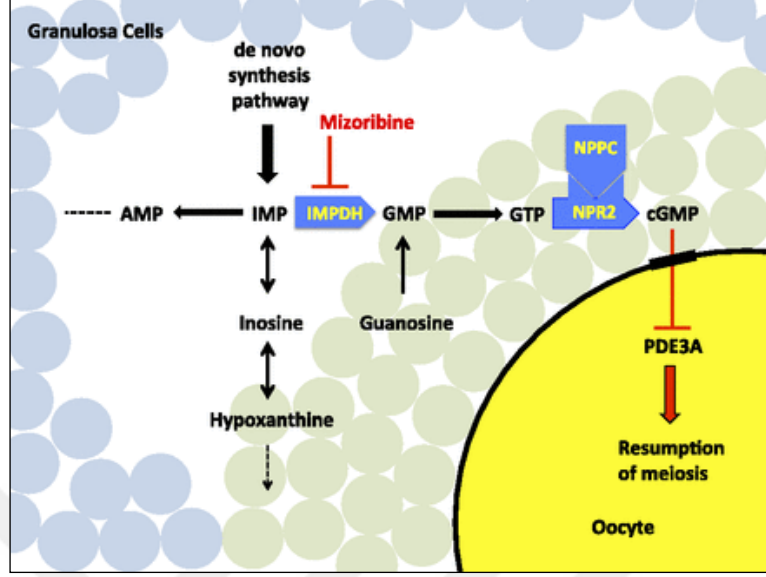
Mayotik arrest olarak adlandırılan bu evre ovulasyonun hemen öncesine kadar tamamlanmaz ki bu 12–50 yıl kadar sürebilir. Oositlerin mayoz I'de beklediği süre ne kadar uzarsa dış etkenlere maruz kaldığı süre de artacağından sonraki bölünmelerde trizomi 21 (Down Sendromu) gibi aksaklıklar meydana gelme olasılığı artar. Puberteden sonra gelişmekte olan foliküllerde bulunan oositler, LH hormonunun salınımından yaklaşık 24–36 saat sonra ilk mayoz bölünmesini tamamlarlar. Sonrasında oluşan iki kardeş hücreden biri bölünme sırasında sitoplazmanın çoğunu alarak hacim olarak oldukça büyük olan sekonder oositi diğeri de sekonder oosite kıyasla oldukça küçük olan birinci kutup cisimciğini oluşturur. Primer oosit mayoz I'in tamamlanmasının hemen ardından mayoz II'ye geçer ancak bölünme bu kez de metafaz aşamasında kesintiye uğrar. Mayozun tamamlanması ancak fertilizasyon gerçekleşirse olur ve oosit mayoz bölünmesini tamamlamış, 2. Kutup cisimciğini atmış ovum haline gelir. İnsanlarda birinci kutup cismi mayoz bölünmeye devam etmez. Bu nedenle mikroskop altında, ZP içinde bir kutup cisimciği gözlenen oositler maturasyonunu Mayoz I'i tamamlamış, iki kutup cisimciği gözlenen oositler ise mayoz bölünmesini tamamlamış dolayısıyla döllenmiş oositler olarak kabul edilir (140).

Memeli oositleri doğum sırasında mayoz I'in profaz safhasında takılı duraksarlar ve ovulasyon nedeniyle LH'in preovulatuvar dalgalandığı zamana kadar beklemede kalırlar. İmmatür oositlerde Profaz 1 de bekleme, katalitik bir alt birim (CDK1) ve

düzenleyici bir alt ünit (siklin B1) den oluşan MPF nin düşük aktivitesinden dolayıdır. CDK1 in fosforilasyon inaktivasyonu ve siklin B1 in sürekli bozulması MPF aktivitesini profaz 1 de beklemesini az tutar. LH aracılı sinyaller aktif CDK1 için moleküllerin geniş bir dizilimini manupule eder. Aktif CDK1 sadece mayozun yeniden başlaması sırasında farklı mayotik fosfoproteinleri fosforile etmez aynı zamanda CDK1 antagonist protein fosfataz (PPs)'in engellenmiş aktivitesi tarafından oluşan hızlı defosforilasyonunda inhibe eder. Böylece, CDK1 hem substratları tarafından fosforile edilip hemde oluşan defosforilasyondan korunur. Oositte mayozun tekrar başlaması MPF aktivitesinin kesintisiz olması ve CDK1 antagonist PPs'in aktif durumuna bağlı olduğunu bilinen tüm kanıtlar göstermektedir (141).

Karen Wigglesworth ve arkadaşlarının 2013'de yapmış oldukları bir çalışmada, foliküler somatik hücrelerinin, oosit-folikül gelişiminde önemli olup arrestte de önemli fonksiyonlarının olduğu belirtilmiştir. Foliküler somatik hücreleri, Natriüretik peptid C/ natriüretik peptid reseptör 2 (NPPC/NPR2) sistemi yoluyla ve muhtemelen foliküler sıvıda pürin hipoksantin yüksek seviyesi yoluyla sürdürdüğü düşünülmüştür. NPPC, NPR2 ligandı ile yüksek aktivasyon, folikül somatik hücrelerindeki predominant guanil siklaz, siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretir. Buda gap junctions yoluyla oositte transfer olduktan sonraki mayotik arrest anlamına gelmektedir. Bu çalışmada kastedilen, hem NPPC/ NPR2 sistemin hemde hipoksantin, iyonozin monofosfat dehidrojenazın (IMPDH) aktivitesinin gerekliliği ve guanil metabolitlerin ve cGMP'nin üretiminde sınırlı oranda enzim gerekliliği olduğu saptanmıştır (142) (Şekil 33).

Oositlerde siklik adenozin monofosfat (cAMP), mayotik arrestin sürmesinde temel fonksiyon görür. LH'dan sonra, bir oosit cAMP fosfodiesteraz (PDE3A), oosit içindeki cAMP seviyelerini ve GVBD ile sonuçlanan yolu azaltır. LH'dan önce, PDE3A aktivitesi, kumulus hücrelerinden siklik guanozin monofosfat (cGMP)'in girişi tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu şekilde foliküler somatik hücreler, gap junctions denilen membran kanalları yoluyla oosite yakınlaşır. cGMP, hem kumulus hücreleri hemde mural granüloza hücreleri tarafından üretilir. Foliküler somatik hücreleri, foliküler duvarın içinde lokalize olduğu saptanmıştır (142).



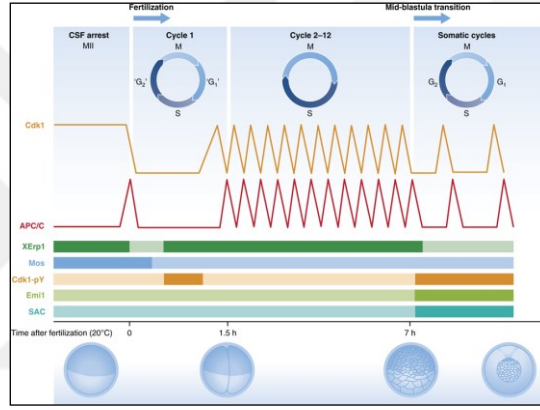
Şekil 33: Natriüretik peptid C/ natriüretik peptid reseptör 2 (NPPC/NPR2) sistemi yolağı (143).

Metafaz II arrest

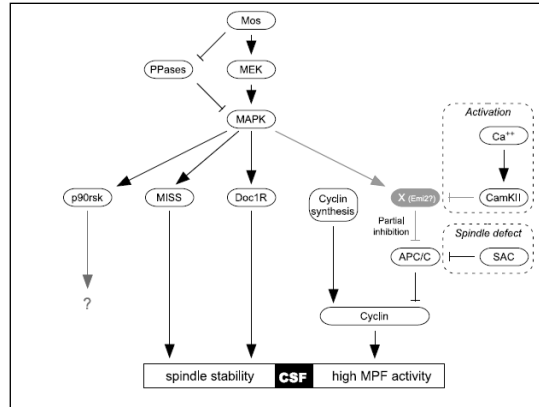
Diploide beklemekte olan oositlerin hormonlarla uyarımı öncelikle Cdk1'in aktivasyonunu tetikler. Uyarılan MPF, görevlerini yerine getirip mayoz I tamamlandığında fonksiyonlarında bir miktar azalma olur ancak mitozdaki aksine tamamen kaybetmez. Sitoplazma bölünmesinin (sitokinezin) ardından Cdk1 aktivitesinde yeniden artış olur ve oosit metafaz II'de beklediği sürece yüksek kalır (111).

Oositin metafaz II'de beklemesinden sorumlu molekül ilk olarak Yoshio Masui ve Clement Markert tarafından 1971'de tesadüfen keşfedilmiştir. MPF üzerine çalışan Masui, GVBD'yi tamamlamış oositlerden bir miktar sitoplazmayı çekerek bölünmekte olan embriyonun blastomerlerinden birine transfer etmişler, ancak enjeksiyon sonucunda, enjeksiyon yapılmayan blastomerlerin normal şekilde bölündüklerini, sitoplazma enjekte edilen blastomerin ise bölünmeye devam etmeyip metafaz aşamasında kaldığını gözlemlemişler (Şekil 35). Deneyleri bu kez de GVBD gerçekleşmemiş oositlerden aldıkları sitoplazmayla tekrarlayan ekip enjeksiyon yapılan blastomerin de yapılmayanlar gibi düzgün şekilde bölündüğünü tespit etmişlerdir. Böylece

araştırmacılar metafaz II (MII) aşamasındaki oositlerin bölünmesini durduran inhibe edici bir faktör bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Cyto-Static Factor (CSF) adı verilen bu faktörün oosit mayoz bölünmesinin değişik zamanlarında tekrar edilmesiyle araştırmacılar, CSF'nin oosit metafaz I (MI) aşamasından sonra ortaya çıktığını, zamanla artarak oosit matür halde durdukça yüksek seviyelerde bulunmaya devam ettiğini ortaya koymuşlardır. CSF miktarı ancak fertilizasyon gerçekleştikten hemen sonra düşmektedir. Deneyi bu kez de çekirdeği çıkartılmış oositlerde gerçekleştiren Masui ve ark, aynı sonuçları elde ettiklerinden CSF aktivitesinin çekirdekten bağımsız olduğunu belirtmişlerdir (84) (Şekil 34).



Şekil 34: CSF aktivitesi ve diğer Moleküllerin aktivitesini gösteren şema (144).



Şekil 35: Oositlerde Metafaz II arrest (145).

1.6. Foliküler Apoptoz

Apoptoz, ovaryumda oositler adına patolojik bir durumun oluşmasına sebep olan foliküler gelişim sürecinin çok önemli bir parçasıdır (104).

Atrezinin hücrel mekanizmasının ardında asıl nedeni olarak yer alır. Bu mekanizma daha çok mRNA ve protein sentezi ile ilgilidir. Biyokimyasal olarak foliküler atrezi apoptotik hücre ölümlerine atfedilir. Bu da belirli bir düzen içerisinde hücrelerin sahip olduğu DNA materyalinin kaybı ve nükleer genomik havuzun dağılması ile sonuçlanır (146, 147).

In vitro koşullarda yapılan çalışmalarda granuloza hücrelerince IGF-1 salındığı bunun da granuloza hücre mitozu ve steroidogenik aktivasyonunda etkili olduğu tespit edilmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda, büyüme faktörlerinin in vitro maturasyon vasatına katılmasıyla oosit maturasyonunun desteklendiği bildirilmiştir (148).

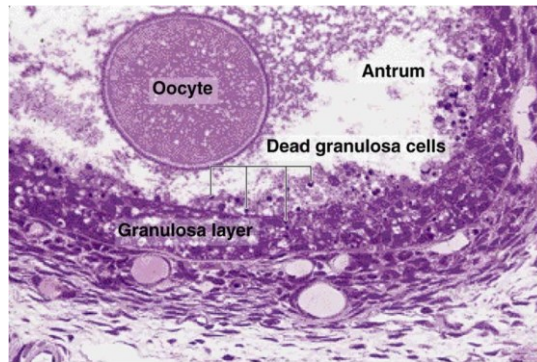
Memeli ovaryumunda foliküllerin ortaya çıkma işlemi, foliküler dalgalanma süreci içerisinde proliferasyon, farklılaşma ve atrezi arasında kompleks bir etkileşim sonucunda meydana gelir. Folikül atrezisi olarak bilinen bu işlem apoptozdur ve folikül hücrelerinin ölümü genetik olarak belirlenmiştir. İn vitro çalışmalarda, atretik foliküllerden elde edilen kumulus-oosit komplekslerinde (COCs) elde edilen embriyolarda blastosist aşamasına erişim durumu oldukça zayıf olduğu görülmüştür (104, 149).

Gonadotropinler, ovaryum foliküllerinin büyümesi ve gelişmesi için gereklidir. Preovulatör gonadotropin artışı bloke edilir veya hipofizektomi sonrası serum gonadotropinleri azalırsa, foliküller atreziye maruz kalır. Diğer folikül yaşamsal faktörleri olarak; EGF, TGF, bFGF, IL-1, GH ve pro-apoptotik faktörler olarak da TNF- α , Fas Ligand ve GnRH sayılabilir. Bunlardan IGF-1 folikül apoptozu üzerinde etkili iken, Aktivin granuloza hücre apoptozu üzerinde inhibe edici etki gösterir. Folikül yaşamı ve atrezisi üzerinde etkili diğer önemli regülatörler seks steroidleridir. Sıçan ovaryumunda östrojenler yaşamsal faktör olarak etkili iken, androjenler apoptozu teşvik ederler (150, 151, 152).

Apoptoz, ovaryumda oositler adına patolojik bir durumun oluşmasına sebep olan ve normal olmayan foliküler gelişim sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Atrezinin

hücresel mekanizmasının ardındaki asıl neden olarak yer alır. Adı geçen mekanizma, daha çok mRNA ve protein sentezi ile ilgilidir. Biyokimyasal olarak, foliküler atrezi apoptotik hücre ölümlerine atfedilir. Bu da, belirli bir düzen içerisinde hücrelerin sahip olduğu DNA materyalinin kaybı ve nükleer genomik havuzun dağılması ile sonuçlanır. Apoptoz, aynı zamanda korpus luteumun luteolizisini de sağlayan mekanizmadır. Granüloza hücreleri, folikülogenezde apoptozdan ilk etkilenen hücrelerdir. Antral foliküllerdeki granüloza hücrelerinde apoptozun başlaması hormonal kontrol ile birlikte parakrin ve/ veya otokrin intraovariyan sinyallere bağlıdır. Geçmiş çalışmalar gösteriyor ki, gonadotropinlerin azalması ovaryumda kuvvetli atreziye yol açmaktadır. Bunun yanısıra, büyüme faktörleri de ovaryum gelişiminde önemli rol oynar. IGF, apoptozun düzenlenmesi olayında hücre proliferasyonu, aromataz aktivasyonu ve progesteron sentezi gibi kilit roller üstlenir. Granüloza hücrelerinde GnRH, androjenler, IL-6, ROS ve TNF- α apoptozu uyarır (147, 153, 154).

Teka hücrelerinde ise apoptoz geciktirilmiş görünmekle beraber, ovaryumdaki bu hücre de apoptozu uğramaktadır. Teka hücrelerindeki apoptozun mekanizması halen araştırılmakla beraber Bcl-2 ve kaspaz-1'in sürece dahil olduğu bilinmektedir. Foliküler gelişimin primordiyal ve preantral safhalarında ise apoptozdan ilk etkilenen hücre oositir. Parakrin faktörlerin, oosit apoptozunu uyardığı düşünülmektedir (Şekil 36). Bu faktörlerin varlığı, foliküler aşamada gelişim yetersizliği olan oositlerin maturasyonunu engelleyen bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Sürecin anahtar molekülleri ise EGF/TGF- α , FGF, Inhibin/Activin ve c-kit/KL' dir (147).



Şekil 36: Foliküler apoptoz (155).

1.7. Hücre Döngüsü Molekülleri

Hücre döngüsü, iki yavru hücre oluşturmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık olarak tanımlanır. Hücre döngüsü temelde **interfaz** ve **mitoz** olarak ikiye ayrılır. **G₁**, **S**, **G₂** olarak üç evreden (fazdan) oluşan interfazın en belirgin olayı hücre çekirdeğindeki DNA'nın iki katına çıkmasıdır. G₁ ve G₂ fazları hücreye bölünme için gerekli hazırlığı yapacak zamanı kazandırır. Hücre, G₁ evresinden sonra S fazına girmek yerine G₀ adlı farklı bir evreye girip burada uzun süreler boyunca bölünmeden bekleyebilir. Hücre döngüsü, belirli kontrol noktalarında, bir aksaklık olup olmadığı değerlendirilerek kontrol edilir. Hücre bir problem saptarsa döngü devam etmez (156).

Hartwell ve ark, çalışmalarında iki mutant mayayı keşfetmiştir. Bunlar ısıya duyarlı (temperature sensitive, *ts*) ve hücre bölünme siklusu (cell division cycle, *cdc*) mutantlarıdır.

Çalışmada ısıya duyarlı mutant mayaların aynı morfolojide kaldıkları yani bölünmeye devam etmedikleri gözlenmiştir. Bu da mutant ürünün döngünün belirli bir bölgesinde görev aldığını işaret etmiştir. Bu dönemde yaklaşık 60 farklı *cdc* mutanı ile 30 *ts* mutanı belirlenmiştir. Daha sonra *cdc* genlerine ek olarak başka hücre döngüsü genleri de birbirleri ile ilişkileri incelenerek belirlenmiştir. Ör: *cdc28* mutanı bölünmenin başlangıç evresini geçemez (157).

Siklin bağımlı (cyclin-dependent) protein kinazlar (Cdk1)

İlerleyen çalışmalar *S. cerevisiae*'nin *cdc28* geni ile *S. Pombe*'nin *cdc2* geninin homolog genler olduğu ortaya çıkmış ve sonrasında bunların ürünlerinin bir protein kinaz olduğu belirlenmiştir. Tüm ökaryotlar için ortak olan iyi korunmuş bu gen ürünü **Cdk1** olarak adlandırılmıştır (157).

Siklinler

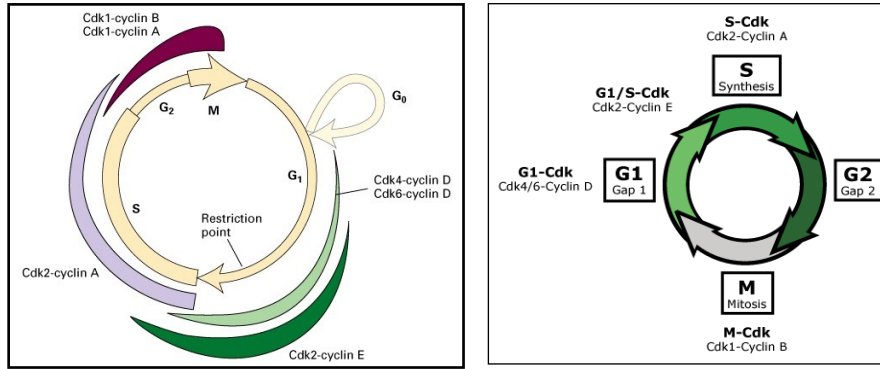
Hücre döngüsü ile ilgili önemli olan üçüncü araştırma aşaması 1983 yılında Tim Hunt ve ark tarafından gerçekleştirilmiştir. Hunt, denizkestanelerinde protein sentez

inhibitörleri kullanarak yaptığı araştırmada hücrelerde M fazına girişin bu aşamadan önce sentezlenen bir protein varlığında gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Hücrede periyodik olarak sentezlendiği için Hunt bu moleküle **siklin (cyclin)** adını vermiştir. Yine Hunt, siklini iki tipe ayırarak **siklin A** ve **siklin B** olarak sınıflandırmıştır. Bu üç farklı araştırmayı birleştiren deney 1988 yılında James maller'in laboratuvarından gelmiştir. Maller, MPF'yi kurbağa yumurtalarından saflaştırmayı başarmış, bunu takip eden farklı çalışmalar MPF'nin aslında iki farklı proteinden oluştuğunu ortaya koymuştur; **Cdk1** ve **siklin B** (158, 159).

Siklinler ve Cdk'lar

İlerleyen çalışmalar bu moleküllerin geniş ailelerin üyeleri olduklarını göstermiştir. Buna göre hücre döngüsünün bu iki protein tarafından kontrol edildiği söylenebilir;

- **siklinler** ve
- **siklin bağımlı (cyclin-dependent) protein kinazlar (Cdk)** (Şekil 37).



Şekil 37: Hücre döngüsü (160).

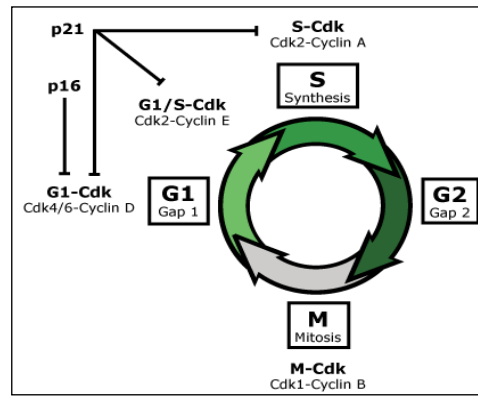
Memelilerde Cdk1 hücre döngüsünün her aşamasında hücrede mevcuttur. Buna karşılık Siklin B, hücre döngüsünün G2 evresinde sentezlenir ve Cdk1 ile birleşerek kompleks oluşturur (158) (Tablo 1.1).

Tablo 1.1: Değişik siklinler ve Cdk'lar hücre döngüsünün değişik aşamalarında görev almaktadır.

Cdk-Siklin Kompleks	Siklin	Cdk
G1/S-Cdk	Siklin E	Cdk2
S-Cdk	Siklin A	Cdk2
M-Cdk	Siklin B	Cdk1/2
G1-Cdk	Siklin D	Cdk4/6

Hücre Siklusu İnhibitörleri

Hücre siklusunu inhibe eden birçok protein vardır. İki örnek protein, p16 ve p21 dir. P16, yalnızca G1-Cdk hedefi olan spesifik bir inhibitördür. P21 ise, spesifik olmayan ve birçok cdk lar için hedef olan bir inhibitördür. Cdk ların direk inhibisyonlarından başka hücre sikluslarını inhibe eden başka yollarda vardır. Siklus arresti, Cdk inhibisyonu, TGF β , G2 kontrol noktası inhibisyonu ve hücre siklusunun bazı inhibitörleri siklin'lerin ekspresyonunun azalmasında rol oynar (örn: Rb) (Şekil 38).



Şekil 38: Hücre Siklusu İnhibitörleri (160)

Büyüme Faktörleri ve Siklinler

Memeli hücreleri kısıtlama noktasını geçip S fazına girebilmek için büyüme faktörlerine gereksinimleri vardır. Bunun nedeni, büyüme faktör reseptörleri ile aktive olan Ras/Raf/MEK/ERK yolağının siklin D1'in sentezini uyarmasıdır(Şekil 40). Siklin D1, Cdk4 ve Cdk6 ile birlikte S fazına geçişi başlatan moleküller olduğundan siklin D1 üretimi hücre bölünmesini başlatır. Siklin D1 miktarları büyüme faktörü ile uyarım olmazsa hemen düşer. Fakat büyüme faktörü MAPK yolağında veya siklin D1 düzenlenmesinde meydana gelebilecek aksaklıklar hücreleri kontrolsüz bölünme ve sonuçta tümör oluşumuna yönlendirebilir. Lenfomalar ve göğüs kanserlerine nedenlerinden biri de bu durumdur. Benzer şekilde Cdk4 ve Cdk6'yı baskılayan Ink4 moleküllerindeki mutasyonlar da kansere neden olabileceği öngörülmüştür (161).

Retinoblastoma (Rb)

Siklinle ilişkili substratlardan retinoblastoma (Rb) adlı proteinin mutasyonlarına kanser vakalarında çok rastlanması da siklin D1 ile kanser arasındaki bağlantıyı güçlendirmektedir. Rb ilk olarak, oldukça nadir görülen bir kanser tipi olan retinoblastomada belirlendiği için bu adı almıştır. İlerleyen araştırmalar, bir mutasyon sonucu işlevsiz hale gelmiş Rb'nin yalnızca retinoblastomada değil pek çok farklı kanser türünde de yer aldığını ortaya koymuştur. Ras ve siklin D gibi genlerde meydana gelen mutasyon hücre proliferasyonunu artırırken Rb ve Ink4 Cdk inhibitörleri gibi genlerde meydana gelen mutasyonlar hücre çoğalmasının baskılanması engellendiği için kansere neden olabilmektedir. Daha sonra gerçekleştirilen araştırmalar, Rb ile Rb ailesinin diğer üyelerinin, hücre döngüsünün devamı ve DNA sentezi için gerekli proteinlerin transkripsiyonunda görev aldığını göstermiştir. Hücre döngüsü kontrol kaybı neoplastik hücrelerin bir özelliğidir. Hücre döngüsünün S-faz geçiş için kritik G1 bir regülatör bu geçiş için gerekli gen transkripsiyonunun bastırması için hücre döngüsü transkripsiyon faktörlerinin E2F ailesi ile etkileşim retinoblastoma tümör baskılayıcı protein Rb vardır. E2F ile etkileşim yoluyla, Rb da kontrol eden apoptoz genleri düzenler (162) (Şekil39).

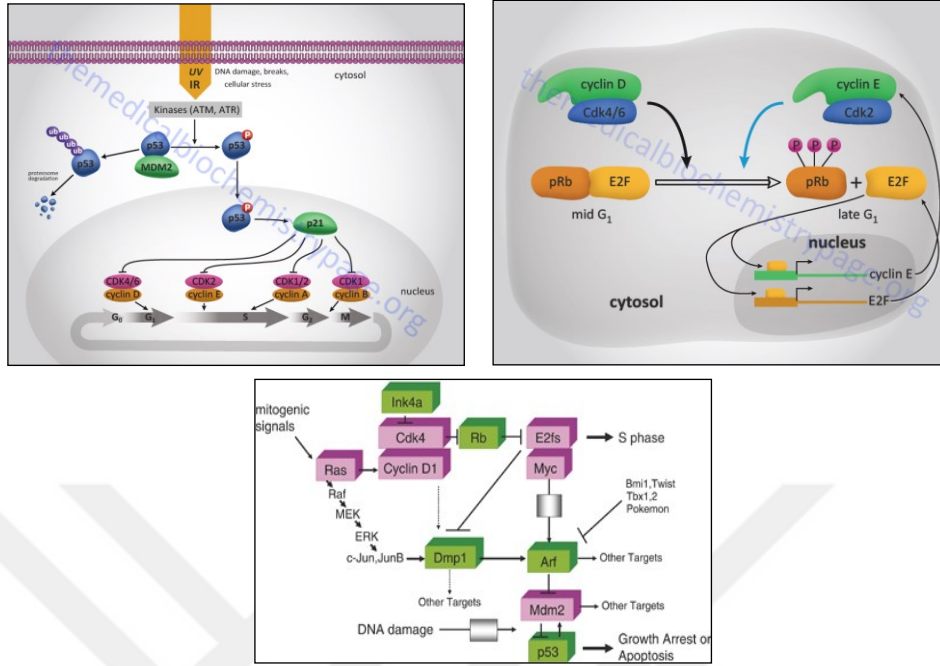
KontROLSÜZ hücre çoğalması kanser özelliğidir ve tümör hücrelerinin genellikle doğrudan hücre döngüleri düzenleyen genleri zarar görmüştür. P16INK4a ve siklin D1 etkileyen genetik değişiklikler, retinoblastoma protein (RB) ve hücre döngüsünün G1 fazından kontrollü çıkış fosforilasyonunu yöneten proteinlerdir. Bu yolun inaktivasyonunda tümör gelişimi için gerekli olabilir insan kanserlerinde çok sıktır. Tümör baskılayıcı protein p53 gibi, "RB yolak"ın bu bileşenleri tek başına hücre döngüsü için gerekli olmasa da, hayatı boyunca homeostatik doku yenilenmesini düzenleyen kontrol noktasında RB'nin fonksiyonları katılabilir (163).

E2F

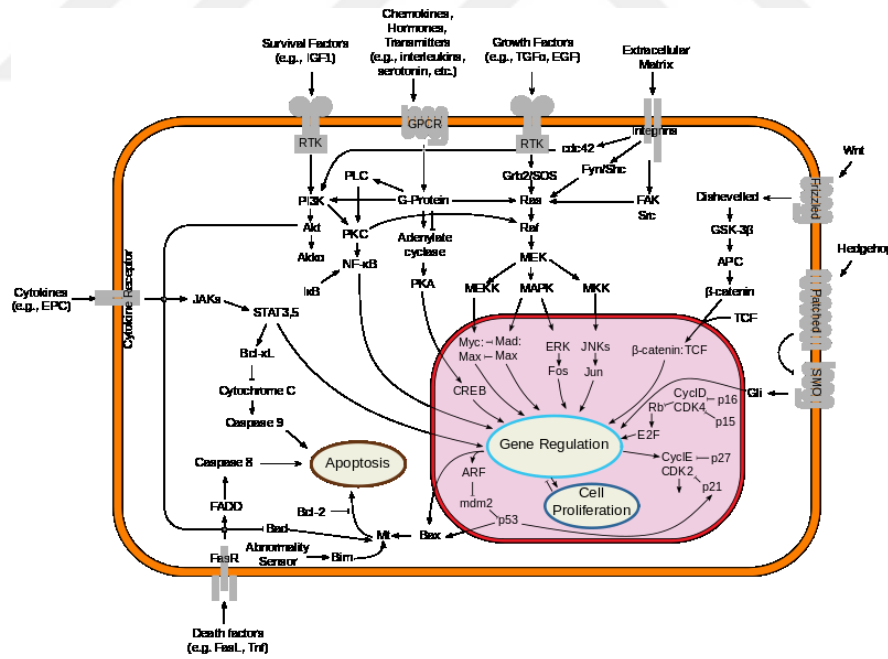
Rb'nin G0 veya erken G1 fazlarında inaktif yani fosforlanmamış halde olduğu, G1'in sonlarına doğru ise Cdk4,6 / siklin D kompleksi tarafından fosforlandığını belirlenmiştir. İnaktif haldeki Rb, **E2F** adlı bir proteine bağlı haldedir. E2F ailesi proteinler, pek çok gen için transkripsiyon faktörüdür. Rb'nin aktive olması E2F ile bağlantısını kopararak, E2F ile ilgili genlerin sentezini başlatır (164) (Şekil 39).

Cdk2 / siklin E

G1'de, kısıtlama noktasından sonra Cdk4,6 / siklin D aktivitesi azalır ve Cdk2 / siklin E aktivitesi artmaya başlar. Bu artışta, kompleksi normalde inaktif halde tutan p27'nin etkisi vardır. Büyüme faktörünün uyarımı ile aktive olan Ras/Raf/MEK/ERK ile PI3 kinaz / Akt fosforilasyon yolakları p27'nin miktarını azalttığı gibi siklin E sentezini de artırır. Artan Cdk2 / siklin E aktivitesi, p27'nin fosforlanarak ubiquitinasyona gitmesine yol açar. Bu da Cdk2 / siklin E aktivitesini daha da artırır. Rb'yi de fosforilleyerek transkripsiyona yardımcı olur. MCM helikazlarını aktive ederek replikasyon merkezlerindeki ORC proteinlerinden uzaklaşmasını dolayısıyla DNA replikasyonunu başlatır (165) (Şekil 39, 40).



Şekil 39: RB, E2F ve Cdk2 / siklin E aktivitesini gösteren şema (166, 167).



Şekil 40: Sitokinler, Büyüme faktörleri, IGF, Kemokinler, Wnt yolaklarının ilerleyişini gösteren şema (168).

1.8. Oosit Toplama Prosedürü (Oocyte Pick Up: OPU)

1978’de Louise Brown doğumu, infertilite tedavisinde yeni ufukların açıldığı bir dönemi başlatmıştır. Günümüzde, oosit toplama prosedürlerinde bir takım değişimler olmuştur. Oosit toplamanın laparoskopi ile değil, transvajinal yolla ultrasonografi rehberliğinde gerçekleşmesidir (70, 169).

Oositlerin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

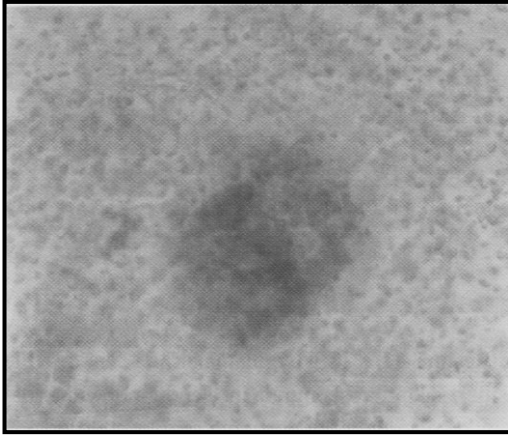
- a) Oositlerin kumulus- korona kompleksine göre sınıflandırılması
- b) Oosit morfolojisinin 1. kutup cisimciğine göre sınıflandırılması

a) Oositerin kumulus- korona kompleksine göre sınıflandırılması

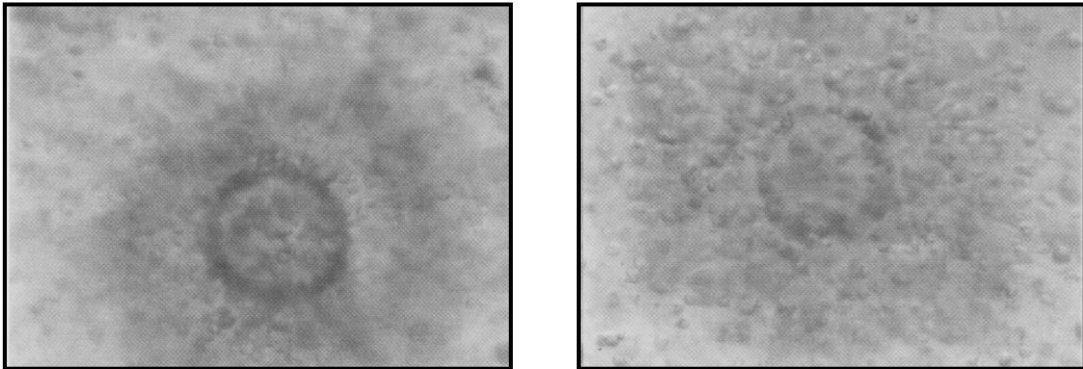
Klasik İVF de oositlerin morfolojik özellikleri, çevrelerindeki kumulus-korona hücrelerinden dolayı gözlenemez. Ancak oositlerin matürasyonlarını ve dolayısıyla inseminasyon zamanlamasını saptayabilmek için kumulus korona kompleksindeki hücrelerin miktar, dağılım ve düzenlerine göre değerlendirilir. Klasik İVF de kumulus-korona kompleksinin değerlendirilmesinde, dikkate alınan kriterler ve bu sınıflamaya göre elde edilen fertilizasyon oranları ilk kez 1988 de Wolf tarafından tanımlanmıştır (169) (Tablo 1.2).

Tablo 1.2:

Kumulus-korona kompleksine göre oosit matürasyonu sınıflaması	
Grade 1	Kumulus hücreleri yoktur veya seyrek, korona hücreleri 1-3 sıralıdır (Resim 1.7).
Grade 2	Kumulus hücreleri yoğun görünümlüdür ve korona hücrelerisıkıca bir aradadır.
Grade 3	Kumulus hücreleri yaygın ve genişlemiş görünümde (Resim 1.8).
Grade 4	Kumulus hücreleri yaygın ve azdır ve korona hücreleri dağınık olup bi miktar kaybedilmiş olabilir.



Resim 1.7: Kumulus korona değerlendirmesine göre Grade 1 oosit (70, 169).

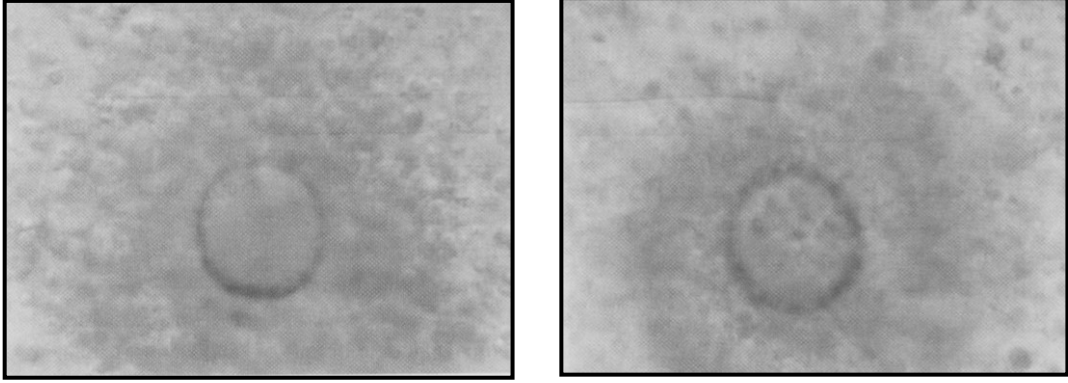


Resim 1.8: Grade 3 olarak tanımlanan iki kumulus korona kompleksi (70, 169).

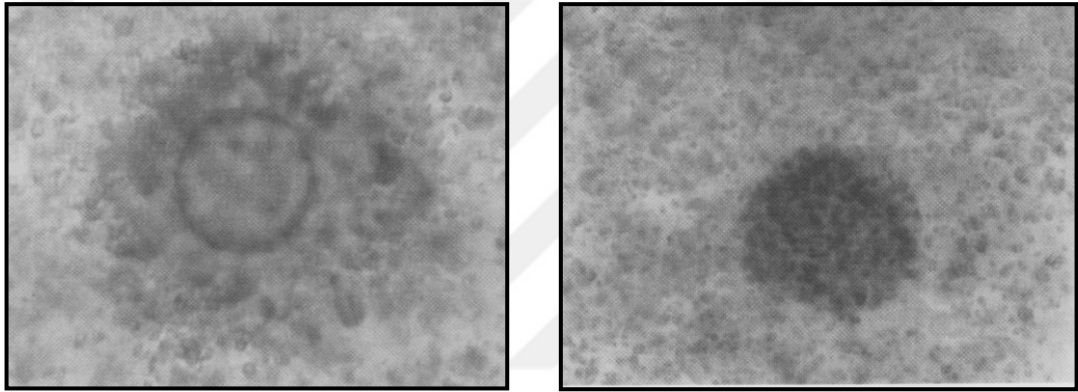
Klasik IVF de, oositlerin >%50 sinin Grade 3 olması halinde; gebelik oranında yüksek olarak bulunmuştur. Kumulus korona değerlendirilmesi konusunda yapılan yeni bir çalışmada ise oosit matürasyonu ooplazma, kumulus, korona ve granüloza hücreleriyle birlikte değerlendirilmiştir.

Tablo 1.3:

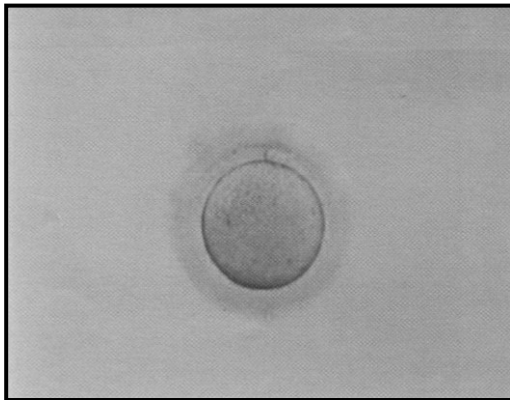
Oosit matürasyonunun çevre hücrelerle birlikte değerlendirilmesi	
Grade 1	(Matür veya preovulatuvar) Yaygın kumulus hücreleri, ışınsal biçimde yayılmış korona radiata, belirgin bir zona pellusida, şeffaf sitoplazma ve yaygın granüloza hücreleri içerirler (Resim 1.9).
Grade 2	(Hemen hemen matür) Geniş kumulus hücreleri, hafifçe kompakt korona radiata ve geniş granüloza hücrelerine sahiptirler.
Grade 3	(İmmatür) Eğer var ise koyu ve kompakt kumulus hücreleri, sıkıca bir araya gelmiş korona hücreleri, görülebilirse ooplazmada germinal vezikül ve kompakt, dağılmamış granüloza hücreleri vardır (Resim 1.10).
Grade 4	(Postmatür) Kümeler oluşturan ve iyice yaygınlaşmış kumulus hücreleri, genellikle kümelenmiş ışınsal dağılımlı korona radiata, irregüler ve görünebilen bir zona pellusida, hafifçe koyu ve granüler sitoplazma, küçük alana yayılmış granüloza hücreleri vardır.
Grade 5	(Atretik) Çok az kumulus hücresi ve eğer varsa irregüler dağılım gösteren korona radiata hücreleri, belirgin bir zona pellusida, koyu renkli ve genellikle irregüler olan ooplazma ve küçük gruplar halinde granüloza hüceleri ile karakteristiktir.



Resim 1.9: Lin'in sınıflamasına göre matür oositler (70, 169).



Resim1.10: İmmatür bir oosit çevresinde koyu kompakt görünümü ile korona kumulus kompleksi (A), Postmatür oosit (B) (70, 169).



Resim 1.11: Matür ve normal özelliklere sahip bir oosit (70, 169).

b) Oosit morfolojisinin 1. kutup cisimciğine göre sınıflandırılması

İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)'de oosit morfolojisini irdeleyen çalışmalarda 1. kutup cisimciğinin post-ovulatuvar oositlerin yaşını belirleyen bir indüktör olduğu bildirilmiş ve daha sonra da Ebner 2. kutup cisimciğinin morfolojik olarak beş farklı kategoride incelenebileceğini göstermiştir (70, 169) (Tablo 1.4).

Tablo 1.4:

Ebner'e göre (1999) 1. kutup cisimciği sınıflaması	
Grade 1	1. Kutup cisimciği yuvarlak veya oval ve intakttır.
Grade 2	1.Kutup cisimciği yuvarlak veya oval fakat yüzeyi düzensizdir.
Grade 3	1.Kutup cisimciği ikiden fazla fragman içerir.
Grade 4	1. Kutup cisimciği ikiye bölünmüştür.
Grade 5	Geniş previtellin aralıkta büyük bir 1. kutup cisimciği vardır.

Oositlerin Sınıflandırılması

IVF için kullanılacak oositlerin hangi asamada olduklarının bilinmesi çok önemlidir. Oositlere zarar vermeden incelemek için en uygun yöntem ışık mikroskobu ile incelemedir. Buradan elde edilen sonuçlar elektron mikroskobu bulgularıyla da paralellik göstermektedir. Bu sayede hem gerekli inkübasyon süresi belirlenmiş olur hem de spermlerle erken inseminasyon ile oluşabilecek maturasyon inhibisyonu

önlenebilir. Uygun hormonal uyarımla ovaryumdaki foliküllerden elde edilebilecek oositler şu şekilde sınıflandırılabilir (170).

- I. İmmatür / Profaz I (PI) / GV Oosit:** Korona radyata hücreleri çok kalın ve yoğundur. Korona radyatanın dışında kumulus hücreleri olmaz veya küçük ve yoğun olarak bulunur. GV ve belirgin nükleolus görülür. IVF öncesinde gereken inkübasyon süreleri uzundur (insanda 40–48 saat). Bu oositler henüz olgunlaşmamıştır.
- II. Ara / Metafaz I (MI) İmmatür Oosit:** Korona radyata sıkı ve yoğun, kumulus orta derecede yoğundur. Hem GV hem de I. Kutup cisimciği görülmez. Orta süreli inkübasyona ihtiyaç duyar (insanda 15–20 saat).
- III. Ara / Metafaz I (MI) Matür Oosit:** Korona radyata ışınsal ancak sıkidır. Kumulus geniş olup yer yer koyuluklar gözlenir. GV ve I. Kutup cisimciği görülmez. Previtellin aralık (oosit ile ZP arasındaki boşluk) seçilebilir.
- IV. Matür / Metafaz II (MII) Oosit:** iyi bir embriyo gelişimi ve gebelik oranı için oositlerin inseminasyon sırasında bu evrede olması gereklidir. Kumulus geniş ve gevşek, korona radyata ışınsaldır. Mikroskopta parlak olarak görülür. I. Kutup cisimciği seçilebilir. Kısa süreli (insanda 3–5 saat) inkübasyon önerilir.
- V. Hafif Post Matür Metafaz II (MII) Oosit:** Oldukça gevşek ve koyulaşan renklerde kumulus ile az sayıda korona radyata hücrelerine sahiptir. Az sayıda spermle fazla bekletilmeden inseminasyon yapılmalıdır.
- VI. Post (Sür) Matür Metafaz II (MII) Oosit:** Oosit çevresinde çok az hücre bulunur. I. kutup cisimciği gözlenebilir ancak koyu renklidir. Fertilizasyon ve embriyo gelişim oranları bu tip oositlerde düşük olur. Böyle oositler fertilizasyonda kullanılmaz veya bir saat içinde işlemleri yapılır.
- VII. Dejenere (Atretik) Oosit:** Mayoz bölünmenin herhangi bir evresinde olabilirler. I. Kutup cisimciği bile görülebilir ancak kumulus-korona hücrelerinin görünüşleri değişkendir. Kumulus hücreleri fragmente, oosit koyu renkte görülür (155).

1.9. İNFERTİLİTE VE OOSİT PROBLEMLERİ

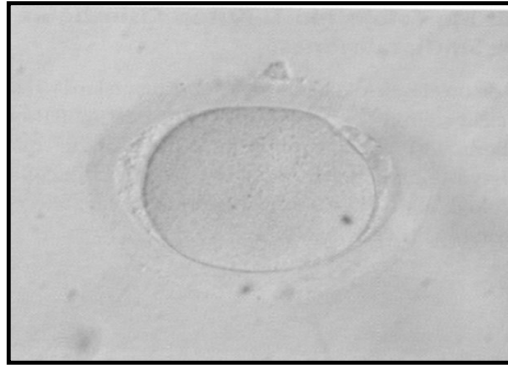
Oosit Dismorfizmi

Oositlerin çevrelerindeki kumulus korona hücrelerinin uzaklaştırılmasıyla iki farklı bölgede incelenmektedir(169).

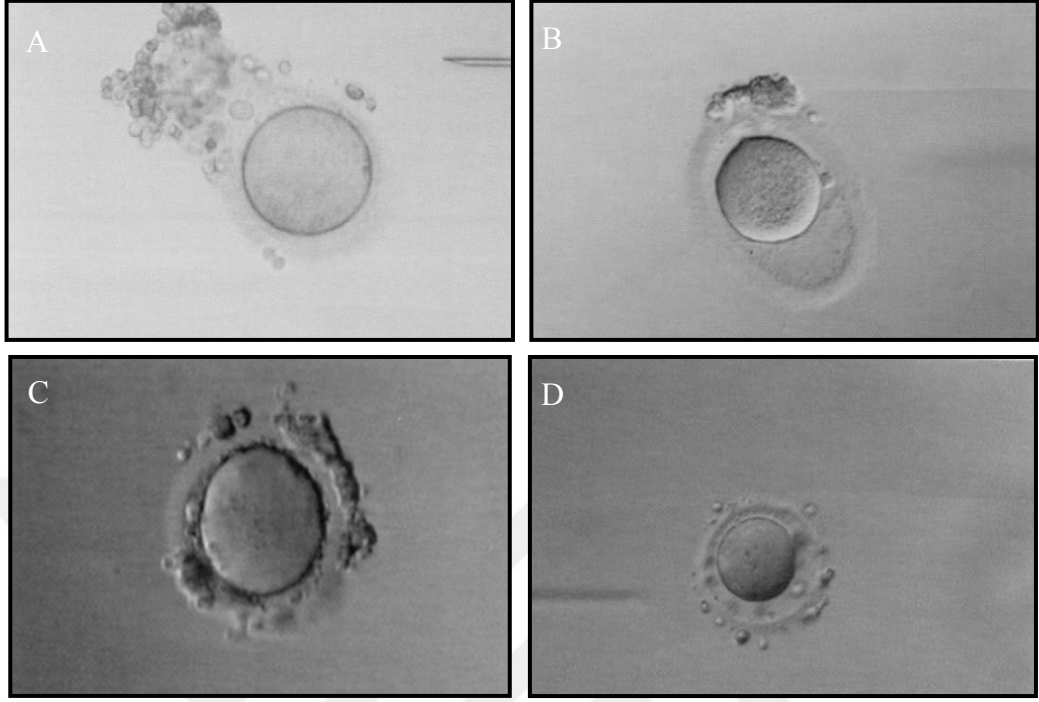
- Hücre dışı (ekstrasellüler)
- Hücre içi (intraseküler) olmak üzere iki farklı bölgede izlenebilir.

Hücre Dışı (Ekstrasellüler) Anomaliler

Zona pellusidada ve perivitellin alanda gözlenir. Ekstrasellüler anomaliler konusunda yapılan çalışmalardan birinde koyu zona pellusida (ZP), geniş perivitellin aralık (PVA) ve irregüler oosit şeklinin fertilizasyon ve embriyoner gelişimde etkili olmadığı, dolayısıyla bu özelliklere sahip oositlerin normal kabul edilebilecekleri ileri sürülmüştür (169) (Resim 1.12, 1.13).



Resim 1.12: Oval görünümlü ve kutup cisimciği fragmante bir oosit



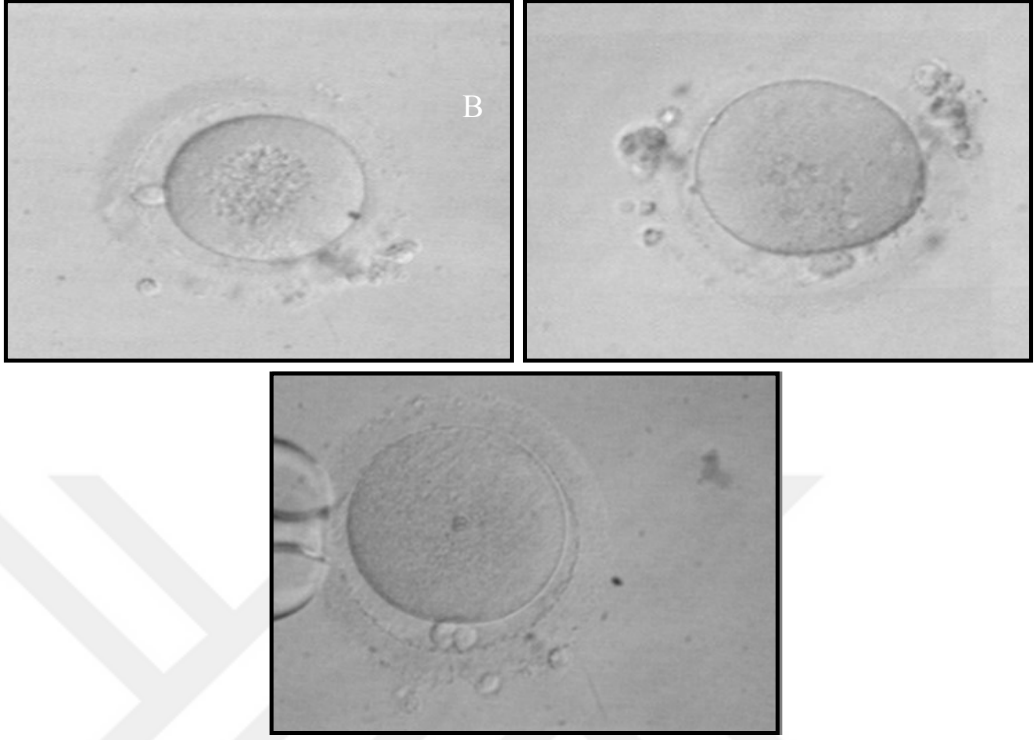
Resim 1.13: ZP anomalisi (A), PVA'nın geniş olduğu bir MII oosit (B), Perivitellin alan geniş ve granüler (C,D).

Perivitellin alandaki granülasyon da ekstrasitoplazmik anomali olarak kabul edilir ve genellikle gonadotropinlerin yüksek oranda kullanıldığı olgularda gözlenir(70, 169).

Sitoplazmik (intraselüler) Anomaliler

Oosit dismorfizmi olarak tanımlanan bu anomaliler; merkezi koyu ve granüler sitoplazma, refraktil cisimcikler, ayrı ayrı veya birlikte bulunan vakuollerdir.

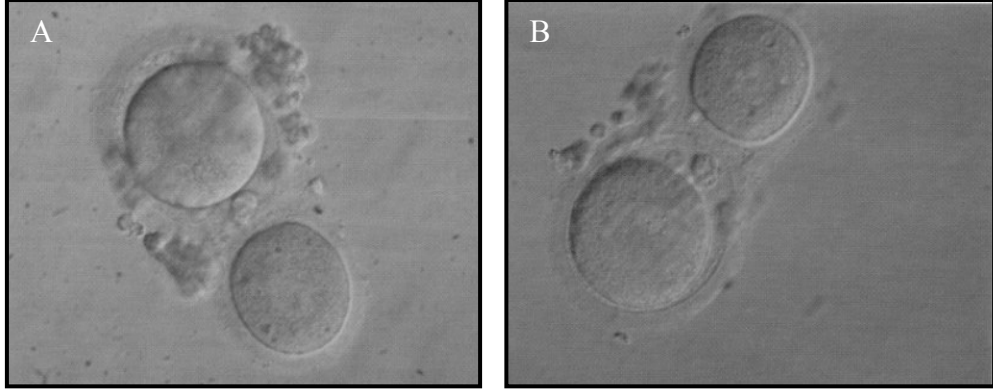
Oosit kalitesi gelişim kapasitesi hakkında bilgi veren bir başka parametrede sitoplazmik viskozitedir (Resim 1.14).



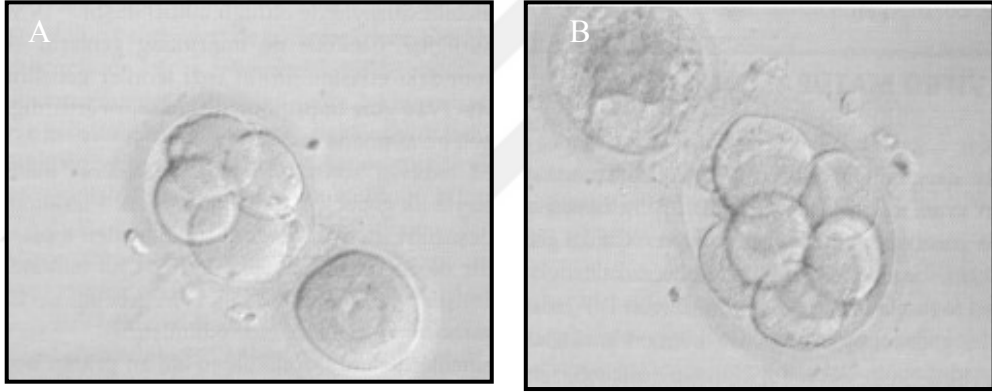
Resim 1.14: Sitoplazmasında merkezi koyu granüler yapılanma gösteren bir MII oosit (A), Sitoplazmasında küçük vokuoller bulunan MII oosit (B), Kutup cisimciği fragmente merkezinde refraktil cisimcik içeren bir oosit (C).

Binovüler Oosit

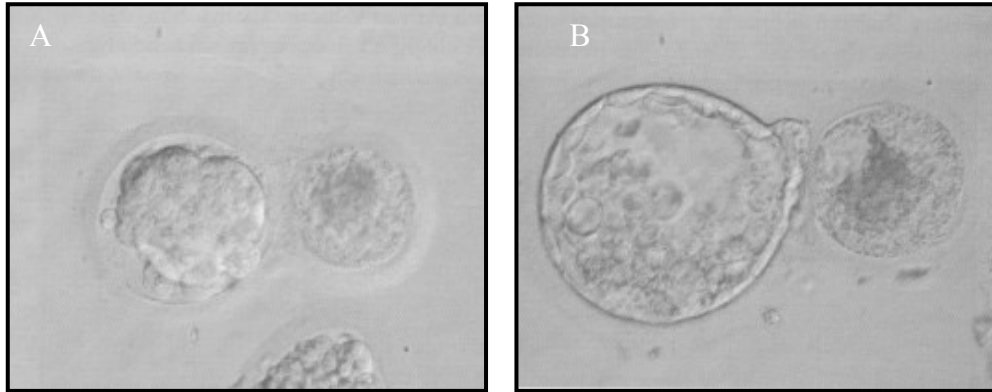
IVF uygulamalarında çok az olmakla birlikte binovüler oositlerle de karşılaşılabilir. Genellikle birinin immatür olduğu binovüler oositlerden matür olanı fertilize olarak blastosist evresine kadar gelişimini sürdürebilir (70, 169) (Resim 1.15, 1.16, 1.17).



Resim 1.15: Binovüler oosit (A), Fertilize olan binovüler oosit (B).



Resim 1.16: Binovüler embriyonun 2. ve 3. günlerdeki gelişimi (A, B).



Resim 1.17: Binovüler embriyonun 4. ve 5. günlerdeki gelişimi (A, B).

1.10. OOSİT MATURASYON YETMEZLİĞİ SENDROMU

İnfertil hastaların yaklaşık %8,6 -%15,2 sı en az bir mayotik bakımdan incompetent oosit üretir. Oositlerin %25'inden fazlası immature olduğunda başarılı fertilizasyon ve klinik gebelik oranı belirgin olarak azalır. Tesadüfi olarak gelişen immature oositlerin tekrarlayan oosit maturasyon yetmezliği sendromundan ayırt edilmesi önemlidir. Nadiren hiç matür oositin üretilmediği mutlak oosit maturasyon yetmezliği gözlenir. Bu olgularda gözlenen önemli özellikler; primer infertilite, tekrarlayan ekseriyetle immature oosit üretimi, IVM ile maturasyonun sağlanamaması ve ICSI'ye rağmen fertilizasyon başarısızlığı görülmesidir. Sendromun insidiansı bilinmemektedir (70, 171).

Sendromda tüm olgularda görülen temel özellik tekrarlayan immature oosit üretimine bağlı sterilitedir. Yapılan olgu sunumlarına bakıldığında stimulyasyon protokolünü değiştirmek, IVM veya ICSI sonuçları iyileştirmemektedir. Sınırlı verilere rağmen kanıtlar oosit maturasyonundaki aşikar bozukluğun oositin mayoz gelişiminin belirli evrelerinde duraklama ve takiben steriliteye yol açtığını düşündürmektedir.

Mayozun yeniden başlaması ve ilerlemesi mayotik kompetansın kazanılmasına bağlıdır. Mayoz yeniden başlamadan önce oosit gelişim fazında mRNA ve protein biriktirir ki bu mayozu tamamlaması için gereklidir. Mayotik gelişim kilit düzenleyici proteinlerin belirli kontrolü altındadır. Bu protein üretiminin düzenlenmesi, fosforilasyon, lokalizasyon ve degradasyon aracılığıyla başarılıdır. Kilit noktadaki herhangi bir değişim maturasyon yetmezliği ile sonuçlanır (70, 171).

İnsanlarda tekrarlayan oosit maturasyon yetmezliğinin sebepleri bilinmemektedir. Hayvan modellerinde kilit mayotik mediatörlerde değişiklikler, inhibitor veya stimulatörlerle birçok mayotik yetmezlik çeşidi oluşturulmuştur (70, 171).

a) Oosit maturasyon yetmezliği tip I: GV arrest

Diploten aşamasında duraklayan mayozun kaldığı yerden devam etmesi maturasyon promoting factorün (MPF) aktivasyonu yoluyla kontrol edilmektedir. Yapısal olarak birinci mayozun başlaması ve M fazına giriş germinal vezikülün bozulması (GVBD) ile karakterizedir. Oositlerin GV aşamasında arrest olduğu kadınlarda MPF aktivasyonundan sorumlu uyarı kaskadında bir defect söz konusudur (70, 171).

Oosit cAMP ekspresyonu regulasyonunun maturasyon için gerekli olduğu tespit edilmiştir. Oosit maturasyon arresti aşamasında artmış cAMP düzeyleri MPF inhibisyonuna yol açar. Mayoza yeniden girerken cAMP'de azalma MPF aktivasyonuna izin verir. Fosfodiesteraz 3A oosit cAMP hidrolizinden sorumludur ve bunun eksikliğinin olduğu dişi fareler tamamen infertildirler zira ovule oositlerde artmış cAMP düzeyleri mevcuttur ve GV aşamasında arrest olmuşlardır. Oositlerde moleküler analiz yapılamadığından tanımlanan faktörlerdeki aksaklıklar tam olarak ortaya konamamıştır (70, 171).

b) Oosit maturasyon yetmezliği tip 2: MI arrest

Birinci mayozdan metafaz II aşamasına geçişte sırasıyla kromozomlarda kondensasyon, metafaz iğcikleri oluşumu, kromozomların gruplaşması ve sonrasında homolog kromozomların seperasyon ve segregasyonu geręekleřmektedir. İlk mayoz bölünmenin tamamlanması ile ilk polar cisimcik oluşur. Birinci polar cisimcik oluşumundan evvel oosit arresti oluşması morfolojik olarak MI arresti olarak tanımlanır. MI arrestinin olası nedenleri uyarı aktarım yolunda veya mayotik iğciklerde anormalliklere bağlı olabilir. Bu fenotipte kendini iki formda gösterir; normal iğcik olanlar ve kromozomal aberrasyonlar (70, 171).

Mayozdaki metafaz I aşamasını kontrol eden kilit enzimler oldukça korunumludurlar metafaz II ve mitotik hücre siklusu aşamasında da benzer fonksiyonlar yaparlar. Dolayısıyla bu proteinlerde genetik eksiklik MI arrestinden ziyade embriyo kaybına yol açar. MI arrestinin klinik fenotipinden muhtemelen gen ve protein

ekspresyonunda oosite bağlı tahribat, oosit spesifik kompanzasyon veya kilit mediatörleri regüle eden protein ekspresyonunda bozulma sorumlu olabilir. Transkripsiyon faktörlerindeki oosit spesifik değişiklikler oosit spesifik maturasyon yetmezliğine katkıda bulunur. Bu aşamada epigenetic modifikasyonlar etkili olabilir (70, 171).

c) Oosit maturasyon yetmezliği tip 3: MII arrest

Morfolojik klasifikasyona göre MII matur ve fertilizasyon yeteneği olan bir oosit anlamına gelir. Halbuki bir grup kadında morfolojik olarak MII görünümünde olup klivaj ve hatta fertilizasyon göstermeyen oositler mevcuttur. Morfolojik maturite ve kapasite arasındaki bu uyuşmazlık durumunda polar cisim oluşumu ile MII aşaması arasında olan ama fertilizasyon yeteneği olmayan veya normalde MII olupta mayozu tamamlamayan olgular düşünölmelidir. Fertilizasyon defektlerinde de aynı tablo oluşur. Ancak bu iki durumun moleküler sebepleri ve olası terapötik yaklaşımları farklıdır (70, 171).

d) Oosit maturasyon yetmezliği tip 4: Mix arrest

Bazı hastalarda mayozun birden çok aşamasında arrest olmuş oositler görölmektedir. Mayozdaki kompanzatuvar mekanizmalarda yetersizlik durumlarında oluşur. Oositlerin mayotik kompetansı kazanması aşaması kilit regülatuar enzimler ve uyarım moleküllerinin transkripsiyonu ve translasyonunu kapsamaktadır. Bu faktörler arasındaki kompleks etkileşim, arrest veya gelişim kararı hedefe yönelik uyarı artışı veya azalışı arasındaki nazik bir dengeye dayanır. Bu noktada maturasyon arrestlerinde moleküler seviyede ki disfonksiyona bağlı olarak uyarım hataları veya kromozom iğciklerinde aberasyonlar sonucunda oositler mayozu tammlayamazlar (70, 171).

Günümüzde şiddetli oosit maturasyon defekti olan kadınlar için yegane seçenek donör oositi kullanmaktır. Gametlerin potansiyellerini değerlendiren klinik kriterler subjektiftir ve morfolojik karakteristiklere dayanır. Bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Gamet potansiyelinin belirlenmesinde moleküler araçların üretileceğine dair umutlar vardır. Oosit maturasyon yetmezliği sendromunun tanısı çiftleri birçok başarısız

denemenin emosyonel ve finansal sıkıntılarından kurtaracaktır. Çiftle yumurta bağışı veya evlat edinme seçenekleri tartışılabilir. Ayrıca, insanlarda oosit maturasyon mekanizmalarının anlaşılması vasıtasıyla, IVM protokollerinde oosit maturasyon kompetansı için gerekli olan uyarı sistemlerini geliştirmek mümkün olacaktır. Bu teknoloji yoluyla sadece oosit maturasyon defektli olguları değil aynı zamanda organizma dışında matur primordiyal folikülleri de tedavi etmek mümkün olabilecektir. Terapotik yaklaşımdan önce sendromun moleküler mekanizmalarını anlamaya önem verilmelidir (70, 171).



1.11. İN VİTRO MATURASYON (IVM)

Günümüzde yardımcı üreme tedavilerinde; gonadotropin salgılatıcı hormon analoglarının (GnRH-a), insan menopozal gonadotropini (HMG) veya saflaştırılmış FSH ile ovaryan stimülasyon tercih edilmektedir.

IVM tedavisi sonrası, immatür oositlerin matüre edilmesiyle ilk gebelik 1983 yılında Veeck tarafından gerçekleştirilirken, overler stimüle edilmeden toplanan immatür oositlerde ilk gebelik 1991 de Cha tarafından bildirilmiştir (70, 169).

IVM matürasyonunda rol oynayan faktörler;

a) **Kültür ortamları**

IVM amaçlı seçilen medium maturasyon sırasında oositin nüklear ve sitoplazmik gelişiminde optimal kültür koşullarını sağlamalıdır. Serum, gonadotropin (FSH ve LH) ve östradiol ilaveli doku kültür ortamı olarak TCM-199, Ham's F10; HEPES veya bikarbonat tamponlu Chang's mediumu bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Chang's mediumunda hayli yüksek oranda FCS bulunmaktadır. İnvitro matürasyon mediumlarında pirüvatın olmaması veya az olması halinde matürasyon yetersiz kalmakta, buna karşın sadece pirüvatın bulunması da oositlerde sitoplazmik matürasyonu yeterince uyaramamaktadır (70, 169).

b) **PH**

Kültür ortamının tümünün pH değeri önemlidir. IVM konusundaki bilgi birikiminin ışığında oositlerde spontan in vitro matürasyonu sağlayabilecek çeşitli mediumlar üretilmiştir. Kültür ortamının tümünün pH değeri oositin ve daha sonra gelişen embriyoner hücrelerin internal pH'sını etkileyeceği için önemlidir. Ancak invitro maturasyon sürecinde mayoz bölünmenin tamamlanması için internal pH'ın artışı söz konusudur ve oosit toplama prosedüründeki pH değişimleri oositlerin daha sonraki gelişimleri üzerinde etkili olmaktadır (70, 169).

c) Aminoasit ve Vitaminler

Kültür ortamında bulunan veya bulunması öngörülen bir başka molekül de aminoasitlerdir. Aminoasitler hücre içi tampon görevi görürler ve enerji kaynağıdır. Aminoasitler non-esansiyel aminoasitler ve esansiyel aminoasitler olmak üzere ikiye ayrılır. non esansiyel aminoasitler; erken dönem hücrel aktiviteyi destekler, blastosel formasyonunda etkilidir. Esansiyel aminoasitler; blastosist formasyonu, İCM’de hücrel artış, blastosist viabilitesinde artış gibi durumları destekler (169, 172).

IVM amaçlı üretilen mediumlara eklenen vitaminlerin olası yararı ve etkileri konusundaki bilgiler yetersizdir. Suda çözünen vitaminlerin etkisini inceleyen bir çalışmada, 1 hücreli hamster embriyolarının gelişiminde, tek veya birleşik halde protein içermeyen HECM-6 kültür mediumu tanımlanmıştır. Blastosist gelişiminde thiamine dışında diğer tüm tek vitaminler ve vitamin olmayan kontrol karşılaştırılarak Pantothenate önemli oranda stimüle edilir. Askorbik asit, biotin, choline, folik asit, inositol, niacinamide, pyridoxal, riboflavin ve thiamine morula/ blastosist formasyonu veya yarıklanma safhasındaki gelişimin inhibisyonu veya stimülasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Vitaminlerin kombinasyonu test edilmiş, embriyo gelişimi değişmiş yada kontrol ile arasında fark gözlenmiştir. Ama esas olarak Pantothenate’ın 3 µmol/l konsantrasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. Embriyo transferi sonrasında, yaşayan fetüslerin HECM-6 ilaveli pantothenateli bir hücreli embriyo kültüründe yaşam oranı yüzde 24 iken, yalnızca HECM-6’lı bir hücreli embriyo kültüründe yaşam oranı yüzde 11 olarak verilmiştir. Bu sonuçlar, herhangi bir memeli türlerinde, preimplantasyon embriyoların in vitro gelişiminde vitamininin uyarıcı etkisinin var olduğunu gösterilmiştir (173).

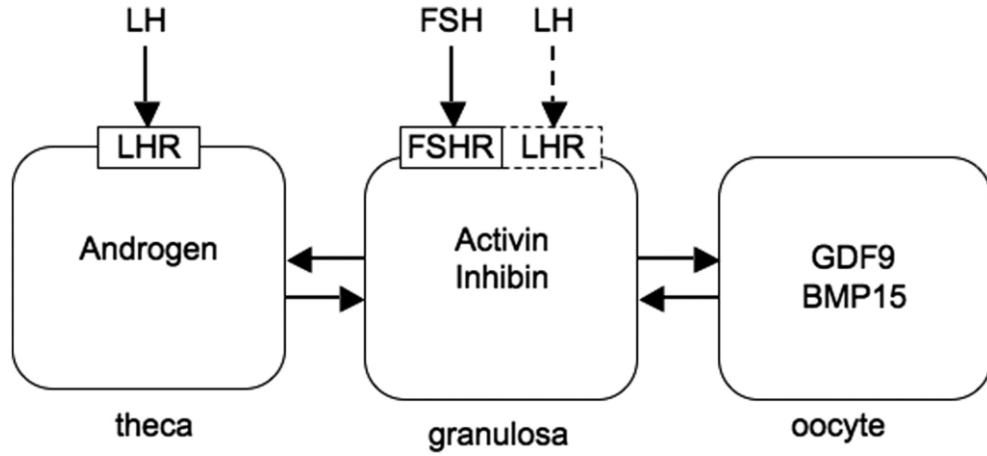
d) Fetal Buzağı Serum (Fetal Calf Serum-FCS)

Oosit matürasyonunda FCS, içerdiği büyüme faktörleri nedeniyle kullanılmaktadır. %10 FCS ve gonadotropin içeren TCM-199 mediumu ile in vitro oosit matürasyon sonucu gebelik ve ilk canlı doğum elde edilmiştir. FCS nin bilinen en önemli etkisi; oosit maturasyonu ve fertilizasyonunu desteklemesidir. Normalde fertilizasyon sırasında kortikal reaksiyon gerçekleşmekte ve bu da zona pellusidanın sertleşmesine neden olmaktadır. FCS ise içeriğinde bulunan ve fetuin olarak isimlendirilen protein sayesinde zona pellusidanın sertleşmesini inhibe ederek işlev görmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda rhesus maymunlarında fertilizasyon oranı FCS'den yoksun mediumlarda %10 iken bu oran FCS ilavesiyle % 20 ye kadar çıkarılabilinmiştir. Ancak ICSI nin kullanılmasıyla birlikte FCS nin rolü de sorgulanır olmuştur. ICSI sonrası in vitro matüre edilen oositlerde fertilizasyon oranı in vivo matüre edilen oositlerde fertilizasyon oranı in vivo matüre edilen oositlerdekine yakın olmasından dolayı FCSnin sadece klasik İVF uygulamalarında etkili olabileceği kabul edilmektedir (169).

e) Gonadotropinler

Günümüzde birçok İVM protokolünde mediuma FSH ve LH'ın ayrı ayrı veya birlikte ilave edilmesine rağmen; gonadotropinlerin oosit matürasyonu, fertilizasyon ve erken embriyoner gelişimdeki önemi ve etkisi halen tartışma konusudur. Gonadotropinler, ovaryum foliküllerinin büyümesi ve gelişmesi için gereklidir. Preovulatör gonadotropin artışı bloke edilir veya hipofizektomi sonrası serum gonadotropinleri azalır, foliküller atreziye maruz kalır (Şekil 40) (174, 175).

MAPK yolağı gonadotropinlerin etkisiyle mayozun tekrar ilerlemeye başlamasında, normal mayotik iğ düzenlenmesinde, asimetric sitokinezis gerçekleşmesinde, CSF artmasında, ikinci polar cismin atılmasında rol aldığı bilinmektedir (60, 103).



Şekil 41: Gonadotropinlerin (LH, FSH) oosit maturasyonu düzenlemesindeki fonksiyonunu gösteren şema (176).

İnfertilite tedavisinde 20. yüzyılın ilk yarısından itibaren bilinmektedir. Ovulasyon indüksiyonu için kullanılmaktadır. Spesifik monoklonal antikorların kullanıldığı yeni teknolojilerin gelişimi ile üriner FSH ve yüksek oranda saflaştırılmış FSH preparatları, ve ardından rekombinant teknolojinin kullanılması ile rekombinant FSH üretilmiştir (70).

Üriner hMG (idrar kaynaklı insan menopozal gonadotropin); hMG'deki LH aktivitesi esas olarak içindeki hCG komponentinden kaynaklanmaktadır. hMG ilk olarak anovuluar infertilite tanılı hastalarda ovulasyon indüksiyonu amacıyla kullanılırken, 1980'lerin başında, in vitro fertilizasyonun ilk zamanlarında, multifoliküler ovarian gelişimin stimülasyonunda önemli rol oynamıştır. Cook ve ark, hMG preparatlarının 5 farklı FSH izohormonu ve 9 LH tipi içerdiğini göstermişlerdir. hMG'nin major aktif ajanı olan folikül stimüle edici hormon (FSH) üriner gonadotropin içerisindeki lokal protein içeriğinin %5'inden azını oluşturur. Çeşitli hMG preparatlarında bulunan farklı proteinler arasında, tümör nekroze edici faktör bağlayıcı protein I, transferrin, ürokinaz, Tamm-Horsfall glikoproteini, epidermal büyüme faktörü ve immünoglobulin ilişkili proteinler yer alır. hMG preparatları nongonadotropin proteinlerle ilişkili immün reaksiyonlar sonucunda, ağrı ve allerjik

reaksiyonlar gibi lokal yan etkiler görülebilir. Herhangi bir zamanda ölçülen dolaşımdaki gonadotropin seviyeleri hipofizer salınım ve metabolik klirensi gösterir. İntravenöz enjeksiyon sonrası üriner FSH'nın yarı ömrü yaklaşık 2 saat olarak ölçülmüştür. intramuskuler enjeksiyonu sonrasında üriner FSH preparatlarının yarı ömrünün yaklaşık 35 saat olduğu tahmin edilmektedir (70).

Ürofolitropin (Üriner FSH), Yüksek Pürifiye FSH (uFSH-hp); Üriner FSH'nın halen üriner proteinler içeriyor olması, FSH'ya spesifik monoklonal antikörlerin kullanılması ile üretilen yüksek pürifiye (HP) üriner FSH preparatlarını gündeme getirdi. Pürifiye FSH elde edilmeye çalışılmasında ki asıl amaç, protein açısından daha saf bir ürün elde edilmesinden çok, artmış endojen serum LH düzeylerine sahip hastalarda yapılan ovulasyon indüksiyonunda, LH'nin eksojen uygulamasından kaçınılması esasına dayanmaktadır. Tek başına FSH'nın folikülogenezisi uyarabilmede yeterli olduğu da savunulmuştur (70).

Rekombinant İnsan FSH (rFSH)(Follitropin alfa / Follitropin beta); Aynı zamanda gonadotropin preparatlarındaki LH'nin artmış serum LH düzeyi olan hastalardaki komplikasyonlardan sorumlu olabileceği de ileri sürülmüştür. Üriner FSH'nın FSH içeriğinin aksine rekombinant FSH preparatları biyolojik aktivitelerinden çok protein içeriklerine (μg kütle) göre değerlendirilirler. Hem folitropin alfa, hem de folitropin beta'nın formulasyonu kütlelerine-göre-doldurulma (fill-by-mass) metoduna dayanmaktadır. Rekombinant FSH ürünlerinin uygulama şekilleri önceden hazırlanmış ya da ayarlanan dozda uygulama yapan kalem şeklinde araçlardan oluşur. r-hFSH, birçok klinik çalışmada ve meta-analizde u-FSH ile karşılaştırılmıştır (70).

Sonuçlarda toplanan oosit sayısı açısından r-hFSH'nın daha etkin olduğu ve meta-analizlerden IVF sikluslarında gebelik oranlarının daha fazla olduğu gösterilmiştir (70).

Rekombinant Lüteinizan Hormon (rLH); Normal folikül ve oosit gelişimi için gerekli LH düzeyi henüz net olarak tanımlanmamıştır. Ancak, foliküler LH reseptörlerinin %1 'inden az kısmının tutulması halinde dahi maksimal steroidojenik

cevap elde edilebilir. Bu durumda 1-10 IU/L düzeyindeki bazal LH seviyeleri teka hücrelerinde maksimal stimülasyon sağlamak için yeterli olacaktır. Aşırı LH maruziyeti foliküllerde atrezi, kötü oosit-embriyo kalitesi, endometrial matürasyonda bozulma, progesteron sentezinde artış, aromataz aktivitesinin baskılanması ve hücre gelişiminin inhibe edilmesine yol açabileceği ileri sürülmüştür. Diğer yandan LH fazlasının kötü oosit kalitesi ve embriyo kalitesine neden olduğu ya da foliküler atreziye yol açtığı eskiden kabul edilen bir görüş olup günümüzde bunu destekleyen yeterli kanıt bulunmamaktadır. Saf rekombinant insan LH (r-hLH) preparatının kullanıma girmesi over stimülasyonu protokollerinin yeniden gözden geçirilmesine neden oldu. LH'nın steroid biosentezini etkileyen birtakım intraovariyan mekanizmalar üzerinden etki ederek oosit matürasyonunu sağladığı düşünülmektedir. LH, estradiol ya da diğer bazı intraovariyan faktörler aracılığıyla oosit sitoplazmasında matürasyonu mitokondrial fonksiyonu artırarak ve/veya DNA onarım enzimlerini up-regüle ederek sağlıyor olabilir. Normal fizyolojide granuloza hücreleri, FSH stimülasyonu sonucunda folikül en az 11 mm çapa ulaştıktan sonra LH reseptörüne ihtiyaç gösterirler (70).

İnsan Koryonik Gonadotropik (hCG); Kontrollü over hiperstimülasyonu protokollerinde ovulasyonun en son tetiklenmesinde insan koryonik gonadotropini (hCG) kullanımı gündeme gelmiştir. Preovulatuvar foliküllerin varlığında hCG uygulaması; granuloza hücrelerinde luteinizasyona, estradiolden progesterona geçişe, mayozun başlamasına, oosit maturasyonuna ve 36-40 saat sonra folikül rüptürüne neden olur. Bu süreçler sadece folikül uygun boyutta ise ve LH reseptör durumuna göre granuloza ve teka hücre reseptivitesi uygun halde ise gerçekleşir. hCG plazma metabolik klirens oranı LH'dan daha yavaştır. hCG yarı ömrü daha uzundur. Dolaşımdaki yüksek östradiol seviyeleri rölatif olarak yüksek oranda implantasyon başarısızlıkları ve erken gebelik kayıplarına yol açabilir. hCG ile ilişkili bir diğer tartışmalı konu oosit maturasyonunu tetiklemek için gerekli minimal etkin hCG dozunun ne olacağıdır. 2000, 5000 ve 10000 IU üriner hCG (uhCG) ile yapılan çalışmalarda toplanan oosit sayısı açısından 5000 ve 10000 IU uygulananlar arasında fark saptanmamıştır. Ancak, 2000 IU uygulanan grupta diğer iki gruba oranla daha az sayıda oosit toplanmıştır. Rekombinant teknolojinin gelişmesi ile uhCG kadar etkili

rekombinant hCG (r hCG) klinik kullanıma girmiştir. 250 µg rhCG uygulamasının 5000 IU uhCG kadar etkin olduğu gösterilmiştir (70).

b) Sitokinler ve Büyüme Faktörlerinin etkisi

Sitokinler hücrel düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar. Şöyle ki; belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücrel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücrel reseptörlerine bağlanırlar. Diğer sitokinler daha lokalize olmuş etkiler gösterirler. Bunlar otokrin ve parakrin etkilerdir. Sitokinler başlıca 6 ana gruplara ayrılmaktadır:

- Büyüme faktörleri (Epidermal (EGF), Platelet orijinli (PDGF), insülin benzeri (IGF-1) büyüme faktörleri v.b.)
- Lenfokinler
- Koloni stimüle eden faktörler
- Transforme ediciler
- Tümör nekroz faktörleri
- Interferonlar

Sitokinlerin en önemli etkilerinden biri hücre bölünmesi ve farklılaşması üzerindedir. Hücreler belli faktörler tarafından gönderilen spesifik sinyaller sonucu bölünür. Bu faktörler büyüme faktörleri ve sitokinlerdir. Büyüme faktörleri hücre bölünmesi üzerinde pozitif etki gösterirken bazı sitokinlerin hücre bölünmesini engelleyici etkileri bilinmektedir. Belli bir hücrenin yüzeyinde mevcut olan reseptörler, bu hücrenin hangi faktörlere cevap vereceğini belirlerler (177).

i. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Büyüme faktörlerinden Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), fare, sıçan, insan oositlerinde in vitro matürasyonu stimüle ettiği gösterilmiştir (44). EGF'in tek başına veya gonadotropinlerle birlikte kumulus hücrelerinin genişlemesini sağladığı ve in vitro

kültürde immatür oositin nüklear ve sitoplazmik matürasyonuna ve kumulus genişlemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (44).

Henüz kanıtlanamamış olsa da EGF, granuloza hücrelerinden Steroid ve Folikül sıvısı kaynaklı mayoz aktive edici sterol (FF-MAS) salgılatarak oositi etkilemektedir. Ayrıca EGF aracılı sinyal mekanizması da mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) sistemini çalıştırarak gap junctionların yapıtaşı proteinleri yıkabilmektedir. EGF ile yapılmış pek çok çalışma literatürlere geçmiştir (44, 178, 179, 180).

Ovulasyon sırasında ve in vivo oosit maturasyonunda (İVV) epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri peptid sinyalinin etkisi ve fonksiyonu günümüzde karakterize edilmiştir ama bu yolak üzerinde oosit invitro maturasyonun etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir. D. Richani ve arkadaşlarının 2013’de yaptıkları bir çalışmada, üç EGF benzeri peptidin (amphiregulin, epiregulin ve betacellulin) ve onların IVV ve IVM karşılaştırması sırasında fare oosit kumulus hücrelerinde yaygın reseptörün gerçek fonksiyonunu ve ekspresyonunu test edilmiştir (181). Kumulus oosit kompleksleri (COCs) prepubertal farelerden ya 46 saat eCG sonrası (IVM) ya da 46 saat eCG sonrası artı 0,5-12 saat hCG sonrası (IVV) toplanıp, zamana dayalı olarak yapılan bu çalışmada, üç EGF benzeri peptidin mRNA ekspresyonunun ve IVM mediumu içerisindeki amphiregulin proteinin, yüksek derecede FSH desteği olan IVM nun IVV ye oranla önemli derecede azaldığı gösterilmiştir. IVM sırasında EGF benzeri peptid ekspresyon seviyelerinin ürünü olan EGF’in desteği, IVV ve amphiregulin/ epiregulin destekli IVM ile karşılaştırılabilir bulunmuştur. Bununla birlikte, COC EGFR nin EGF aktivasyonu, in vivo ya göre 3 ve 6 saatlik İVM önemli derecede azalmış olduğu bulunmuş ve FSH destekli IVM sırasında bunlar benzer şekilde gözlemlenmiştir. IVM sırasında eksojen epiregulin eklenmesi blastosist orasını önemli derecede arttırdığı bilinmektedir. Epiregulin ve amfiregulin FSH veya EGF ile karşılaştırıldığında, blastosist kalitesini arttırdı. Sonuç olarak, yapılan bu çalışmadan elde edilen bulgular, FSH ve EGF, gerekli olan EGF benzeri peptid sinyal kaskadının yetersiz yayılımını sağladığını IVM’a katkılarını gösterir. Bunun tersine, IVM sırasında epiregulin ve / veya amphiregulin kullanımının osit gelişim yeterliliğinin artmasında yol açtığı ve bu yüzden FSH veya EGF’e göre epiregulin ve/ amphiregulinin IVM’a katkıları tercih edildi (181).

ii. İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-I (insulin like growth factor-I - IGF-1)

IVM mediumuna eklenmesi düşünülen bir diğer büyüme faktöründe; insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-I (insulin like growth factor-I). IGF-I granüloza hücrelerinde mitotik aktiviteyi ve insan oositinde nükleer matürasyonu uyarır (180).

IGF-IGFBP ailesinin (IGF-I, IGF-II ve bağlayıcı proteinleri) foliküler gelişim üzerinde rol aldığı gösterilmesi, büyüme hormonunun (GH) infertilitede kullanılmasını gündeme getirmiştir. IGF-I, GH bağımlıdır ve FSH etkisinin güçlendirilmesinde rol alır. Yakın zamanda hGH reseptör mRNA'sının insan oositlerinde ve preimplantasyon embriyonik gelişimde yer aldığı gösterilmiştir. Foliküler sıvıda düşük hGH konsantrasyonları yarıklanma defekti ve kötü embriyo morfolojisi ile ilişkiliyken, kültür medyumuna hGH eklenmesinin immatür insan oositlerinin in vitro maturasyonunu iyileştirdiği gözlenmiştir. Erken dönemde yapılan çalışmaların bulguları hGH uygulanması ile foliküler cevapta ve gebelik oranlarında olumlu gelişmeler kaydedileceği şeklindeydi. Daha sonraları hGH kullanımının sadece hGH eksik kişilerde faydalı olabileceği gösterilmiştir (7).

iii. Koloni Stimüle Eden Faktör (Colony-stimulating factor-1)

Vücutta oldukça yaygın olarak bulunan makrofajlar üreme sistemi dokuları arasında da yer alırlar. Koloni stimüle eden faktör-1, aynı zamanda makrofaj koloni stimüle eden faktör olarak da bilinir. Overlerdeki makrofajların üretimini düzenleyen major faktördür. Farelerde, ratlarda ve insanlarda oositin gelişmesi sürecinde makrofajlar folikülün teka tabakasına doğru aktifleşirler. Bu yüzden ovulasyondan hemen önce en yüksek sayıya ulaşırlar. Makrofajlar ayrıca preovulatuvar folikülün kortikal yüzeyine de lokalize olarak burada hem folikül yırtılması işlemine hem de over duvarının prelüteal onarımına yardımcı olurlar. Koloni stimüle eden faktör-1 eksikliğinde overdeki gelişen foliküllerin hiçbiri aktifleşmez ve buradaki makrofaj sayısında belirgin bir şekilde azalma gözlenir. Farelerde ve insanlarda koloni stimüle

eden faktör-1 mRNA'sı folikül olgunlaştıkça granüloza hücrelerinde saptanabilir, insanlarda foliküler sıvıdaki koloni stimüle eden faktör-1 konsantrasyonu serumdan daha yüksektir. Koloni Stimüle eden faktör-1 makrofajlar için kemoatraktan (kimyasal çekim gücü)'dır. Bu nedenle folikülden sentezlenen koloni stimüle eden faktör-1'in gelişen makrofajları, folikül gelişmesiyle birlikte aktifleştirdiği görülmektedir (70, 82, 83).



1.12. AMAÇ

Embriyo oluşumu dişi ve erkek gametlerin fertilizasyonu ile başlar. Sperm ve oosit hücreleri embriyonik hayatta primordiyal germ hücrelerinden köken alırlar. Primordiyal germ hücreleri gelişimin 5.haftasında vitellüs kesesinden farklılaşarak testis veya ovaryumun geliyeceği farklılaşmamış gonadlara ulaşırlar. Göç sırasında ve gonadlara ulaştıklarında mitoz bölünme geçirirler ve erkekte pubertede başlayan spermatogenez, dişide ise embriyonik hayatta başlayan, doğum ile duraklayan ve puberte ile birlikte başlayan oogenezis ile gamet hücrelerinin farklılaşması tamamlanmış olur.

Oositler olgunlaşmaya doğumdan önce başlarlar. Bu sürece oogenezis adı verilir. Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaştığı anda oogonyumlara farklılaşırlar. 3.ayın sonunda geçirdikleri ardışık mitozlar ile hücre kümeleri oluşturarak foliküller meydana gelir. Oogonyumların çoğu mitoz bölünmeye devam eder, bir kısmı ise mayoz bölünmenin profaz I evresine gelip orada bekler. Burada primer oositlere farklılaşırlar. Gelişimin 5.ayında oogonyum sayısı maksimuma ulaşır. Sonra ise hücre ölümü başlar birçok oogonyum ve primer oosit atrezik hale gelir. Geride kalan primer oositlerin tümü mayoz bölünmenin profaz I evresine girerler ve primordiyal foliküller oluşur. Bu aşamadan sonra primer oositler diploten dönemine girerler ve mayoz bölünmelerini tamamlamadan puberteye kadar bu şekilde dinlenmede kalırlar. Bu dönem olgunlaşmayı önleyen OMI (oocyte maturation inhibitor) faktörü ile kontrol edilir.

Puberteye ulaşıldığında her menstrual siklusta değişen sayılarda primordiyal folikül 3 aşamadan geçerek olgunlaşır. İlk aşama primer(preantral)evre olup bu evrenin sonunda primer foliküller oluşur. İkinci evre ise sekonder(antral) evredir ve sonucunda sekonder foliküller oluşur. Sadece bir tane sekonder folikül olgunlaşır ve geri kalanlar atreziye uğrar. Bu gelişen sekonder folikül ise LH etkisi ile preovulator evreye yani üçüncü evreye girer. Bu aşamada 1.mayoz bölünme tamamlanır ve bölünmenin sonucunda oluşan hücrelerden biri 1.polar cisim diğeri de sekonder oositir. Sekonder oosit hemen 2.mayoz bölünmeye girer ve ovulasyondan 3 saat öncesinde metafaz II evresinde duraklar. Bu bölünme de ancak döllenme olduğu takdirde tamamlanır. Döllenme olmaz ise ovulasyondan sonraki 24 saat içinde dejenere olur.

Endometrium ile embriyo arasındaki etkileşimin en yüksek düzeyde olduğu dönemin embriyoların 4, 5 ya da 6.günü olması nedeniyle, hücre kültürü ortamında üretilen embriyoların transferinin bu dönemlerde yapılması daha avantajlı gibi görünmektedir. Bu süreyi uygun kültür ortamları ile sağlayabilmek ve kültür ortamındaki embriyo canlılığını koruyabilmek için, in vivo şartları mümkün olduğunca taklit edebilen kültür sistemlerine ihtiyaç vardır. Bu amaçlara yönelik IVF kültür mediumlarına ek olarak ko-kültür sistemleri de tercih edilebilmektedir.

Yardımcı Üreme Teknikleri uygulamalarında en çok çalışılan hücre grubu insan fallopian tüp hücreleri, maymun böbrek epitel hücreleri, bovine oviduktal epitel hücreleri, rahim içi hücre grubu (endometrial hücreler) ve oositlerin granuloza hücreleridir. Bu hücre gruplarının monolayer üremesi ile elde edilen ko-kültür sistemini oluşturan besleyici ve yardımcı hücreler mediumun içindeki toksik ve inhibitör etkisi gösteren maddeleri basal mediumdan uzaklaştırarak embriyo gelişimini stimule ederken, birçok embriyotrofik faktörleri ortama sağlarlar ve tüm bunlar embriyo kalitesini artırır. Fakat bu hücrelerin embriyo gelişimi üzerinde aynı zamanda birden fazla etkiye sahip olmasından dolayı, bu faktörlerin tanımlanması güçleşmiştir. Hâlihazırda embriyo kültürü için kullanılan ortamların içerikleri standart olmayıp, bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılan birçok ko-kültür çalışmalarında transfer edilen embriyoların gelişmiş bir inner cell mass (iç hücre kitlesi) yapısına sahip oldukları, yanı sıra, gebelik sonuçları ve gebeliğin devam ettirilme oranlarında anlamlı bir artış gözlenmiştir. İmplantasyon başarısızlığı olan oosit donasyon hastalarında, ko-kültür uygulamaları ile daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları da elde edilmiştir.

İnfertilite sebeplerinin kadına ait nedenleri arasında ovulasyon ve oosit kalitesine ait faktörlerde ön plandadır. Ovulasyon olmayan olgularda (anovulatuvar siklus) oosit gelişimine rağmen ovulasyon olamamaktadır. Fakat ovulasyonun olmasına rağmen oositin arreste kaldığı ve/veya fertilizasyonun gerçekleştiği bazı vakalarda ise oositin Metafaz II de arreste kalması gebelik oluşumunu engellemektedir. Özellikle infertilite olgularında ve oosit arrestine bağlı gebeliğin oluşmadığı durumlarda oositin arreste kalmasına neden olan etkenlerin belirlenmesi hem bu sebepten dolayı gebelik oluşmayan vakaların tedavisi gerçekleşmiş hem de infertilite sebebi için harcanan malzemelerin kullanımı da azalacağından ülke ekonomisine katkı sağlanabilir.

Çalışmamızda; Metafaz I ve Metafaz II döneminde elde edilen fare oositlerinin tubal sıvı ile kültür ortamının standart kültür ortamında mayozu kontrol eden faktörler açısından değerlendirilmesi ve eş zamanlı olarak ovarian foliküler döngüde aynı faktörlerin dağılımı ve apoptoz ile ilişkisinin incelenmesi amaçlandı.



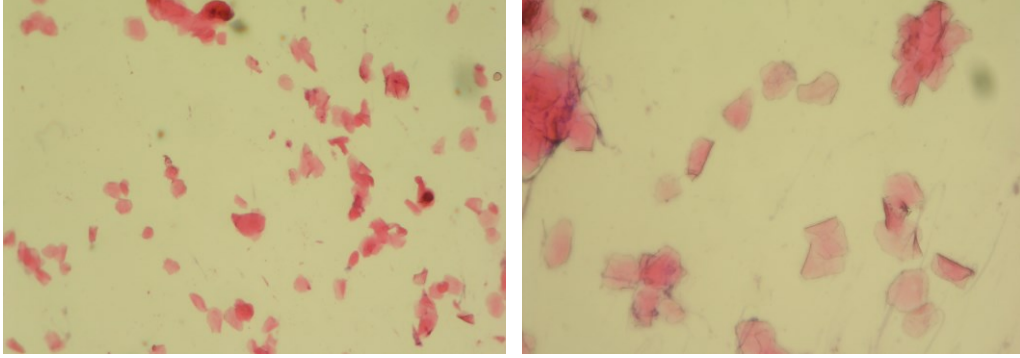
2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezleri (TİCAM) tarafından 26.07.2012 tarihinde yapılmış toplantı sonucunda 283 Sayılı etik kurul onayı ve 2012/096 numaralı CBÜ BAP no proje ile desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

2.1. Örneklerin Eldesi

2.1.1. Oosit Eldesi

Çalışmamızın amacına uygun olarak toplam 30 adet Bulb/C tipi dişi fare çalışma gruplarına uygun olarak rastgele gruplandırıldı. Fareler 6-8 haftalık olup, ağırlıkları 25-30 gr arası idi. Fareler gruplara uygun ayrı kafeslerde deneye başlamadan önce 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüde tutularak oogenez siklik değişiklikleri kontrol altına alındı. Denekler 1 haftalık süreç sonunda her bir gruptaki farelerin menstrual siklusu vaginal smear ile tespit edildi. Smear fırçası ile vajinal sıvı alınarak lama ince yayma yapılan örnekler % 70'lik alkolde 15 dakika tespit edildi. Daha sonra örnekler %60 lık alkolden 2'şer dakika geçirildikten sonra suda 5 dakika boyunca yıkandı. Örneklerle Çekirdek ve sitoplazmayı ayırt edebilmek için, hematoksilin ve eozin boyaması yapıldı. 5 dakika hematoksilin ile boyama sonrası tekrar 5 dakika boyunca suda yıkandı. Ardından sitoplazmayı boyamak için Eosin ile 2 dakika boyandıktan sonra 5 dakika suda yıkandı. Örnekler direk ışık mikroskobu (Olympus BX 40) altında incelendi. Örneklerde hücreler tek tek ayrılmış büyümüş ve çekirdeksiz olduğu belirlenmesi üzerine östroz dönemi olarak kabul edildi (Resim 2.1). Östroz döneminde olmayanların çekirdekleri çok net olarak ayırt edilmekte idi.



Resim 2.1: Vajinal smear HE boyaması. Çekirdeksiz ve büyük hücreler menstruel siklusun östroz dönemini göstermektedir. X400

Östroz evresinde olan fareler grup Mayoz I grubu için kullanıldı. Fareler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildikten sonra ovaryum dokuları (Resim 2.2.A, B) 37°C de ısıtılmış steril fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline-PBS) (02-020-1A, Biological industries) içerisinde yıkandıktan sonra (Resim 2.2. C) oosit kültür vasatı (M2 medium, M7167, Sigma Aldrich) içerisine alındı (Resim 2.2.D). Ovaryum dokusu içerisinden folüküller steril insülin enjektörü ucu yardımı ile mekanik olarak ayrıştırılması sağlandı (Resim2.2.D) ve Mayoz I evresinde saptanan oositler ağız pipeti yardımı ile toplandı (Resim2.2.E). Profaz safhasında olan oositler deneye alınmadı.



Resim 2.2: Oosit Eldesi. Servikal dislokasyonla sakrifiye edilen fare ovariyumu intraperitoneal olarak bulunduktan sonra (A), tuba uterina ile birlikte çıkarıldı (B, C). Ovaryum dokusu steril PBS içine alındı (C). Yıkanan oositler oosit kültür vasatı içinde enektör iğne ucu yardımıyla foliküllerin patlatılması sağlanarak (D) oositler ağız pipetiyle toplandı (E) ve oosit kültür vasatına alınarak inkübatörde kültüre edilmek üzere alındı (F).

Mayoz II evresinde oosit elde edilebilmesi amacı için, vaginal smear ile test sonrasında östroz evresinde olan 5 adet dişi fareye 5 IU FSH (9002-61-3, Sigma Aldrich) intraperitoneal olarak uygulandı. FSH uygulamasından 48 saat sonra denekler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildikten sonra ovaryum dokuları 37°C de ısıtılmış steril PBS içerisinde yıkandıktan sonra oosit kültür vasatı içerisinde alındı. Ovaryum dokusu içerisinde foliküller steril ppd enjektörü ucu yardımı ile mekanik olarak ayrıştırılması sağlandı. Folikül hücreleri oositlerin etrafından ppd enjektörü ucu ile temizlendikten sonra, oositler ağız pipeti yardımı ile toplandı. Oositlerin mayoz evresi dönemi inverted mikroskop altında tespit edildikten sonra Metafaz II evresinde olan oositler toplandı, metafaz I veya Profaz safhasında olan oositler çalışmaya alınmadı.

2.1.2. Ovaryum Dokusu Eldesi

Aynı gün 4 adet 25-30 gr ağırlığında 6-8 haftalık dişi fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Ovaryumları alınarak %10 luk formaldehit içerisinde en az 12-48 saat tespit edildi. Tespit edilen ovaryum örnekleri, tespit solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30' ar dakika % 60' dan % 80' e artan etil alkol serilerinden geçirilecek. % 95 alkol içerisinde 1' er saat iki değişim sağlanarak tutulan örnekler 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1' er saat iki değişim ksilene tabi tutuldu. 1:1 ksilen:parafin içerisinde 30 dakika 60° C' lik etüvde tutulan örnekler birer saat 2 değişim parafin ile immersiyou sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafin içerisinde gömüldü (Tablo 2.1). Mikrotom ile alınan 5 µm' lik kesitlere histokimyasal inceleme için hematoksilin-eozin ve immunohistokimyasal inceleme için indirek immunohistokimya boyaması yapıldı.

Tablo 2.1: Parafin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	24- 48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	30 dakika
	% 70 etil alkol	30 dakika
	% 80 etil alkol	30 dakika
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 etil alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen-Alkol	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Emdirme 60° C etüvde	Ksilen-Parafin	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

2.2. Oosit Kültürü

Metafaz I ve Metafaz II evrelerinde toplanan oositler 2'şer gruba ayrıldı. Her bir gruptaki oositler kumulus hücrelerinden mekanik olarak pipetleme ile temizlendikten sonra kültür ortamına alındı.

Gruplar:

Grup 1: Metafaz I Oosit kültürü

Grup 2: Metafaz I Oosit kültürü + tubal sıvı ilaveli

Grup 1: Metafaz II Oosit kültürü

Grup 2: Metafaz II Oosit kültürü + tubal sıvı ilaveli

Oosit kültürü için her bir oosit ayrı ayrı olarak 20 µL kültür vasatı içinde olacak şekilde 25 cm lik kültür kabında kültüre edildi. Oluşturulan damlalar üzerine 5 ml steril mineral oil (BP2629-1, FISHER) ilave edildi. Tubal sıvı içeren kültür ortamı için ise,1:1 oranında tubal sıvı: oosit kültür vasatı olacak şekilde hazırlandı. Tüm grupta yer alan oositler eş zamanlı olarak toplandı ve 37 °C de % 5 CO₂ ve hava ortamında 8 saat kültüre edildi. Kültür sonunda tüm gruplardaki oositler toplanarak bir kısmı whole mount immunohistokimya bir kısmı ise TUNEL boyaması için kullanılmak üzere %4 paraformaldehit ile 30 dk tespit edildi.

2.3. Oositlerin Whole Mount İmmunohistokimyası

Kültürün 48. saatinde oositler toplanarak %4 lük paraformaldehit ile tespit edildi. Toplam 4 grup oosit örneklerinde whole mount immunohistokimyasal analiz yöntemi ile anti-siklin B, anti-MPF, anti- Emi ve anti-MOS dağılımları incelendi (Tablo 2.2).

Whole-mount immunohistokimya boyaması için öncelikle zona uzaklaştırma işlemi uygulandı. Bunun için hazırlanan Asit Tyroide'te 30 dk bekletildi. Zona pellusidasından ayrılmış oositler daha sonra %4'lük paraformaldehit fiksatif ile 30 dakika tespit edildi. Ardından oositler PBS ile 3 defa 10'ar dakika yıkandı. Permeabilizasyon için oositler hücreler %0,1 Triton-X 100 (BP151-100, FISHER) ile 15 dk buz üstünde inkübe edildikten sonra, PBS ile 10 dk yıkandı ve 1 gece bloklama solüsyonu (DAB500, Millipore) ile inkübe edildi. Oositler yıkama yapılmadan ertesi sabah anti-siklin B (PC133-100UL, Millipore) anti-MOS (ab99017, Abcam) anti- Emi (ab-18341, Abcam) ve anti-MPF (ab134109, Abcam) birincil antikorları ilavesi yapıldı ve 24 saat inkübasyondan sonra 2 defa PBS ile yıkandı. Örnekler Siklin B için anti-Mouse FITC ikincil antikor ile, Emi, MOS ve MPF için anti rabbit FITC ikincil antikor ile 1 gece +4°de karanlık ortamda inkübe edildi. 2 defa PBS ile yıkama işleminden sonra örnekler kapatma mediumu (K002, DBS, California, USA kapatıldı ve flouresan mikroskobu (Olympus BX 40, Tokyo, Japan) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 2.2: Oositler için Whole İmmunohistokimya

İşlem	Madde	Süre
Fikse etme	Paraformaldehit	30 dakika
Yıkama	PBS	2x5
Zona eritme işlemi	Asit tyroide	30dakika
Yıkama	PBS	2x5
Permeabilizasyon işlemi	Triton x-100	15 dk buz üstünde
Bloklama	Normal serum goat	1 gece +4 °C
Antikor ile inkübasyon	Anti MOS, Anti Siklin B1, Anti MPF, Anti Emi	6 saat
Sekonder Antikor ile inkübasyon	Anti Rabbit, Anti Mouse FITC	1 gece, karanlık, +4
Yıkama	PBS	2x5 dakika
Kapama	Floraslan mounting medium +DAPI	

2.4. Oositlerde TUNEL Boyaması

Metafaz I ve Metafaz II evrelerinde toplanan 4 gruba ait oositler kültürün 48. saatinde toplanarak %4 lük paraformaldehit ile yarım saat oda sıcaklığında tespit edildi, iki kez PBS ile yıkandı ve 10 dakika H₂O₂ (TA-015-HP, Lab vision, Fremont, CA) solüsyonunda bırakıldı. PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 10 dakika 0.01% Triton X-100 de permeabilize edildi. Permeabilize olmuş oositler PBS de iki kez PBS ile yıkandı. Tamponlama için 10 saniye equilibrium buffer (90416, Millipore) da tutuldu. Oositler 37 °C’de 1 saat TDT (90418, Millipore) enzim solüsyonuna transfer edildi ve cover slip (90421, Millipore) ile kapatıldı. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında stop wash uygulandı (90419, Millipore) oositler daha sonra 3 kez PBS de yıkandı ve 30 dakika boyunca Antidigoxigenin (90420, Millipore) ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında

tutuldu. PBS ile 3 kez yıkama işleminden sonra örnekler. 3-6 dakika boyunca DAB (90423, Millipore) ile boyadı. Oositler daha sonra distile su ile 5dk yıkandıktan sonra lam üzerine transfer edildi ve mounting medium ile kapatıldı. Boyanan oositler ışık mikroskopunda (Olympus BX 40, Tokyo, Japonya) incelendi (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Oositlerde TUNEL Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Fikse etmek	Paraformaldehit	30 dakika
Yıkama	PBS	2x5
	H ₂ O ₂	10 dakika
Yıkama	PBS	2x5
Permeabilizasyon	Triton x-100	10 dakika
Yıkama	PBS	2x5
Tamponlama	Equilibration buffer	10 saniye
Primer antikor	TDT enzim solüsyonu	37 °C’de 1 saat
	Stop wash	10 dk oda sıcaklığı
Yıkama	PBS	3x1 dakika
	Antidigoxigenin	30 dk oda sıcaklığı
Yıkama	PBS	3x1 dakika
Boyama	DAB	3-6 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Kapama	Mounting medium	

2.5. Ovaryumların Hematoksilen-Eozin Boyaması

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm’ lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C’ lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30’ ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95’ den % 60’ a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı.

Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dk. boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk. akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dk. akar su altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dk. eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk. akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla % 80 ve % 95' lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 2.4).

Tablo 2.4 : Hematoksilen-Eozin Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen I	30 dakika
	Ksilen II	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	1 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
	% 80 alkol	1 dakika
	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

2.6. Ovaryumların İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi

Alınan ovaryum kesitleri immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95' ten % 60' a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. İmmunohistokimya kalemi (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan kesitler % 0,5' lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutuldu. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk. % 3' lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika bloklama solüsyonu (DAB500, Millipore) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar anti-siklin B (PC133-100UL, Millipore), anti-EMİ (ab-18341,Abcam), anti-MOS (ab99017,Abcam) ve anti-MPF (ab134109,Abcam) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse-rabbit biotinlenmiş ikincil antikor ve ardındanstreptavidin hidrojen peroksidaz ile (DAB500, Millipore) ile 30' ar dakika boyandı. Bu iki boyama arasında ve son inkübasyondan sonra kesitler 3 defa 5 dk PBS ile yıkandı. İmmunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla kesitler diaminobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (W01030707, DDK) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 2.5).

Tablo 2.5: İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	anti-siklin B, anti- Emi, anti-MOS ve anti-MPF	1 gece, +4°de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayers hematoksilen	5 dakika
Dehidratasyon	%80- %90'lık alkol serileri	2 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dakika
Kapama	Entellan	

2.7. İmmunohistokimya verilerin değerlendirilmesi

Ovaryum kesitlerinde, anti-Emi, anti-MOS, anti-Siklin B ve anti-MPF'nin primer antikoları ile indirek immünohistokimyasal yöntemle değerlendirme yapıldı ve kesitlerdeki immünoreaktivite şiddetleri -/+ (minimal), + (hafif), ++ (orta), +++ (şiddetli) ve çok şiddetli (++++) olarak yarı-kantitatif yöntemle skorlandı. Elde edilen yoğunluklar GraphPad programı ile ANOVA istatistik yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama±standart sapma (mean±SD) olarak verildi. P değeri > 0.05 istatistiksel olarak anlamsız olarak kabul edildi.

2.8. Ovaryum TUNEL Boyaması

Bu teknik için Dead-End Colorimetric TUNEL system kiti (S7101, ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit from EMD 40 assays, Millipore) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60°C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dk iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak fosfat tampon solüsyonunda (PBS: Posphate buffer solution) 5 dk yıkandı. Daha sonra oda sıcaklığında 15 dk 20 µg/ml proteinaz K (217782, Promega) ile inkübe edilen kesitler 3 defa 5' er dk PBS ile yıkandı. Endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (TA-015-HP, Lab vision, Fremont, CA) uygulanan kesitler PBS ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkandı. Daha sonra PBS ile 3 defa 5' er dk yıkandı. Equilibration tampon solusyonu (90416, Millipore) ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilen kesitler, TdT enzimi (90418, Millipore) ile 37 °C de 1 saat bekletildi. Kontrol boyama kesitleri TdT enzimi konmayıp, sadece reaksiyon solusyonunda bekletildi. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında 10 dakika stop wash yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra 3 defa 5' er dk PBS ile yıkanan kesitlere Anti-digoxigenin konjugat solüsyonu (katalog no, firma) ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler 4 defa 5'er dakıda PBS ile yıkandı. TUNEL reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacı ile kesitler 5 dakika diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan kesitler %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dk ksilen ile

şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. TUNEL pozitif hücre sayımı iki histolog tarafından ayrı zamanlarda her bir denkten alınan kesitlerde en az 5 farklı alanda boyalı ve boyanmayan hücreler belirlenerek değerlendirme yapıldı (Tablo 2.6).

Tablo 2.6: Ovaryum TUNEL Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Enzim	Proteinaz K	15 dakika
Yıkama	Distile	2x2 dakika
	H2O2	5 dk oda sıcaklığı
Yıkama	PBS	2x5 dakika
	Equilibration buffer	30 dakika
	TDT	37 °C 1 saat
	Stop washing	10 dk oda sıcaklığı
Yıkama	PBS	3x1 dakika
	Antidiogoxigenin conjugate	30 dk oda sıcaklığı
Yıkama	PBS	4x2 dakika
Boyama	DAB	3-6 dakika
Yıkama	Distile su	3x1 dakika

Boyama	Mayer's Hematoksilen	1 dakika
Alkol serileri	80-90	1 dakika
	Ksilen	30 dakika
Kapama	Entellan	



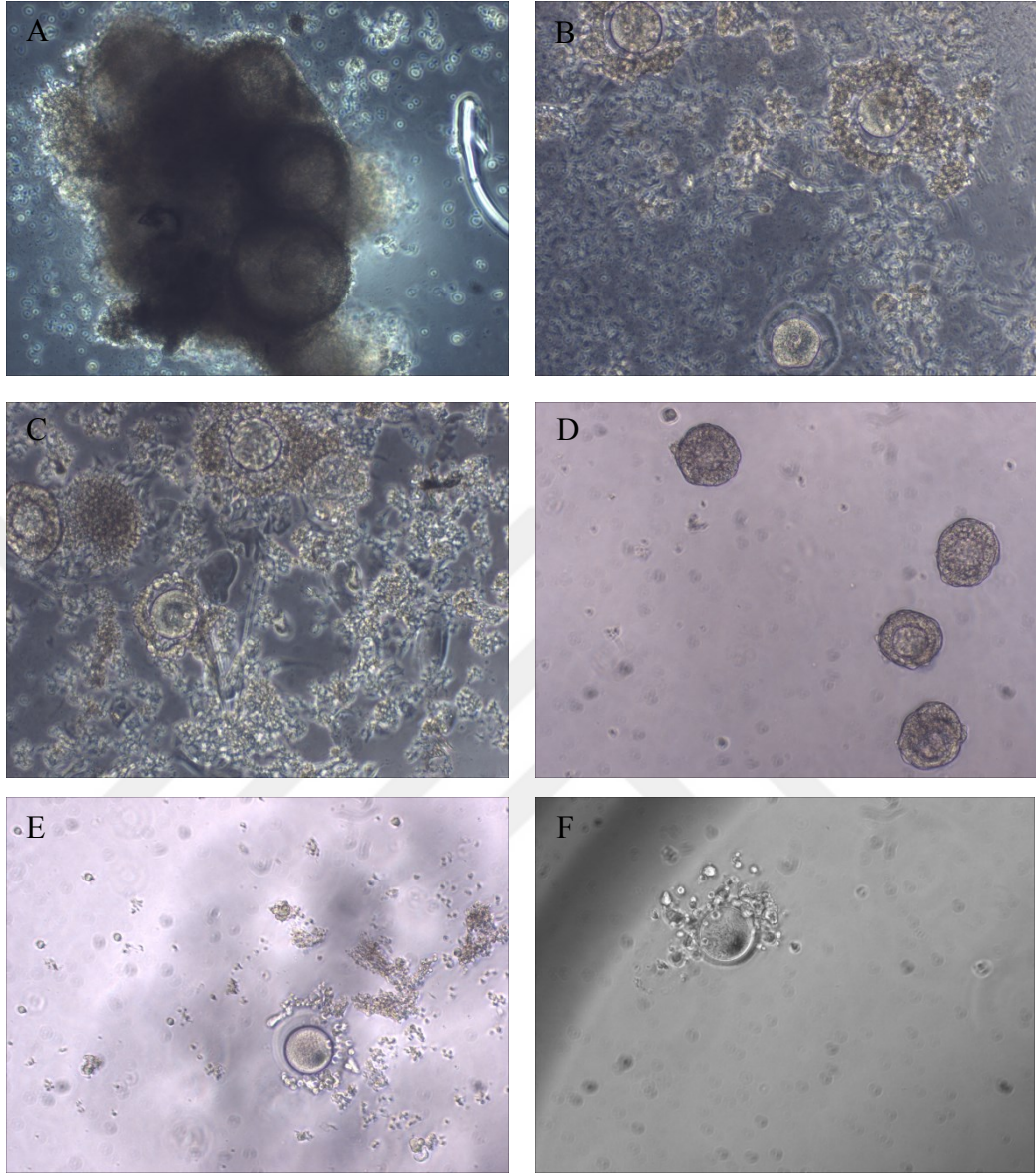
3. BULGULAR

3.1. Oosit Kùltür Sonuçları

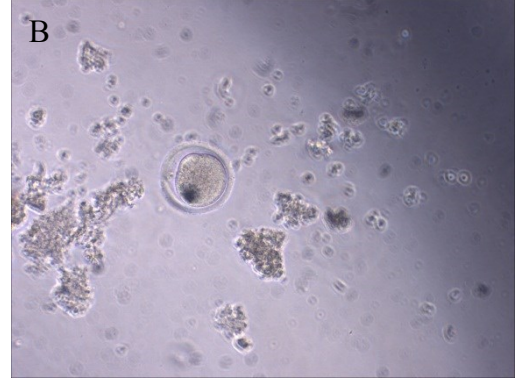
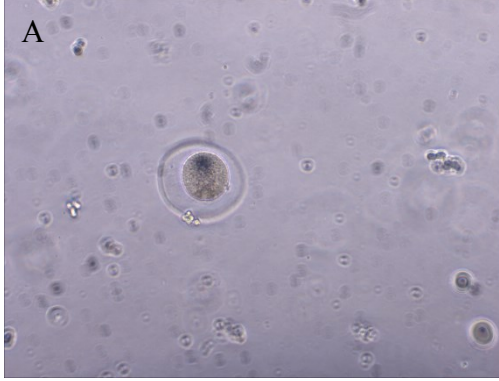
3.1.1. Makroskobik Bulgular

Metafaz I aşamasında oosit eldesi için östroz dönemindeki farelerden elde edilen ovaryum dokuları protokole uygun olarak kùltür ortamına alındıktan sonra diseksiyon mikroskobu altında incelendiğinde, ovaryum dokusunda foliküller kolaylıkla seçilebiliyordu (Resim 3.1.A). Ovaryum dokusundan foliküller elde edildiğinde ise mayoz I evresinde profaz I ve metafaz I evresinde oositler olduğu görüldü (Resim 3.1.B). Profaz I evresindeki oositler diseksiyon mikroskobu altında incelendiğinde geniş kumulus korona radiata kompleksi, belirgin bir zona tabakası ve oositin merkezinde ayırt edilebilen germinal vezikül (GV) sahip olmasıyla ayırt edilir iken (Resim 3.1.B), Metafaz I evresindeki oositler, ışınsal tarzda kumulus tabakası ve zonanın etrafında çevrelenmiş korona radiata hücreleri, belirgin bir zona pellusida tabakası ile oositin etrafını çevreleyen oolemma ayırt edildi. (Resim3.1.E, F). Bu grupta elde edilen profaz I oositler değerlendirme dışı tutuldu.

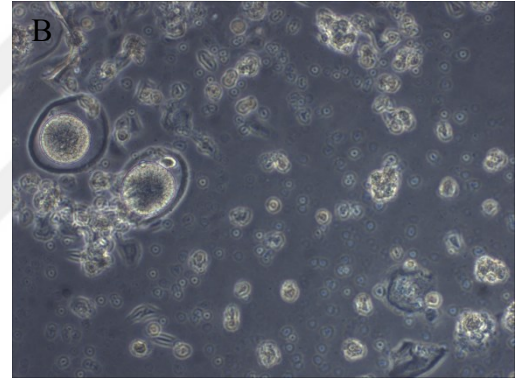
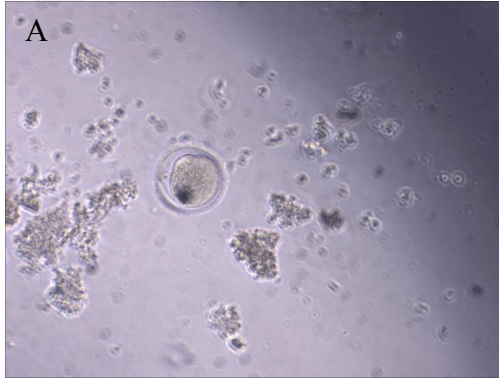
Metafaz II aşamasındaki oosit eldesi için östroz dönemindeki farelere intraperitoneal FSH uygulanmasından 48 saat sonra deneklerden ovaryum dokuları protokole uygun olarak kùltür ortamına alındıktan sonra diseksiyon mikroskobu altında incelendiğinde, ovaryum dokusunda foliküllerin sayıca çok olduğu ve ovaryum dokusunun foliküller ile dolu olduğu görüldü. Ovaryum dokusundan foliküller elde edildiğinde metafaz II dönemine ait oositlerin daha fazla olduğu, bununla beraber sayıca daha az profaz I ve metafaz I dönemine ait oositler seçilmekteydi. (Resim 3.3.A, B). Metafaz II evresindeki oositin granüllü sitoplazmaya sahip olduğu, zona pellusidasının şeffaf olarak kolaylıkla ayırt edilebildiği, 1. Polar cisimciğin oolemma ile zona tabakası arasındaki perivitellin aralığa atmış olduğu izlendi (Resim 3.3.B). Bu grupta elde edilen Metafaz I ve Profaz I evresindeki oositler değerlendirilmeye alınmadı.



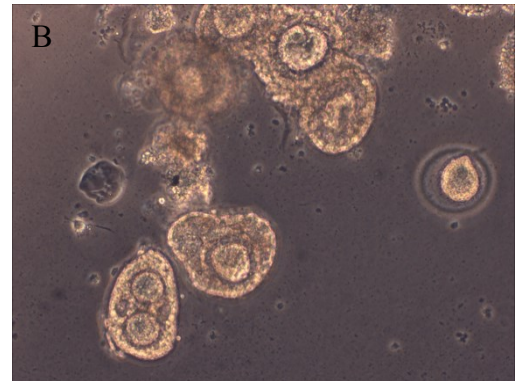
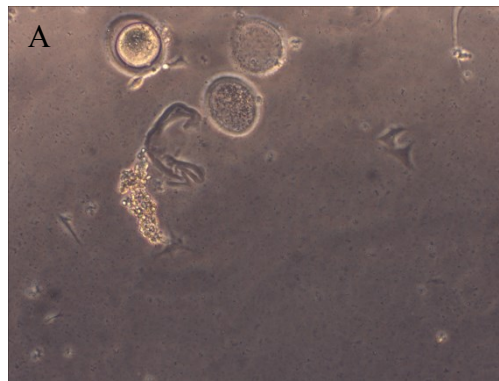
Resim 3.1: Mayoz I dönemi için oositler. Fareden direk alınan ovaryum dokusu içinde foliküller kültür ortamında görülmekte (A), Profaz 1 ve Metafaz I oositler (B), Profaz 1 oositte GV ayırt edilmekte (C), Profaz 1 oositler (D), Metafaz I aşamasında oosit (E, F). X400



Resim 3.2: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında Metafaz I oosit (A), 1. Polar cisimciği atmak üzere olan Metafaz I oosit (B). X400

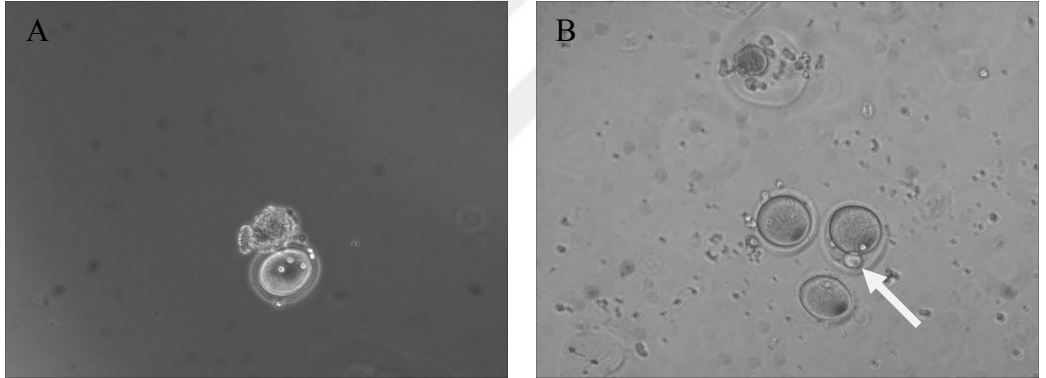


Resim 3.3: Mayoz II dönemi için oosit eldesi, kültür ortamında Mayoz II 1. Polar cisimciğinin atılımı Metafaz I den Metafaz II ye geçiş (A), Metafaz II oositler (B). X400



Resim 3.4: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında Metafaz II ve profaz oositler (A, B). X400

Metafaz I döneminde alınan oositlerin oosit kültür vasatı ile 48 saat inkübasyon sonrasında, oositlerin gelişimlerine devam etmedikleri Metafaz I evresinde kaldıkları ve az sayıda ölü oositlerde seçilmekteydi (Resim 3.5.A). Kültür vasatına tubal sıvı ilavesinden sonraki 48 saatlik inkübasyonda ise Mayoz I evresindeki oositlerin çoğunun Mayoz II aşamasına geçtikleri gözlemlendi (Resim 3.2, Resim 3.5.B). Mayoz II aşamasına geçen oositlerin bazılarının 1. Polar cisimciğin perivitellin aralıkta görülmesi ile Metafaz II safhasında oldukları, geri kalan oositlerin ise iğ iplikciklerinin kutupsal yerleşimi gerçekleştiği ama bazı oositlerin 1. Polar cisimciği attıkları, bazı oositlerin ise 1. Polar cisimciği atmadıkları görüldü (Resim 3.5.B). Bu gruptaki oositlerin sitoplazmasının şeffaf veya hafifçe granüler olduğu, perivitellin aralığın dar ve zona pellusidanın renksiz görüldüğü izlendi (Resim3.5.B). Tubal sıvı kültürü içinde canlılıklarını korudukları saptandı (Resim 3.2 A, B).



Resim 3.5 : Kültür ortamında kültür edilmiş Metafaz I evresinde oositler (A), Tuba sıvısı ilave edilmiş kültür ortamında kültür edilmiş Metafaz II evresinde ve 1. polar cisimcik atılmış durumdaki oosit (B). X400

Metafaz II dönemindeki oositlerin oosit kültür vasatı ile kültürü sonrasında oosit sitoplazması granüler ve zona pellusida renksiz gözlenirken gelişimin tubal sıvı olan kültür vasatında oositlerin canlılıklarını korudukları, Metafaz II evresinde kaldıkları, sitoplazmalarında granüllerin seçildiği gözlemlendi (Resim 3.4.A, B, 3.5.B).

3.1.2. Whole Mount İmmunohistokimya Bulguları

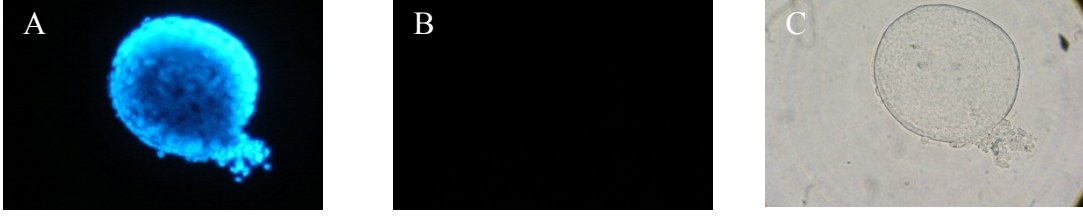
Tüm gruplara ait oositlerde immunoflorasan analizi sonrasında Metafaz I aşamasında olan oositlerin oosit kültür vasatı içinde kültüre edilen oositlerde Emi (Resim 3.6), MOS (Resim 3.7), MPF (Resim 3.8) ve siklin-B (3.9) dağılımlarında negatif oldukları gözlemlendi (Tablo 3.1). Oosit kültür vasatına tubal sıvı ilavesi yapılan 48 saatlik inkübasyon sonrasında oositlerde Emi (Resim 3.10), MOS (Resim 3.11) ve MPF (Resim 3.12) immunfleurosan boyamaları negatif iken, Siklin B (Resim 3.13) immunfleurosan boyamasının pozitif olduğu ve boyanmanın oosit sitoplazmasında olduğu gözlemlendi (Tablo 3.1).

Metafaz II aşamasında oositler immunfloresan analizi sonrasında Emi (Resim 3.14), MOS (Resim 3.15) ve MPF (Resim 3.16) immunfleurosan boyamaları negatif iken, Siklin B (Resim 3.17) immunfleurosan boyamasının pozitif olduğu saptandı (Tablo 3.1). Oosit kültür vasatına tubal sıvı ilavesi yapılan 48 saatlik inkübasyon sonrasında immunfloresan boyamalarının tubal sıvı ilavesi yapılmayan grup ile benzer olduğu ve sadece siklin-B immunfloresan dağılımının bulunduğu izlendi (Resim 3.9- Resim 3.13- Resim 3.17- Resim 3.21), (Tablo 3.1).

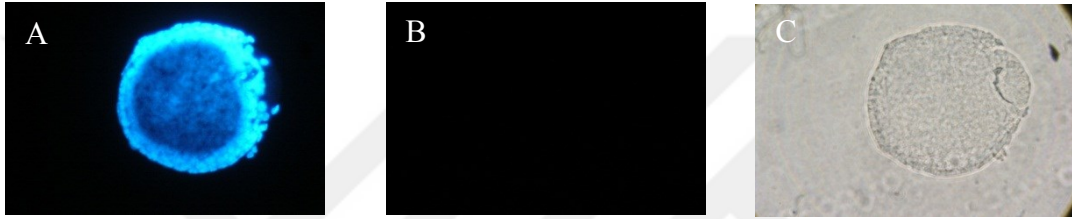
Yapılan istatistiksel analiz sonucunda sadece siklin B nin metafaz I döneminde negatif diğer dönemlerde pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 3.2, Grafik 3.1).



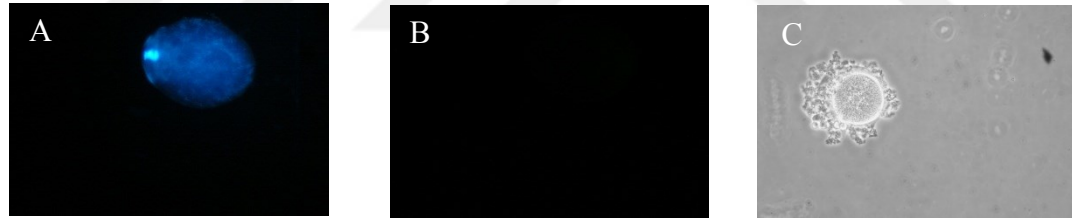
Resim 3.6: Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), Emi dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



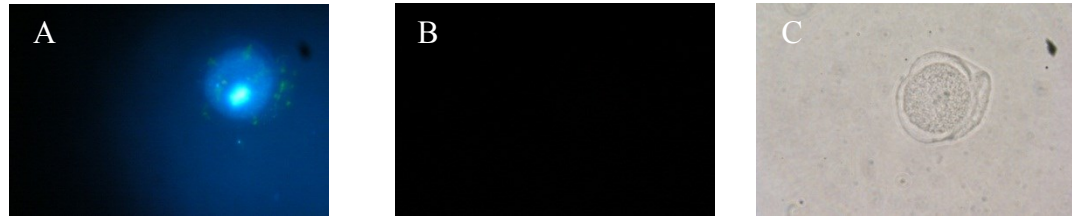
Resim 3.7: Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), MOS dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



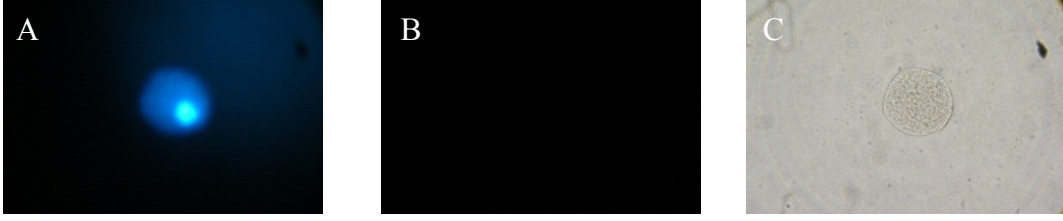
Resim 3.8: Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), MPF dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



Resim 3.9: Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), Siklin B dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400

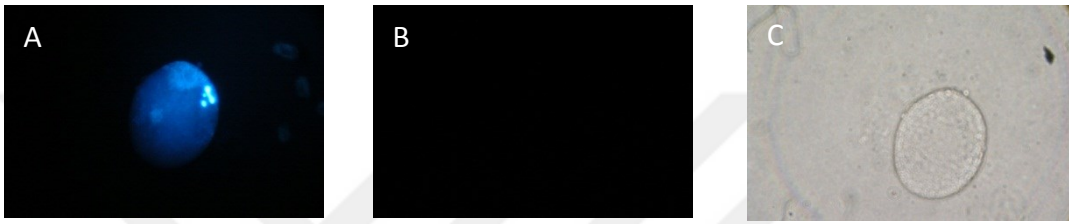


Resim 3.10: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), Emi dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



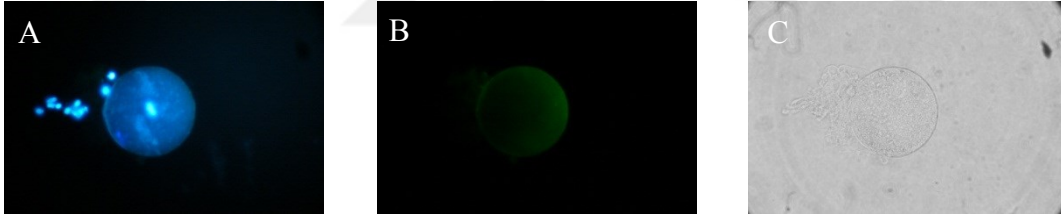
Resim 3.11: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), MOS dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C).

X400



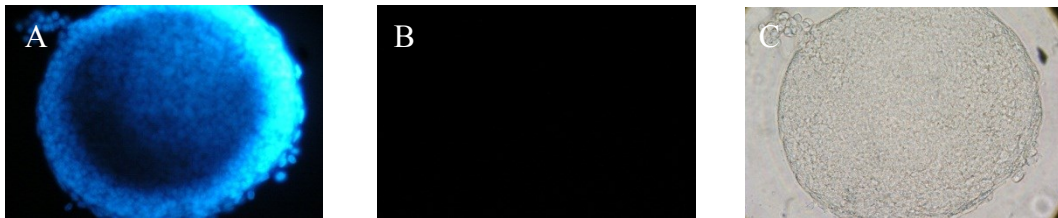
Resim 3.12: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), MPF dağılımı (B), Faz kontrast görünüm (C).

X400

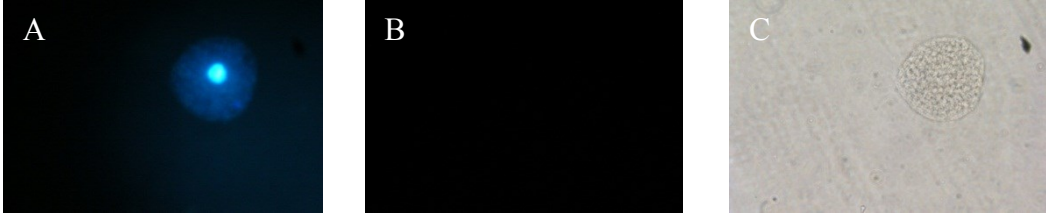


Resim 3.13: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz I oositler. DAPI boyaması (A), Siklin B dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C).

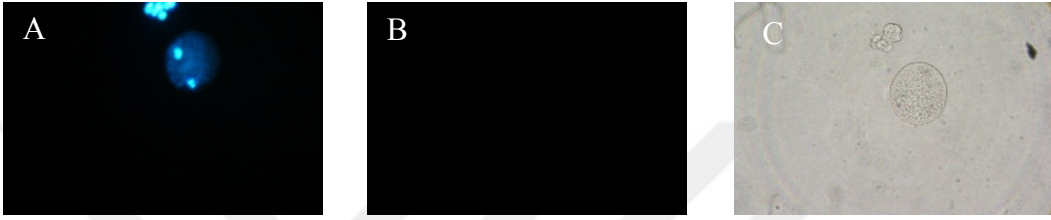
X400



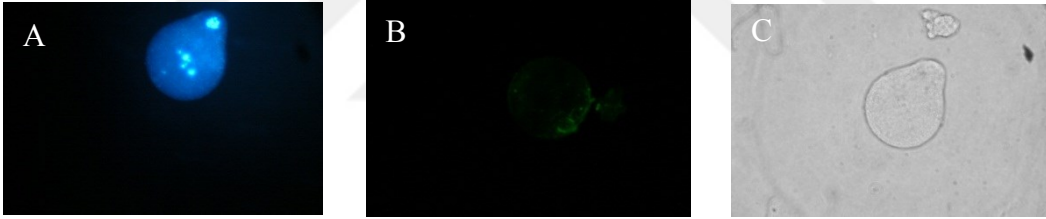
Resim 3.14: Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), Emi dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



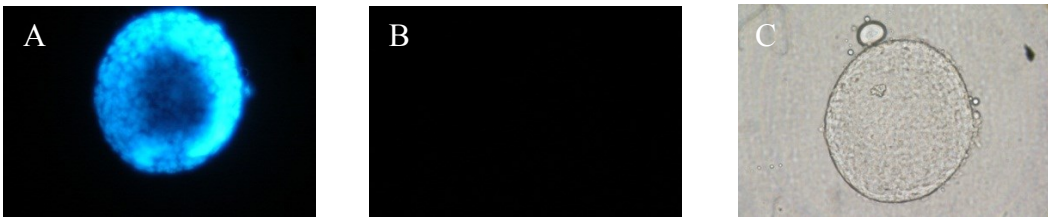
Resim 3.15: Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), MOS dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



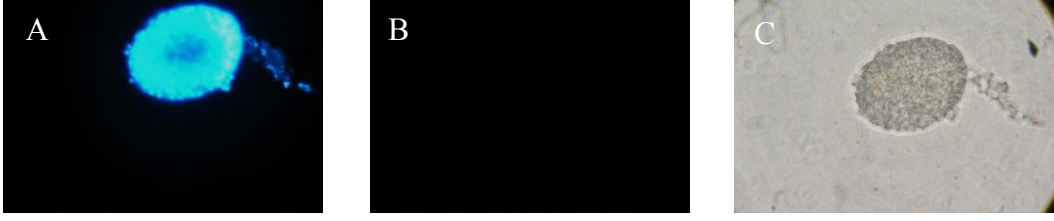
Resim 3.16: Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), MPF dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



Resim 3.17: Oosit kültür mediumunda kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), Siklin B dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



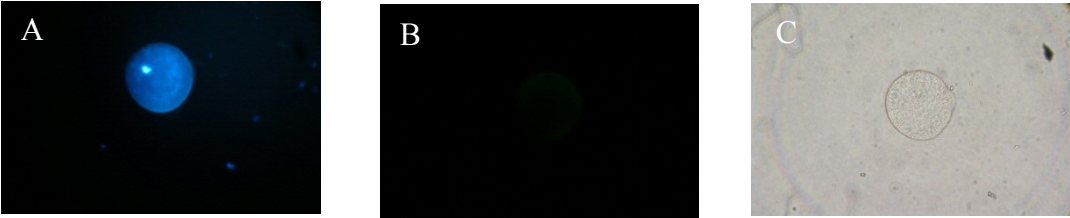
Resim 3.18: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), Emi dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C).X400



Resim 3.19: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), MOS dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



Resim 3.20: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), MPF dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400



Resim 3.21: Tubal sıvı ilave edilmiş kültür ortamında kültüre edilen Metafaz II oositler. DAPI boyaması (A), Siklin B dağılımı (B), Faz kontrast görünümü (C). X400,

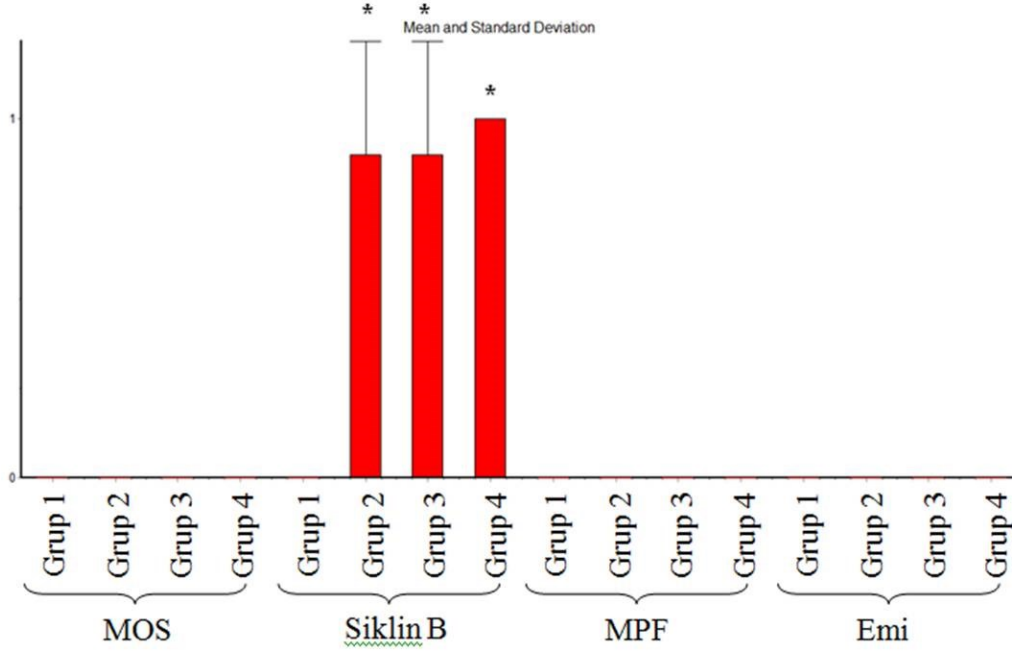
Tablo 3.1. Kültür ortamında metafaz I ve metafaz II oositlerinin 48 saatlik kültür ortamlarındaki kültür sonrası MOS, Siklin B, MPF ve Emi immunfloresan yoğunlukları ile TUNEL pozitifliği.

Gruplar	Immunofloresan Boyama				TUNEL
	MOS	Siklin B	MPF	Emi	
Grup 1	-	-	-	-	-
Grup 2	-	+	-	-	-
Grup 3	-	+	-	-	+/-
Grup 4	-	+	-	-	+

Tablo 3.2. Metafaz I ve Metafaz II dönemlerinde oosit kültür vasatı ve/veya tubal sıvı ilave edilmiş kültür sonrasında gruplardaki MOS, Siklin B, MPF ve Emi immunfloresan yoğunluklarının istatistiksel oranları. (mean±SD).

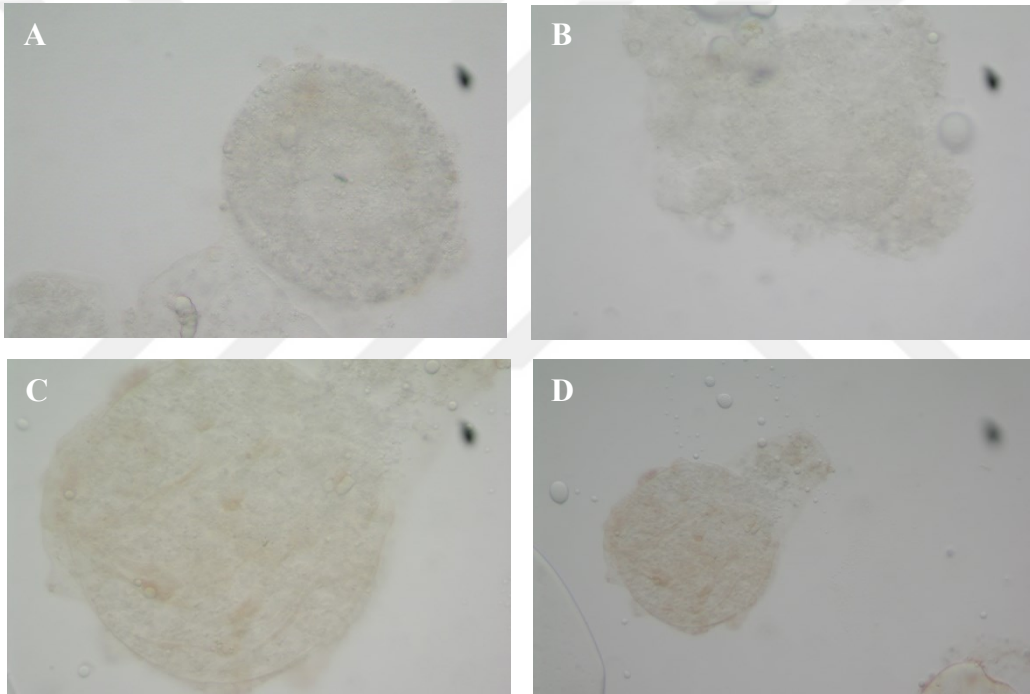
Gruplar	Immunofloresan Boyama			
	MOS	Siklin B	MPF	Emi
Grup 1	0	0	0	0
Grup 2	0	0.9±0.31	0	0
Grup 3	0	0.9±0.31	0	0
Grup 4	0	1.0±0	0	0

Grafik 3.1. Metafaz I ve Metafaz II dönemlerinde oosit kültür vasatı ve/veya tubal sıvı ilave edilmiş kültür sonrasında MOS, Siklin B, MPF ve Emi immunofloresan yoğunluklarının istatistiksel analizi. Değerler mean \pm SD olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı Siklin B dağılımı * ile belirtilmiştir.



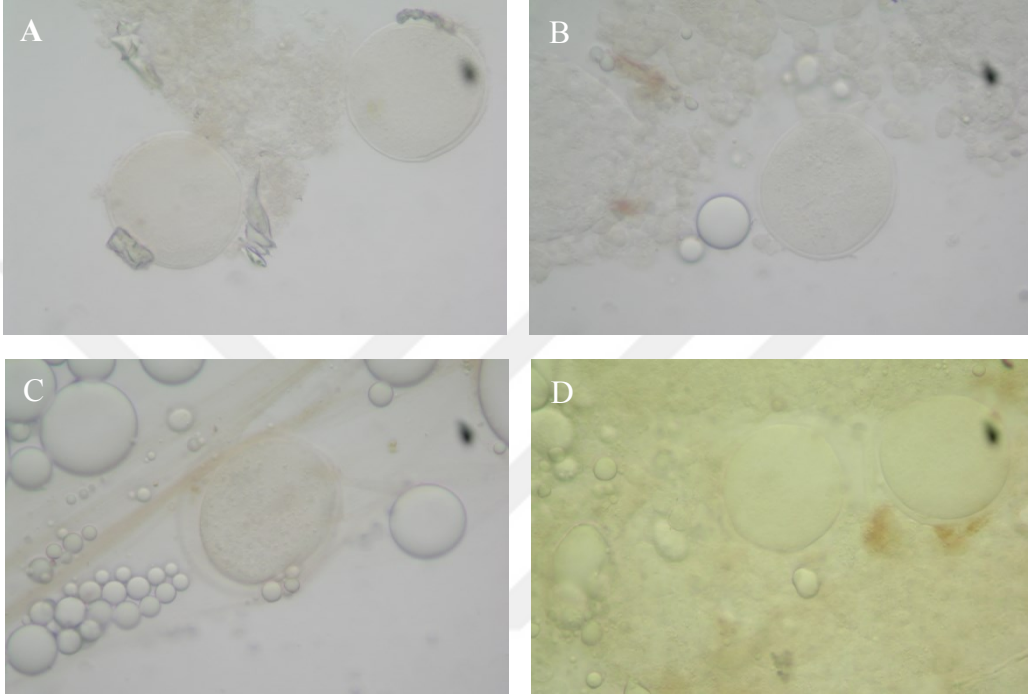
3.1.3. TUNEL Bulguları

TUNEL analizi sonrasında, Metafaz I aşamasında elde edilen ve oosit kültür vasatında kültüre edilen oositlerde granuloza hücrelerinde TUNEL pozitif hücreler gözlenir iken, oositlerde pozitif boyanma gözlenmedi (Resim 3.22 A, B). Oosit kültür vasatına tubal sıvı ilavesi yapıldıktan 48 saatlik inkübasyon sonrası Metafaz I oositlerde sadece TUNEL pozitif hücrelerin granuloza hücrelerinde olduğu ve oositler TUNEL negatif oldukları saptandı (Resim 3.22 C, D).



Resim 3.22 : Kültür ortamındaki Metafaz I dönemindeki oositlerde TUNEL boyaması. Oosit kültür vasatında kültüre edilen Metafaz I oositler (A, B). Kültür ortamına tubal sıvı ilavesi sonrasında kültüre edilen Metafaz I oositler (C, D). X400

Metafaz II evresindeki oositlerde sadece granuloza hücrelerinde yer yer TUNEL pozitif hücelere saptanır iken (Resim 3.23 A, B), tubal sıvı ile kültürü sonrasında granuloza hücrelerinde TUNEL pozitif hücelere rastlanmadı (Resim 3.23 C, D). TUNEL boyamalarının gruptaki dağılımı toplu olarak Tablo 3.1 devredilmiştir.



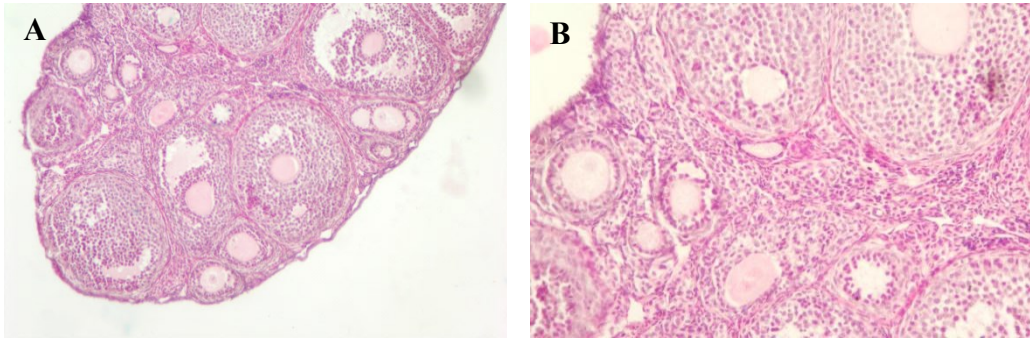
Resim 3.23: Kültür ortamında Metafaz II dönemindeki oositlerde TUNEL boyaması. Oosit kültür vasatında kültüre edilen Metafaz II oositler (A, B). Kültür ortamına tubal sıvı ilavesi sonrasında kültüre edilen Metafaz II oositler (C, D). X400

3.2. Ovaryum Bulguları

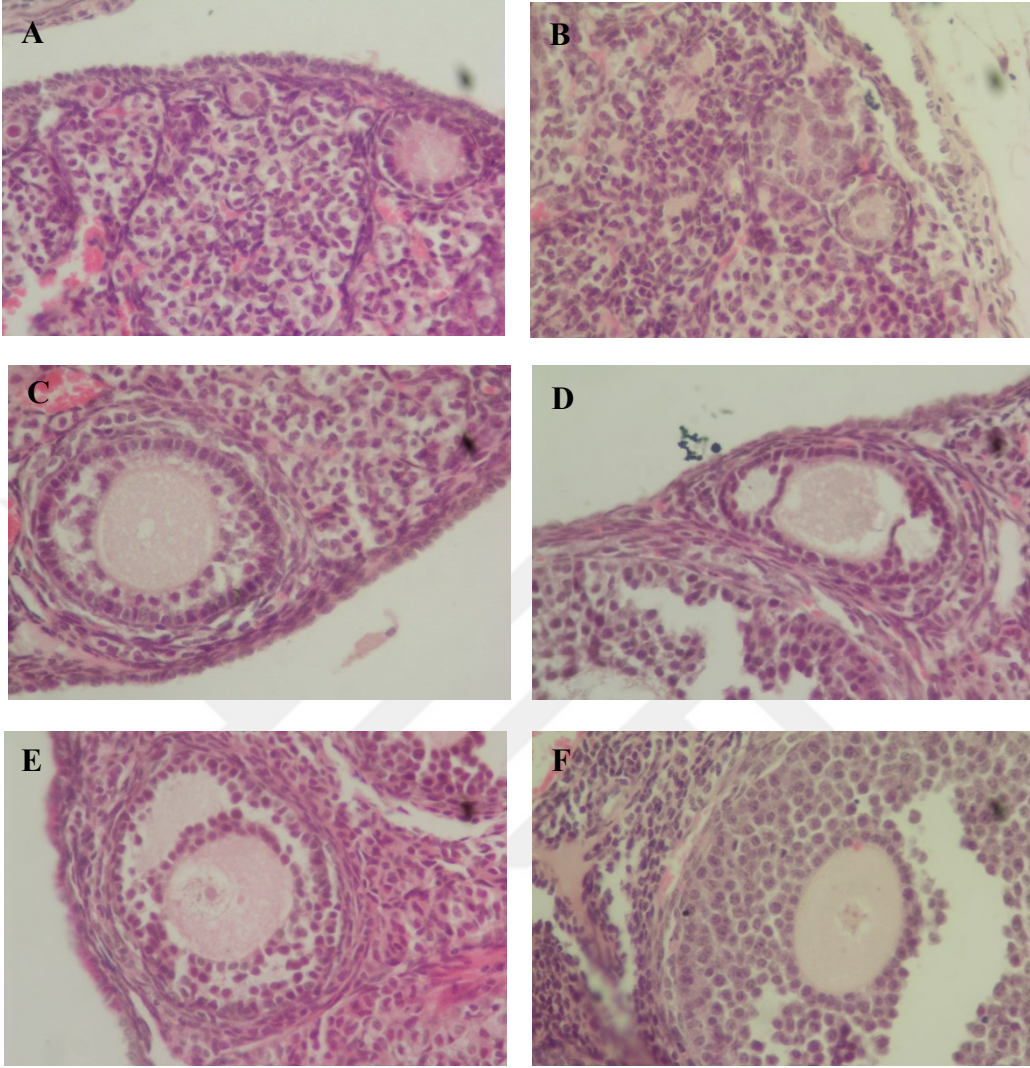
3.2.1. Ovaryum Histokimyasal Bulgular

Ovaryan dokularının histokimyasal analizi sonrasında kortekste tek katlı kübik germinal epitel altında farklı foliküller gelişim evrelerinde bulunan ovaryan foliküller gözlemlendi. (Resim 3.24 A, B)

Korteks tabakasında gelişmekte olan foliküllerden primordiyal foliküllerin tek katlı yassı foliküler hücreler ile çevrelenmiş olduğu ve kümeler halinde bulunduğu izlendi (Resim 3.25 A). Primordiyal foliküller çap olarak en küçük foliküller olmalarıyla ayırt ediliyordu (Resim 3.23 A). Primer foliküller ise etraflarında tek katlı veya çok katlı kübik foliküller hücrelerle çevrelenmiş oldukları ve oosit çekirdeğinin kromatin kondensasyonunun dağınık şekilde organize olduğu izlendi (Resim 3.25 B, C). Sekonder foliküllerin etrafındaki granüloza hücrelerinin çok katlı oldukları ve yer yer hücreler arasında boşluklar oluştuğu saptandı (Resim 3.25 D, E). Bu dönemdeki oosit çekirdeğinin kromatin kondensasyonunun artmış olduğu gözlemlendi. Ovaryum dokusunda sekonder foliküllerden daha büyük olan graaf folikülleri, içerisinde bulunan antrum boşluğunun büyüklüğü ile diğer foliküllerden açıkça ayırt edildi (Resim 3.25 F). Bu dönemdeki folikülde teka interna ve teka eksterna hücreleri folikülün dışında kolaylıkla seçilmekteydi (Resim 3.25 F). Oosit folikülün periferine doğru kumulus ooforus ve korona radiata çevrelenmiş olarak görülmekteydi (Resim 3.25 F).



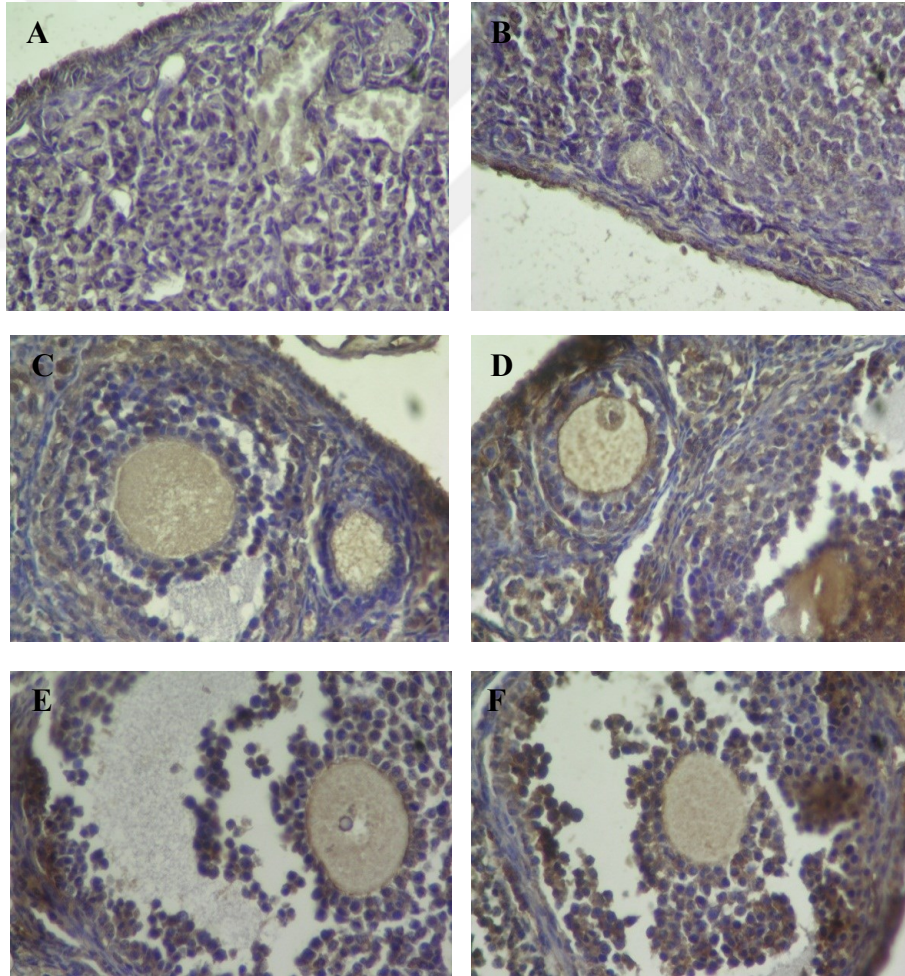
Resim 3.24: Ovaryum dokusunda ovaryan foliküller A: X40, B: X200



Resim 3.25: Ovaryum örneklerinde Hematoksilen-Eosin boyaması. Ovaryum epitelinin altında primordiyal foliküller ve primer foliküller (A), primer foliküller (B), Multilaminar primer folikül (C), Sekonder folikül (D, E), Graaf folikül (F). X400

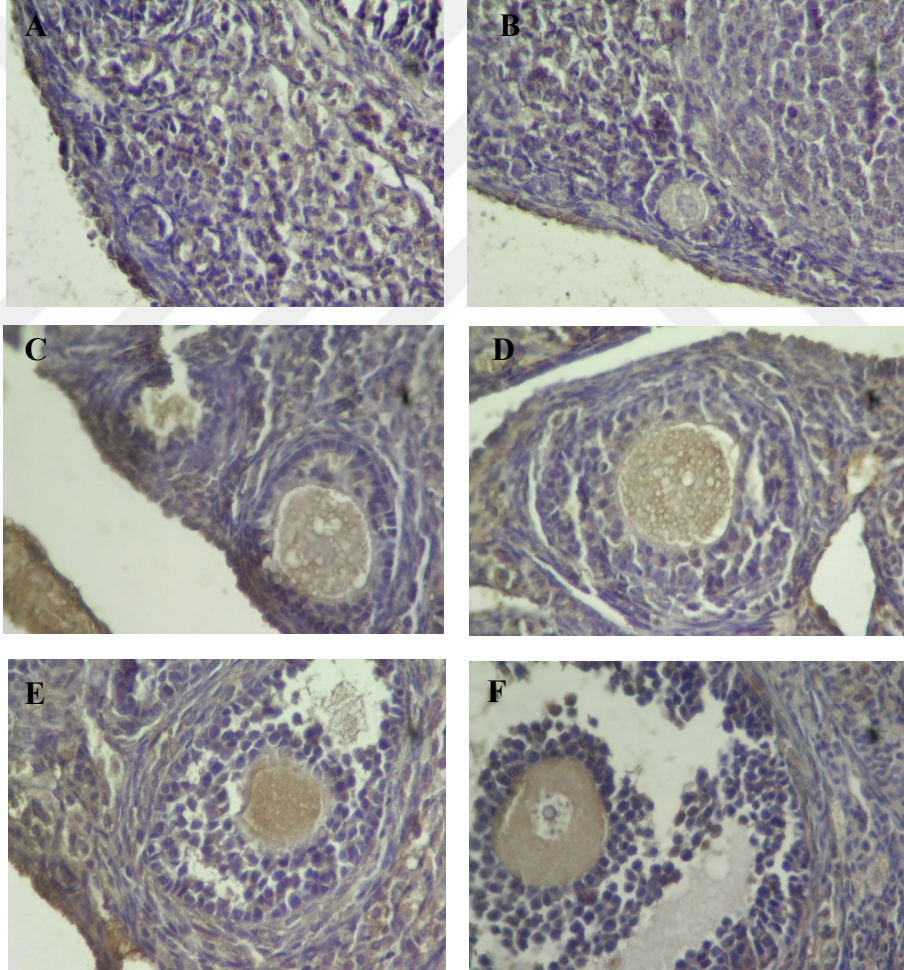
3.2.2. Ovaryum İndirekt İmmunohistokimya bulguları

Primordiyal folikülerde MOS immünoreaktivitesi, hem oositte hemde foliküler hücrelerde negatif olarak saptandı (Resim 3.26 A). Primer, sekonder ve graaf foliküllerde hem folikül hücrelerinde hemde oositte pozitif boyanma gözlenir iken, graaf foliküllerdeki boyanmanın diğer foliküllere oranla daha fazla olduğu görüldü (Resim 3.26 B-F) (Tablo 3.3). Gelişen foliküllerdeki MOS immünoreaktivitesi karşılaştırıldığında sadece primer foliküllerdeki MOS immünoreaktivitesi sekonder foliküllerdeki MOS immünoreaktivitesi ile arasında anlamlı fark olmadığı, fakat diğer MOS immünoreaktivitelerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda aralarında anlamlı fark olduğu saptandı (Tablo 3.4, Grafik 3.2).



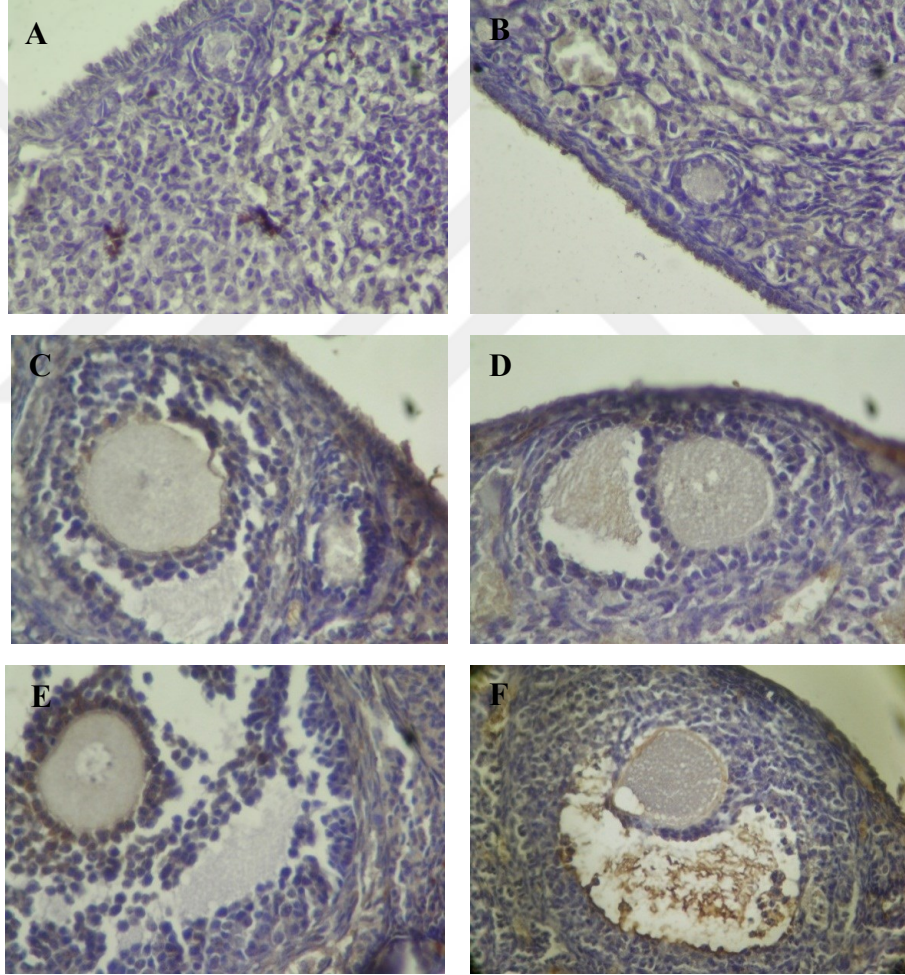
Resim 3.26: Ovaryum örneklerinde MOS dağılımı. Primordiyal foliküller (A), Primer Folikül (B), Sekonder Folikül (C), Graaf Folikül (D). X400

Siklin B immünoaktivitesi, gelişen ovaryan foliküllerin tüm safhalarında saptandı. Primordiyal foliküllerde, siklin B immünoaktivitesi foliküler hücrelerinde ve oositte zayıf veya negatif gözlenirken (Resim 3.27 A), (Tablo 3.3) , primer foliküllerden itibaren tüm foliküllerde immünoaktivitenin olduğu özellikle sekonder foliküldeki oositte en fazla olduğu izlendi (Resim 3.27 B-F), (Tablo 3.3). Gelişen folliküllerdeki siklin B immünoaktivitesi karşılaştırıldığında sadece primer folliküllerdeki siklin B immünoaktivitesinin graff follikülündeki siklin B immünoaktivitesi ile arasında anlamlı fark olmadığı, fakat diğer siklin B immünoaktivitelerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda aralarında anlamlı fark olduğu saptandı (Tablo 3.4), (Grafik 3.2).



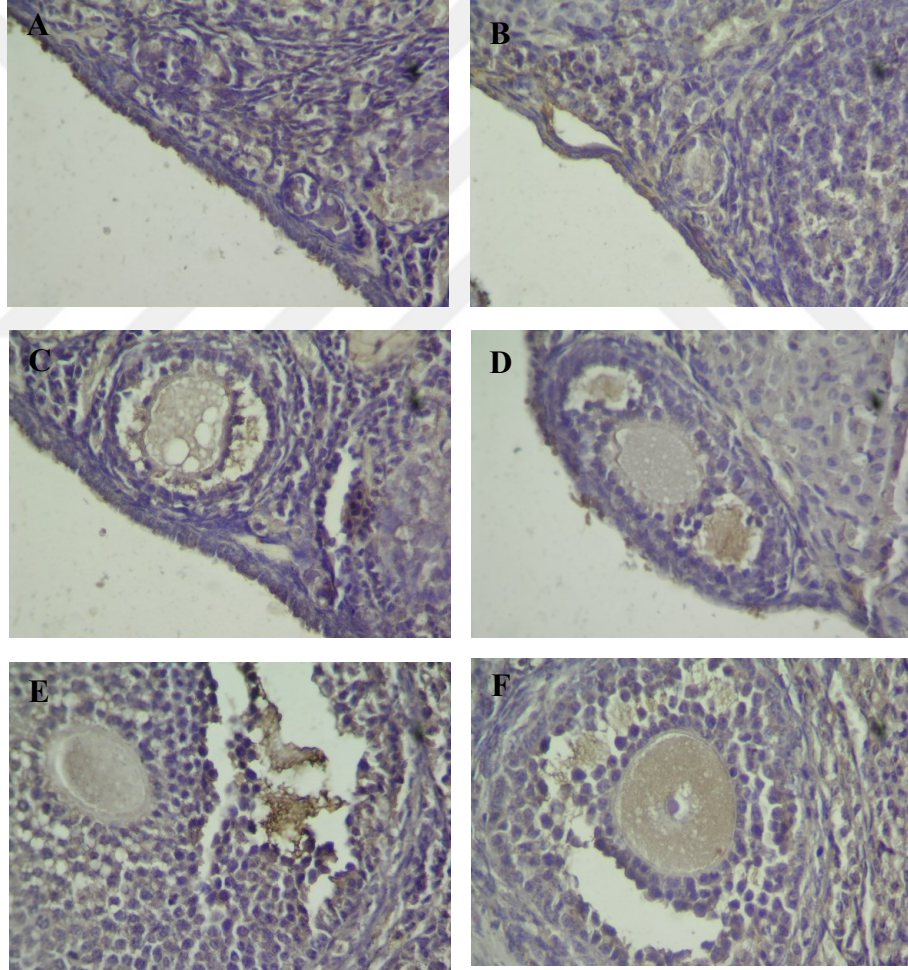
Resim 3.27: Ovaryum örneklerinde Siklin B dağılımı. Primordiyal foliküller (A), Primer Folikül (B), Sekonder Folikül (C, D, E), Graaf Folikül (F). X400

Primordiyal ve primer foliküllerde, Emi'nin immünoaktivitesi oosit ve folikül hücrelerinde negatif iken (Resim Resim 3.28 A, B), (Tablo 3.3) sekonder ve graaf foliküllerinde oositte Emi immünoaktivitesinin sırasıyla zayıf ve orta şiddette olduğu saptandı (Resim 3.28 C-F), (Tablo 3.3). Gelişen foliküllerdeki emi immünoaktivitesi karşılaştırıldığında negatif olan primordiyal ve primer foliküllerdeki Emi immünoaktivitelerinin karşılaştırmalarının anlamlı olmadığı, diğer Emi immünoaktivitelerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda aralarında anlamlı fark olduğu saptandı (Tablo 3.4, Grafik 3.2).



Resim 3.28: Ovaryum örneklerinde Emi dağılımı. Primordiyal foliküller (A), Primer Folikül (B), Sekonder Folikül (C, D), Graaf Folikül (E, F). X400

Primordiyal folikülerde MPF immünoreaktivitesi, hem oositte hemde foliküler hücrelerde zayıf olarak saptandı (Resim 3. 29 A), (Tablo 3.3). Primer, sekonder ve graaf foliküllerde hem folikül hücrelerinde hemde oositte pozitif boyanma gözlenir iken, graaf foliküllerdeki boyanmamanın diğer foliküllere oranla daha fazla olduğu görüldü (Resim 3.29 C-F), (Tablo 3.3). Gelişen folliküllerdeki MPF immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında sadece primer folliküllerdeki MPF immunoreaktivitesi ile sekonder follikülündeki MPF immunoreaktivitesi arasında anlamlı fark olmadığı, fakat diğer MPF immunoreaktivitelerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda aralarında anlamlı fark olduğu saptandı (Tablo 3.4, Grafik 3.2).



Resim 3.29: Ovaryum örneklerinde MPF dağılımı. Primordiyal foliküller (A), Primer Folikül (B, C), Sekonder Folikül (D), Graaf Folikül (E, F). X400

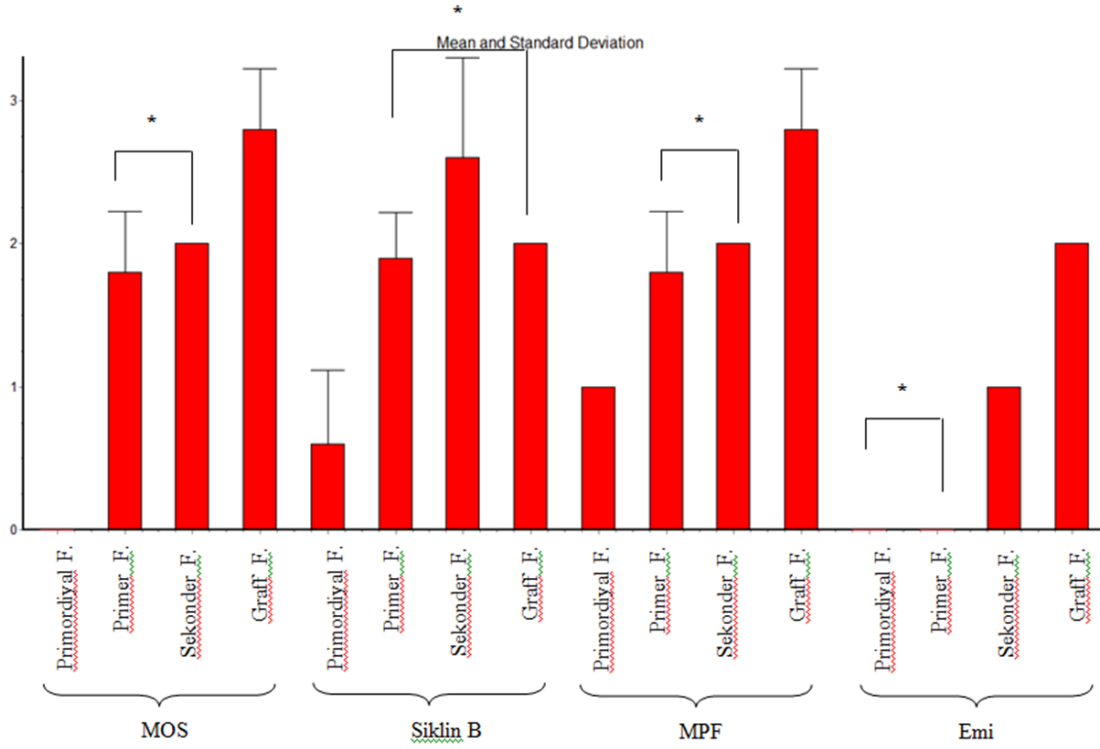
Tablo 3.3. Ovaryum örneklerinde MOS, Siklin B, MPF ve Emi immunoreaktivite yoğunlukları ile TUNEL pozitifliği.

OVARYUM	İmmunoreaktivite Yoğunlukları				TUNEL
	MOS	Siklin B	MPF	EMİ	
Primordiyal Follikül	-	+/-	+	-	+/-
Primer Follikül	++	++	++	-	+
Sekonder Follikül	++	+++	++	+	++
Graaf Follikül	+++	++	+++	++	+++

Tablo 3.4: Ovaryum örneklerinde MOS, Siklin B, MPF ve Emi immunoreaktivite yoğunluklarının istatistiksel oranları. (mean±SD).

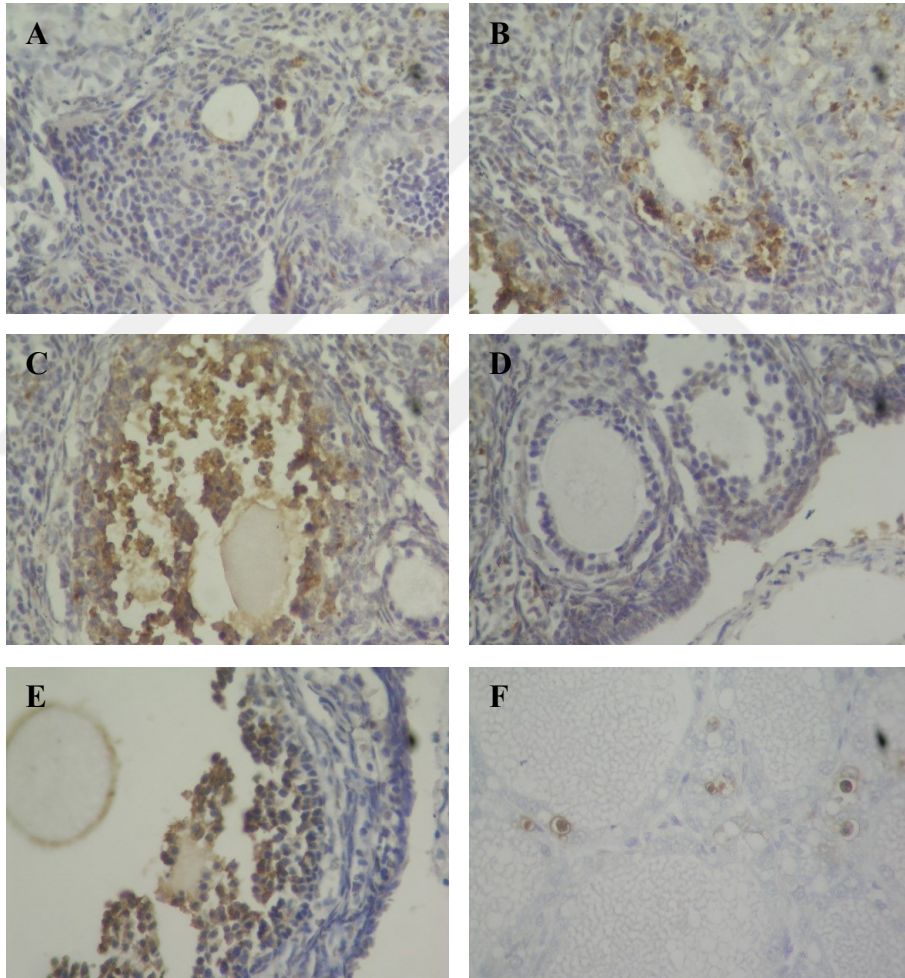
OVARYUM	İmmunoreaktivite Yoğunlukları			
	MOS	Siklin B	MPF	EMİ
Primordiyal Follikül	0	0.6±0.52	1.0±0	0
Primer Follikül	1.8±0.42	1.9±0.32	1.8±0.42	0
Sekonder Follikül	2.0±0	2.6±0.70	2.0±0	1.0±0
Graaf Follikül	2.8±0.42	2.0±0	2.8±0.42	2.0±0

Grafik 3.2: Ovaryum dokusunda MOS, Siklin-B, MPF ve Emi immunoreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi. Değerler mean \pm SD olarak verilmiştir. $P>0.05$ olanlar * ile belirtilmiştir.



3.2.3. Ovaryum TUNEL Bulguları

Ovaryum dokusunda TUNEL boyaması analizi sonrasında tüm dönemlere ait foliküler hücrelerde TUNEL pozitif hücelere rastlanırken (Resim 3.30 A-F), en fazla TUNEL pozitif hücre graaf folikülündeki foliküler hücelerde olduğu izlendi (Resim 3.30 F). Tüm evrelerdeki oositlerde TUNEL negatif idi (Resim 3.30 A-F), (Tablo 3.3)



Resim 3.30: Ovaryum örneklerinde yapılan TUNEL boyamaları.

Primordiyal folikül (A), Primer Folikül (B), Sekonder Folikül (C, D), Graaf Folikül (E), Millipore kiti Pozitif kontrol boyaması (F). X400

4. TARTIŞMA

Oosit maturasyonu hem oogenez hemde oosit kültürleri sırasında kontrol edilmesi gereken olaylardan biridir. Oosit her bir ovulatuvar siklusta primordiyal germ hücrelerinden farklılaşarak mayoz I aşamasını tamamlaması ve mayoz II aşamasına geçerek fertilizasyon için olgunlaşmasını tamamlar (31). Foliküler gelişim sırasında oositin kendisi tarafından kontrol edilen mekanizmalar haricinde etrafındaki foliküler hücrelerden gelen sinyaller ile bu sürecin sorunsuz bir şekilde tamamlanması sağlanır (37, 53, 60). Oosit ve foliküler hücreler arasındaki karşılıklı bu iletişim, oositin maturasyonunun duraksamadan gerçekleşmesi ve ovulasyonla atılması sağlar (142). Oositin maturasyonu bir çok faktör tarafından kontrol edilir. Özellikle siklin B ve MOS salgısı birlikte veya tek tek aktive olarak MPF aktivasyonunu sağlarlar. MOS +/- yapılan çalışmalarda siklin B aktivasyonu ile MOS yokluğunda dahi MPF aktivasyonu olduğu gösterilmiş ve maturasyon sorunsuzca gerçekleştirilebilmiştir(165). MPF salgısı özellikle çekirdeğin dağılmasından, kromozomların kondensasyonundan ve iğ iplikçiklerin oluşumu için tübüler kompleksin organizasyonundan sorumludur (94, 95). Özellikle profaz ve metafaz I evrelerinde salgısı giderek artar, 1. Polar cisimciğin atılması sırasında azalır ve metafaz II arreste tekrar salgılanır. Fertilizasyonla birlikte MPF salgısının azaldığı bilinmektedir. MOS salgısı MEK/ MAPK yolağı üzerinden MISS (MAPK tarafından aktive edilen iğciklerin stabilizasyonunu sağlayıcı protein-MAP kinase interacting and spindle- stabilizing protein) aktive ederek iğciklerin stabilizasyonunu sağlar. MOS esas olarak oositin salgılanır sentezlenir ve kalsiyuma duyarlı olup Mayoz I in tamamlanmasından sorumludur. Mayoz II sırasında ise MPF aktivasyonunda artış gerçekleşir. MOS MAPK yolağı sitotoksik faktörü arrestine yol açar. CSF ise Metafaz II arrestinden sorumludur. Mos salgısı hem Mayoz I hemde Mayoz II de düzenli salınımı ile karakterizedir. Siklin B salgısı immatür oositte az miktarda iken foliküler gelişimle orantılı olarak artar ve Metafaz I sonunda en yüksektir. Siklin B azalması 1. Polar cisimciğin atılması gereklidir (138,159). Siklin B aktivasyonu MPF ile birlikte koreledir. Siklin B'nin aktive olmasıyla MPF aktivasyonu gerçekleşir. Folikül hücrelerinden salgılanarak oosit sitoplazmasında biriken cAMP, MPF nin aksine germinal vezikül halinin korunmasından sorumludur. cAMP azalmasıyla birlikte CDK1

in defosforilasyonu sonucunda MPF aktifleşir ve Mayoz 1 e tekrar giriş sağlanır. Emi salgısı ise, esas olarak Mayoz I sonunda artışı başlar ve fertilizasyonla birlikte salgısı azalır (95, 138).

Çalışmamızda, oosit kültür vasatı içerisinde kültüre edilen Metafaz I ve Metafaz II oositlerin kültürü sonrasında her iki hücrelerinde canlılıklarını devam ettikleri fakat kültürün ikinci günün sonunda yer yer ölü hücrelerin oldukları gözlemlendi. Bununla beraber Metafaz I evresindeki oositlerin oosit kültür ortamı içerisinde gelişim göstermeden kaldıkları ve Metafaz II ye geçemedikleri görüldü. Buna karşın tubal sıvıya alınarak yapılan kültür sonrasında Metafaz I oositlerin çoğunda 1. Polar içciklerin kortekse doğru hareket ettikleri ve bazı oositlerde de 1. Polar cisimciğin atılmış olmasının görülmesi üzerine tubal sıvı ilavesi sonrasında metafaz I aşamasında toplanan oositlerin maturasyonu için uygun bir ortam sağladığı düşünüldü. Metafaz II oositlerin tubal sıvı içerisindeki kültürlerinde ölü oositlere rastlanmaması kültür ortamının Metafaz II oositleri içinde uygun bir mikroçevre sağlamış olabileceği sonucuna varıldı. Bu dönemde elde edilen immünoflorasan boyamalar sonucunda özellikle Siklin B'nin tubal sıvı ilavesi ile kültürü yapılmış Metafaz I oositlerde görülmesi bu oositlerin ileri gelişimini sağladığı düşünüldü. Tubal sıvı içerisindeki faktörlerin Metafaz I oositlerde Siklin B aktivasyonunu sağlamış olabileceklerini düşündürdü. Bununla beraber Siklin B dışındaki MOS, MPF ve Emi immünoflorasan boyamalarının negatif görünmesi üzerine Tubal sıvı içerisindeki faktörlerin henüz bu faktörlerin salgılanmasını destekleyemediği görüldü. Fakat tubal sıvı ile yapılan iki günlük kültür sonrasında Siklin B seviyesinin miktarının ölçülememesinden dolayı özellikle MPF aktivasyonu için yeterli Siklin B aktivasyonu olup olmadığı test edilemedi. Ayrıca tubal sıvı ile kültüre edilmiş Metafaz I oositlerde az sayıda 1. Polar cisimciği atmış oositlerin görülmesi ile Siklin B'nin her hücrede aynı etkiyi gösteremediğinin görünmesi üzerine belki de tubal sıvı ile kültürün daha uzun süreli yapılması diğer oosit maturasyonu kontrol edici faktörlerin aktivasyonunu sağlayabilirdi. Metafaz I ve Metafaz II evresinde toplanan oositlerin oosit kültür vasatı ile kültürleri sonrasında granuloza hücrelerinde yer yer TUNEL pozitif hücrelere rastlanır iken oosit hücrelerinde TUNEL pozitifliği saptanmaması kültür ortamımızın oosit canlılığının devam etmesi açısından uygun olduğunu düşündürdü.

Bununla beraber tubal sıvı ile kültüre edilen Metafaz I ve Metafaz II oositlerin TUNEL boyamasında oosit kültür ortamında kültüre edilen oositlerde olduğu gibi sadece granuloza hücrelerinde pozitif TUNEL hücrelerinin olması ve aralarında farklılık saptanamamasından dolayı tubal sıvı ile kültürün granuloza hücrelerinin canlılığı açısından bir fark oluşturmadığını düşündürdü. Ayrıca tubal sıvı ile kültür sonrasında da Metafaz I ve Metafaz II evresindeki oositlerde TUNEL pozitifliğin saptanmaması ve canlılıklarının devam etmesi açısından fark olmasada, tubal sıvı ile oositlerin kültüre edilebileceğini ve canlılıklarında değişiklik olmayacağını desteklemektedir.

Sentetik tuba uterina sıvısı (synthetic oviduct fluid, SOF) Tervit ve arkadaşları tarafından 1972'de üretilmiştir (182). Daha sonra Menezo'nun B2 mediumunda sıgır tuba uterina içeriği örnek alınmıştır (183). Quinn tarafından insan tubal sekresyon içeriğine uygun olarak geliştirilen HTF'nin (Human Tubal Fluid) (184) ardından Gardner ve Leese 1990 yılında MTF (Mouse Tubal Fluid) (185) formülasyonunu geliştirmişlerdir.

1980'lerin ortalarında insan embriyo kültür için geliştirilmiş olan ilk ilki embriyo kültür mediumu piyasaya çıkmıştır: Menezo ve arkadaşları (186) yaygın olarak kullanılan dengeli tuz solüsyonlarının yerine yeni bir medium üreterek B2 adını vermişlerdir. Bu mediumda makromolekül kaynağı olarak serum albümin kullanılmakta ve aminoasit bulunmaktadır. Bir yıl sonra ise Quinn ve arkadaşları günümüze kadar çok yaygın olarak kullanılan formüllerini piyasaya çıkarmışlardır.(184). HTF adı verilen bu medium aslında dengeli tuz solüsyonu tabanında geliştirilmiştir. Aminoasit içermez ve potasyum seviyesi insan tubal sıvısını taklit ederek ayarlanmıştır. HTF total serum veya serum albümini eklenerek insan embriyosunun erken preembriyoner evrede (2.veya 3.güne kadar) kültüre edilmesi amacıyla kullanıldığında başarılı sonuçlar vermiştir. Daha sonra yapılan araştırmalar doğrultusunda; HTF mediumu modifiye edilmiş ve glukoz ve inorganik fosfat içermeyen QB11 mediumu geliştirilmiştir (187). Bu mediumda aminoasit içermez. Pool ve arkadaşları HTF mediumunda değişiklikler yaparak P1 mediumunu geliştirmişlerdir. P1 mediumunun içeriğinde glukoz ve inorganik fosfat bulunmama ile birlikte, aminoasit olarak taurin eklenmiştir. Sayılan mediumların kullanımıyla 1990'lı yılların ortalarına kadar bölünme evresindeki

embriyoların kültürlerinde başarılı sonuçlar alınmış ve gebelik oranları yükseltilebilmiştir. Bu yıllarda, blastosist evresine kadar kültüre edilen embriyolardaki implantasyon potansiyelinin daha yüksek olduğunun gözlenmesiyle, Gardner ve arkadaşları ve G1 ve G2 mediumlarını üreterek embriyoların gelişimin ileri evresindeki avantajlarını göstermişlerdir (188, 190). Bu mediumların formülasyonlarının farklı olması nedeniyle embriyoların değişken gereksinimlerinin karşılanması amacıyla ardışık olarak kullanılması önerilmektedir. Barnes ve arkadaşları bu bileşimi kullanarak embriyoları blastosist evresine kadar geliştirip tek embriyo transferi ile gebelik elde etmişler ve böylece gelişen blastosistlerin implantasyon potansiyellerinin yüksek olması nedeniyle tek bir blastosist transferinin bile gebelik elde etmede yeterli olabileceğini göstermişlerdir (190). G serisi mediumlar yakın geçmişte kısmen modifiye edilerek GIII serisi piyasaya sürülmüştür. Bu seri halen başarıyla kullanılmaktadır. Stanford Üniversitesinden Behr ve Arkadaşları G serisi mediumlarla aynı zamanlarda Ham's F-10 mediumundan modifiye ettikleri ve P-1 ismini verdikleri blastosist mediumunu üretmişlerdir(190). Gardner'ın ardışık medium prensibine bağlı olarak üretilen farklı mediumlar zamanla piyasada yer almışlardır. Bunlar arasında, ABD'den Quinn ve Avrupa'dan MediCult medium serileri sayılabilir.

Son dönemlerde medium üretiminde dikkate alınması gereken iki farklı görüş belirmeye başlanmıştır. Bu görüşlerden biri Gardner ve Lane tarafından öngörülen içeriği değişken ardışık medium görüşüdür (185). Bu görüşe göre; in- vivo ortamda tuba uterina salgılarındaki içerik farklılığı nedeniyle ve gelişme dönemi süresince embriyonun değişen metabolik aktivitesine bağlı olarak, gelişimi optimize etmek amacıyla, embriyo gereksinimlerine uygun ardışık medum kullanılması gereklidir. Bu görüşe bağlı olanlar medium üretiminde doğaya dönüş felsefesinin uygulanması gerektiğini savunmaktadır.

Bu görüşün karşısında olan Sunners ve Biggers gibi araştırmacılar ise embriyonun mikroçevresindeki değişken sıvı içeriğinin embriyoyu direkt olarak etkilemediğini ve embriyonun yalnızca ihtiyacı olan kadarını aldığını öne sürerek basit optimizasyon olarak adlandırıldıkları görüşü öne sürmüşlerdir (190). Bu görüşü savunan araştırmacılar in vitro ortamdaki embriyoların gelişimini optimize edecek formülasyonun tespit edilmesinin ardından, ilk günden başlayarak blastosist evresine

kadar aynı formülasyonun kullanılmasının; embriyoyu daha az strese maruz bırakılacağını ve bununda embriyoner gelişimi olumlu yönde etkileyeceğini savunmaktadır.

Yukarda kısaca açıklanan ve her iki görüşe uygun olarak üretilmiş olan mediumlar günümüzde pek çok üremeye yardımcı tedavi merkezi tarafından başarıyla kullanılmaktadır (169). Ama hali hazırda oosit maturasyonu için gerekli kültür şartları konusu hala tartışma konusudur. O nedenle çalışmamızda, özellikle klinik ortamdada kullanılabilir olan tubal sıvısının seçilmesi ovulasyonla atılan oositin fertilizasyon aşamasından morula aşamasına kadar tuba içerisinde canlılığının devam ettiğinden dolayı seçilmiştir. Tubal sıvı içeriği analizi sonrasında oosit maturasyonunu destekleyici faktörlerinde ilave edilmesiyle maturasyonun desteklenebileceği de düşünülmektedir.

Ovaryum dokusundaki foliküller gelişim sırasında korteks altında bulunan primordiyal germ hücreleri profaz 1 döneminde arrestte beklerken FSH'nin etkisi ile foliküler gelişim tetiklenmekte ve eş zamanlı olarak oosit maturasyonu gerçekleşmektedir (36).

Ovaryan foliküllerin çok erken safhalarında sadece Emi'nin sekresyonu saptanmıştır. Bunun aksine, MOS ve Siklin B ovaryan foliküllerin ileri gelişimi sırasında devam eder ve primer foliküllerde tetiklenmiştir. Sonuç olarak, MOS ve Siklin B aktivasyonu fare ovaryum dokusunda foliküler gelişimde önemlidir.

Primordiyal foliküllerde MOS ve Emi immünreaktiviteleri negatif iken Siklin B ve MPF immünreaktiviteleri pozitif olması primordiyal germ hücrelerinde bu iki faktörün salgılandığını göstermektedir. Primer foliküllerde hem siklin B hem de MOS un immünreaktivitelerin artışı ile birlikte bu iki faktör MPF aktivasyonunu sağlamaktadır. Primer foliküllerde MPF'nin salgısının artmış olması ile maturasyon için gerekli olan tetiklenmenin sonucunda oosit maturasyonu ile birlikte foliküler gelişimde görülmesi olağandır. Sekonder foliküllerde ise Siklin B immünreaktivitesi hem MOS hemde Emi oranla daha fazla görülmüştür. Fakat hem Siklin B nin sekonder foliküllerdeki salgısı hemde MOS un graaf foliküllerdeki salgısı ile MPF Graaf foliküllerde daha fazla görülmektedir. Bu da Graaf foliküllerinde oositlerin Metafaz II de arrestte kalmasını sağladığından dolayı artış olduğu düşünülmüştür. Emi nin salgısı özellikle Mayoz I sonu ve Mayoz II sonunda başlayıp Mayoz II de devam ettiğinden

dolayı çalışmamızda Primordiyal ve primer foliküllerde görülmemesi olağandır. Özellikle sekonder foliküllerde başlayan immunoreaktivite graaf foliküllerde artarak devam etmiştir. Emi'nin bu salgısı oosit maturasyonu için gerekli dönemde gerçekleşmiştir. TUNEL pozitif hücreler oositlerde sadece arrest olan oositlerde görülür. İncelenen kesitlerde TUNEL pozitif hücrelerin ovaryan dokusu içerisinde sadece foliküller hücrelerde oldukları en fazla ise graaf foliküllerinde görülmesinin sebebi ovulasyona hazırlık aşamasında olan graaf foliküllerdeki hücrelerin ve hücreler arası bağlantı komplekslerin azalması, hücre canlılık sinyal yollarının inhibisyonuna sebep olmakta sadece zona pellusidaya bağlı olan hücrelere oosit tarafından canlı kalma sinyalinin gelmesiyle apoptotik mekanizmalardan korundukları düşünülmüştür.

Sonuç olarak, tubal sıvı ile oosit kültürünün oosit maturasyonunu desteklediği özellikle Siklin B salgısını tetiklediği, göz önüne alınırsa insandan elde edilen Metafaz I oositlerinin kültürü için Tubal sıvı ilavesi alternatif bir yöntem olabileceği sonucuna varıldı. Özellikle tubal sıvı kültür ortamına oosit maturasyonunu tetikleyici farklı maddelerin ilavesiyle yapılacak olan kültürlerde bu elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabileceği ve yine alternatif yöntemler geliştirilebileceği için bir önce çalışma olmuştur. Farklı kişilerden alınan tubal sıvı örneklerinde farklı moleküllerin yer alabileceği göz önüne alınabilmelidir. Bundan sonraki çalışmalarda özellikle insan tubal sıvı örneklerinin içeriğini ortaya koyacak analizlerini ayrıntılı olarak yapılması, oosit maturasyonunu tetikleyici faktörlerin eksikliği veya azlığı var ise onların ilavesi yapılarak oosit maturasyonu için özel kültür ortamları oluşturulabilir. Özellikle bu çalışma sonrasında elde edilecek veriler ile farklı evrelerde toplanan oositlerin farklı kültür ortamlarındaki gelişimlerinin eldesi ile IVF kliniklerinde de kullanılabilecek yöntemlere alternatif bir yöntem olacağı düşünülebilir. IVF kliniklerinde toplanan oositlerin kültür ortamı farklılığından dolayı oluşabilecek problemler (arrest, matürasyonun oluşmaması, oosit kalitesinin bozulması vb) de değerlendirilebilecek ve sadece kültür farklılığından oosit kalitesinin bozulmasından dolayı kaliteli embriyo elde edilememesinden, başarısız implantasyona kadar olan problemlerden kültür ortamının etkisi unutulmamalıdır. Sadece kültür ortamından doğan problemlerden dolayı transfer edilen embriyoların implantasyon problemleri azaltılabileceğinden ekonomik açıdan kazanç sağlanacaktır. İlk deneme sürecinde kültür ortamından doğan problemler ortadan

kalktığından dolayı eşlerin tedavi süreleri azalacak ve bu açıdan da ekonomik kazanç sağlanabileceği düşünülebilir. Oosit maturasyonu için kültür şartlarının geliştirilmesi hem bireysel hemde toplumsal fayda sağlayacağı göz önüne alındığında ekonomik katkıları dikkate alınmalıdır. Bu amaçla üretilecek olan yeni kültür ortamlarının geliştirilmesi ile hem AR-GE olanakları hemde firmaların katkısı artacağından ekonomi hızlanacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada tubal sıvı ilavesi ile Metafaz I oositlerin Metafaz II'ye dönme potansiyellerinin ilave olmayan gruplara göre daha iyi olmasından dolayı tubal sıvı ilavesinin oosit maturasyonu için bir kültür ortamı olabileceği düşünüldü. Bundan sonraki çalışmalar ile tubal sıvı içeriğinin analizinin yapılması ve ticari olarak oosit maturasyonunda kullanılacak kültür ortamlarına tubal sıvıda elde edilen faktörlerin ilavesi yapılarak yeni kullanılabilir malzemeler üretilebilir. Ticari olarak üretilecek olan yeni malzemelerin hem hayvan hemde insan oosit maturasyonunda ki yeri incelenerek rutin kullanıma geçip geçmeyeceğine karar verilmesi gerekmektedir. Ayrıca farklı tubal oranlarda tubal sıvı ilave edilmiş ortamlarında oosit maturasyonundaki değişikliklerin de incelenmesi rutin kullanım açısından önemlidir.

6. KAYNAKLAR

1. **Ross HM**, Kaye GI, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas. 6. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2011; 830-896.
2. **Junqueira LC**, Carneiro J. Basic Histology. McGraw&Hill 10. Ed. 2006; 449-465.
3. <http://cultureshift.tumblr.com/post/60319463228/fertilization-occurs-when-a-sperm-meets-and>
4. <http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Zygote>
5. **Jamnongjit, M.** and S. R. Hammes. "Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell." Semin Reprod Med, 2005; 23(3): 234-41.
6. **Moore KL**, Persaud TVN, Klinik Yönleri ile insan Embriyolojisi, Nobel Tıp Kitapevleri, 6.Baskıdan Çeviri, 2002; 223–344.
7. **T.W.SADLER**, Langman's Medikal Embriyoloji, Palme Yayıncılık, 6. Baskıdan çeviri, 1993; 8-13.
8. <http://homeostasisinreproduction.wikispaces.com/Oogenesis+and+Ovulation>
9. **Amélie Juanchich**, Aurélie Le Cam, Jérôme Montfort, Yann Guiguen, Julien Bobeş, Identification of Differentially Expressed miRNAs and Their Potential Targets During Fish Ovarian Development, BOR Papers in Press. Published on April 17, 2013 as DOI:10.1095/biolreprod.112.105361.
10. **McLaren A**, Lawson KA. How is the mouse germ-cell lineage established? Differentiation. 2005 Dec;73(9-10):435-7.
11. **Ding X**, Zhang X, Mu Y, Li Y, Hao J., Effects of BMP4/SMAD signaling pathway on mouse primordial follicle growth and survival via up-regulation of Sohlh2 and c-kit. Mol Reprod Dev. 2013 Jan;80(1):70-8.
12. **Pepling, M. E.** and A. C. Spradling. "Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts." Development.1998; 125(17): 3323-8.
13. **Møllgård K**, Jespersen A, Lutterodt MC, Yding Andersen C, Høyer PE, Byskov AG, Human primordial germ cells migrate along nerve fibers and Schwann cells from the dorsal hind gut mesentery to the gonadal ridge. Mol

Hum Reprod. 2010 Sep;16(9):621-31. doi: 10.1093/molehr/gaq052. Epub 2010 Jun 21.

14. **Tam PP** and Z. SX. (1996). "The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo."
15. **Motta, P. M.**, S. Makabe, et al. (1997). "The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation
16. **Schoenwolf, C. B.** Bleyl, ve ark.2009. "Larsen's Human Embryology "
17. **Resim:** Modified from Simpson JL, Rajkovic A. Ovarian differentiation and gonadal failure. Am J Med Genet 1999;89:186-200 and Choi Y, Rajkovic A. Genetics of mammalian folliculogenesis. Cell Mol Life Sci 2006;63(5):579-590.
18. **Besmer P**, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. Dev Suppl. 1993:125-37. Review. PubMed PMID:7519481.
19. **Miyoshi T**, Otsuka F, Nakamura E, Inagaki K, Ogura-Ochi K, Tsukamoto N, Takeda M, Makino H.) Regulatory role of kit ligand-c-kit interaction and oocyte factors in steroidogenesis by rat granulosa cells. (Mol Cell Endocrinol. 2012 Jul 6;358(1):18-26.
20. **Tomoko Miyoshi**, Fumio Otsuka,Eri Nakamura,Kenichi Inagaki, Kanako Ogura-Ochi, Naoko Tsukamoto, Masaya Takeda, Hirofumi Makino, Regulatory role of kit ligand–c-kit interaction and oocyte factors in steroidogenesis by rat granulosa cellsVolume 358, Issue 1, 6 July 2012, Pages 18–26.
21. **Wong TT, Collodi P.** Effects of specific and prolonged expression of zebrafish growth factors, Fgf2 and Lif in primordial germ cells in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jan 4;430(1):347-51.
22. **Eileen A**, McLaughlin and Skye C McIver, Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development, Published online before printSeptember 30, 2008, doi:10.1530/REP-08-0118

23. **Cooke JE**, Heasman J, Wylie CC. The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cell numbers. *Dev Biol.* 1996 Feb 25;174(1):14-21.
24. **Greenfeld CR**, Roby KF, Pepling ME, Babus JK, Terranova PF, Flaws JA. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 2 is an important mediator of TNF alpha function in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 2007 Feb;76(2):224-31.
25. <http://www.reproduction-online.org/content/132/2/191/F3.expansion.html>
26. <http://humupd.oxfordjournals.org/content/12/5/537/F1.expansion.html>
27. **Pesce M**, Canipari R, Ferri GL, Siracusa G, De Felici M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse primordial germ cells. *Development.* 1996 Jan;122(1):215-21.
28. **Byskov AG**, Guoliang X, et al. (1997). "The cortex-medulla oocyte growth pattern is organized during fetal life: an in-vitro study of the mouse ovary."
29. **Molyneaux, K. A.**, J. Stallock, et al. (2001). "Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration." *Dev Biol* 240(2): 488-98.
30. **McLaren, A.** (2000). "Germ and somatic cell lineages in the developing gonad." *Mol Cell Endocrinol* 163(1-2): 3-9.
31. **Shinichiro Chumaa,b,c,d**, and d. Norio Nakatsujia, 1 (2000). "Autonomous Transition into Meiosis of Mouse Fetal Germ Cells in Vitro and Its Inhibition by gp130-Mediated Signaling."
32. **Pepling, M. E.** and A. C. Spradling (2001). "Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles." *Dev Biol* 234(2): 339-51.
33. **Primordiyal follikül, primer follikül, sekonder follikül ve graaf follikül:**
<http://zoomify.lumc.edu/histone/female/female/dms174/popup.html>
34. **Epifano, O.** and Dean, J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002;13:169-173.
35. **Epifano, O.** and Dean, J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002;13:169-173.
36. **Minegishi T**, Kishi H, Tano M, Kameda T, Hiakawa T, Miyamoto K. Control of FSH receptor mRNA expression in rat granulosa cells by 39,59-cyclic

adenosine monophosphate, activin, and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* 1999;149:71–77.

37. **Gougeon A.** Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* 1996;17:121-155.
38. **Cecos F, Schwartz D, Mayaux MJ** 1982 Female fecundity as a function of age. *New England Journal of Medicine* 1982;306:404-406.
39. **Piette C, de Mouzon J, Bachelot A, Spira A.** In-vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rates. *Human Reproduction* 1990;5:56-59
40. **Cortvrindt RG and S. JE.** (2002). "Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in-vitro testing of ovarian function?".
41. **Dong, H. S. L. Li, et al.** (2009). "Premeiotic fetal murine germ cells cultured in vitro form typical oocyte-like cells but do not progress through meiosis." *Theriogenology* 72(2): 219-31.
42. **Eppig, J. J. and M. J. O'Brien** (1996). "Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles." *Biol Reprod* 54(1): 197-207.
43. **Matzuk MM, Lamb DJ.** Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nature Medicine*.2002; 8(S1): 33-40.
44. **Matur İ, Solmaz S.** [Molecular Basis of Ovarian Follicle Contents Development]. *Archives Medical Review Journal*. 2010; 19(4): 193-205. Turkish.
45. **Zhang, Z. P., G. J. Liang, et al.** (2012). "Growth of mouse oocytes to maturity from premeiotic germ cells in vitro." *PLoS One* 7(7): e41771.
46. **Shen, W, D. Zhang, et al.** (2006). "Live offspring produced by mouse oocytes derived from premeiotic fetal germ cells." *Biol Reprod* 75(4): 615-23.
47. **McLaren A and S. D.** (1997). "Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis." *Dev Biol*.
48. **Obata, Y, T. Kono, et al.** (2002). "Gene silencing: maturation of mouse fetal germ cells in vitro." *Nature* 418(6897): 497.
49. **Ethier, J. F. and J. K. Findlay** (2001). "Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues." *Reproduction* 121(5): 667-75.

50. **Coutts SM**, Childs AJ, et al. (2008). "Activin signals via SMAD2/3 between germ and somatic cells in the human fetal ovary and regulates kit ligand expression." *Dev Biol*.
51. **Norwitz, E. R.**, S. Xu, et al. (2002). "Activin A augments GnRH-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH receptor gene." *Endocrinology* 143(3): 985-97.
52. **Alak, B. M.**, S. Coskun, et al. (1998). "Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro." *Fertil Steril* 70(6): 1126-30.
53. **Fortune JE**. The Early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 78. 2003. 135–163.
54. **Webb R**, Garnsworthy PC, Gong JG et al. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci*. 2004. 82:E63-74.
55. **Knight PG** and Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006. 132 191–206.
56. **Picton HM**, Haris SE, Muruvi W et al. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 2008. 136 703–715.
57. http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=File:Gap_junctions_between_oocyte_and_granulosa_cells.jpg
58. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720703005276>
59. **Amélie Juanchich**, Aurélie Le Cam, Jérôme Montfort, Yann Guiguen, Julien Bobeş, Identification of Differentially Expressed miRNAs and Their Potential Targets During Fish Ovarian Development, *BOR Papers in Press*. Published on April 17, 2013 as DOI:10.1095/biolreprod.112.105361.
60. **Kuyucu Y**, Tap Ö. [Oocyte Maturation Process and Affecting Factors]. *Archives Medical Review Journal*. 2009; 18(4): 227-240. Turkish.
61. **Sahla O**, Abusheika N and Sharma V. Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, No. 6 pp. 816-832.

62. **Liu YX.** Interaction and signal transduction between oocyte and somatic cells in the ovary. *Bioscience*. 2007. 12, 2772-2796.
63. <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1487/figures.htm>
64. **Hammes SR.** The further redefining of steroid-mediated signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. Vol. 100, no. 5. 2168–2170.
65. **Zhang M,** Ouyang H and Xia G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular Human Reproduction*. 2009. 15(7):399-409.
66. **Abramovich SS,** Edry I, Galiani D et al. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*. 2006. 147: 2280–2286.
67. <http://humupd.oxfordjournals.org/content/13/3/289.full.pdf+html>
68. **Valdimarsson G,** De Sousa PA and Kidder GM. Coexpression of gap junction proteins in the cumulus–oocyte complex *Molecular Reproduction and Development* 1993: 36;7–15.
69. **Li R** and Mather JP. Lindane, an inhibitor of gap junction formation, abolishes oocyte directed follicle organizing activity in vitro. *Endocrinology* 1997:138;4477–4480.
70. **Önder Celik,** Yardımcı üreme teknikleri, Nobel Kitabevi 2011.
71. http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=File:Gap_junctions_between_oocyte_and_granulosa_cells.jpg
72. **Dietl, J.** (1989) Ultrastructural aspects of the developing mammalian zona pellucida. In Dietl, J. (ed.), *The Mammalian Egg Coat*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 49-60.
73. **Beleil, J.D.** and Wassarman, P.M. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 1980:76;185-202.
74. <http://pryorwild.wordpress.com/2010/01/13/january-12-2010-how-does-pzp-work-part-2-pzps-function/>

75. **Yan, C.**, Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L. et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol. Endocrinol.* 2001;15;854-866.
76. **Kumar, T.R.**, Wang, Y., Lu, N. and Matzuk, M.M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.* 1997: 15;201-204.
77. **Bornslaeger, E.A.**, Mattei, P. and Schultz, R.M. Involvement of cAMP dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 1986;114;453-462.
78. **Richards, J.S.**, Russell, D.L., Ochsner, S. and Espey, L.L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu. Rev. Physiol.* 2002: 64;69-92.
79. <http://jcs.biologists.org/content/118/22/5257/F10.expansion.html>
80. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720701006141>
81. **Carabatsos, M.J.**, Elvin, J., Matzuk, M.M. and Albertini, D.F. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev. Biol.* 1998;204;373-384.
82. **Wiktor-Jedrzejczak, W.**, Gordon, S. Cytokine regulation of the macrophage (Mf) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol. Rev.* 1996: 76;927–947.
83. **Pollard, J. W.** Stanley, E. R. Pleiotropic roles for CSF-1 in development defined by the mouse mutation osteopetrotic (op). *Adv. Dev. Biochem.* 1996;4;153–193.
84. **Masui Y.** From Oocyte Maturation To The In Vitro Cell Cycle: The History Of Discoveries Of Maturation-Promoting Factor (MPF) And Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation.* 2001 Dec;69(1):1-17
85. **Behringer RR,** Finegold MJ, Cate RL. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994;79:415–25.

86. **Durlinger AL**, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789 – 96.
87. **Weenen C**, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti- Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77–83.
88. **Axel P. N.** Themmen Anti-Müllerian Hormone: Its Role in Follicular Growth Initiation and Survival and as an Ovarian Reserve Marker *J Natl Cancer Inst* 2005; 34:18 – 21
89. <http://www.reproduction-online.org/content/131/1/1/F2.expansion.html>
90. **Tesarik J**, Mendoza C. Nongenomic effects of 17 β -estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1438– 1443.
91. **Pelletier G**, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors and b in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4835–4840
92. <http://mend.endojournals.org/content/24/12/2303/F7.expansion>
93. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982205007748>
94. **Sema Birlir**, Serhat Pabuççuoğlu, I. Kamuran İleri, Serhat Alkan, Mithat Evecen, Sığır Oositlerinin In Vitro Olgunlaştırılmasında Farklı Sürelerin Etkisi, *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 22 (1998) 551–557, © TÜBİTAK
95. **McGee EA**, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21:200–214.
96. http://www.wormbook.org/chapters/www_controloocytematuration/controloocytematuration.html
97. <http://www.reproduction-online.org/content/130/6/801.figures-only>
98. **I.A.J. van Rooij**, F.J.M. Broekmans, E.R.te Velde, B.C.J.M. Fauser. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2002;17(12):3065-3071.

- 99. Teixeria J, Maheswaran S, Donahoe PK.** Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr.Rev.* 2001;22(5):657-674.
- 100. Gruijters M.J., Visser J.A., Durlinger A.L., Themmen A.P.** Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;211(1-2):85-90
- 101. Uzmanlık tezi, Dr. Zeyneb Bayramoğlu Bakacak, Antimüllerian Hormonun İVF sikluslarında over rezervini Belirtmedeki Rolü, 2005.**
- 102. Tunquist BJ and Maller JL.** Under arrest: Cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev.* 2003. 17: 683-710.
- 103. Fan HY and Sun QY.** Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction.* 2004. 70, 535–547.
- 104. Mayes M (2002).** The meiotic arrest of bovine oocytes. Département des sciences animales Faculte des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Universitélaval Québec PhD thesis. De l'Université Laval, Quebec-Canada.
- 105. Johnson, J, J. Canning, et al. (2004).** "Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary." *Nature* **428**(6979): 145-50.
- 106. Byung Chul Jee, Hye Jin Chang, Sang Hoon Han, Jung Ryeol Lee, Byoung Ick Lee, Chang Suk Suh, Seok Hyun Kim, (2010/6/30),''** Impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve: serial changes of serum anti-Müllerian hormone levels'', *Fertility and sterility* 94 (1), 343-349.
- 107. Anwar A, Moussa MD.** In vitro maturation of oocytes. *OBGYN.net* Advertisement. Jan: 2002.
- 108. Akyol N.** İn vitro sığır embriyosu üretimi. *Embriyo Transferi (Bülten).* 17 Aralık 2008.
- 109. Saumen Kumar Maitra, Asamanja Chatteraj, Sourav Mukherjee, Mahammed Moniruzzaman, Melatonin: A potent candidate in the regulation of fish oocyte growth and maturation, Gen Comp Endocrinol. 2013 Jan 15;181:215-22. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.09.015. Epub 2012 Oct 6.**

110. [http://www.naturalsciences.be/institute/associations/rbzs_website/bjz/back/pdf/BJZ%20137\(2\)/137_2_209_214html/Volume%20137\(2\),%20pp.%20209-214.html](http://www.naturalsciences.be/institute/associations/rbzs_website/bjz/back/pdf/BJZ%20137(2)/137_2_209_214html/Volume%20137(2),%20pp.%20209-214.html)
111. **Cooper GM**, Hausman RE, The Cell, A Molecular Approach, 4. Ed. ASM Pres, Washington, USA. 2007; 603-641.
112. **Masui Y**, From Oocyte Maturation To The In Vitro Cell Cycle: The History Of Discoveries Of Maturation-Promoting Factor (MPF) And Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation*. 2001 Dec;69(1):1-17.
113. http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lec/lec_17_fert/lec17_images.html
114. **Stephane Brunet** and Bernard Maro, Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space, *Reproduction* (2005) 130 801–811. <http://www.reproduction-online.org/content/130/6/801.figures-only>
115. **Lastro M**, Collins S, Currie WB., Adenylyl Cyclases In Oocyte Maturation: A Characterization Of AC Isoforms In Bovine Cumulus Cells. *Mol Reprod Dev*. 2006 Sep;73(9):1202-10.
116. **Kubelka M**, Motlik J, Fulka JJ, Prochazka R, Rimkevickova Z, Fulka J. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gam. Res*. 1988; 19: 423-431.
117. http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Cell_Cycle_And_Its_Regulation.htm
118. **Mehlmann LM**. Stops And Starts In Mammalian Oocytes: Recent Advances In Understanding The Regulation Of Meiotic Arrest And Oocyte Maturation. *Reproduction*. 2005 Dec;130(6):791-9
119. **Kierszenbaum AL**. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, 398, Ankara, 2006;531-588.
120. **Conti M**. Specificity of the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Signal in Granulosa Cell Function. *Biology of Reproduction* 2002;67:1653–1661.

- 121. Jablonka-Shariff A**, Olson LM. The Role Of Nitric Oxide In Oocyte Meiotic Maturation And Ovulation: Meiotic Abnormalities Of Endothelial Nitric Oxide Synthase Knock-Out Mouse Oocytes. *Endocrinology*. 1998 Jun;139(6):2944-54.
- 122. Richard FJ**, Tsafiriri A, Conti M. Related Articles, Role Of Phosphodiesterase Type 3A In Rat Oocyte Maturation. *Biol Reprod*. 2001 Nov;65(5):1444-51.
- 123.** http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lec/lec_17_fert/lec17_images.html#anchor3398611
- 124. Mehlmann LM**, Jones TL, Jaffe LA. Meiotic Arrest in The Mouse Follicle Maintained by a Gs Protein in The Oocyte. *Science*. 2002; 297(5585):1343–5.
- 125. Kalinowski RR**, Berlot CH, Jones TLZ, Ross LF, Jaffe LA, Mehlmann LM. Maintenance of Meiotic Prophase Arrest in Vertebrate Oocytes by a Gs Protein-Mediated Pathway. *Developmental Biology* 2004;267:1-13.
- 126. Webb RJ**, Bains H, Cruttwell C, Carroll J. Gap-Junctional Communication in Mouse Cumulus–Oocyte Complexes: Implications for the Mechanism of Meiotic Maturation *Reproduction* 2002; 123, 41–52.
- 127. Mehlmann LM**, Kalinowski RR, Ross LF, Parlow AF, Hewlett EL, Jaffe LA. Meiotic Resumption In Response To Luteinizing Hormone Is Independent Of A G(i) Family G Protein Or Calcium In The Mouse Oocyte. *Dev Biol*. 2006 Nov 15;299(2):345–55.
- 128. Soderling SH**, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP Signaling: New Phosphodiesterases and New Functions. *Current Opinion in Cell Biology* 2000; 12: 174–179.
- 129.** <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028212005699>
- 130. Murthy KS**, Zhou H, Makhoul GM, PKA-Dependent Activation Of PDE3A And PDE4 And Inhibition Of Adenylyl Cyclase V/VI In Smooth Muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Mar;282(3):C508-17.
- 131. Nakamura Y**, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H, Kato H. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol Reprod*. 2002 Nov;67(5):1588-92.

- 132. Sela-Abramovich S**, Galiani D, Nevo N, Dekel N. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biol Reprod.* 2008 Jun;78(6):1111-8.
- 133.** http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Theca+Cells&lang=1
- 134. Yao J**, Hiramatsu N, Zhu Y, Morioka T, Takeda M, Oite T, Kitamura M. Nitric oxidemediated regulation of connexin43 expression and gap junctional intercellular communication in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jan;16(1):58-67.
- 135. Tesfaye D**, Kadanga A, Rings F, Bauch K, Jennen D, Nganvongpanit K et al. The Effect of Nitric Oxide Inhibition and Temporal Expression Patterns of the mRNA and Protein Products of Nitric Oxide Synthase Genes During In Vitro Development of Bovine Pre-implantation Embryos. *Reprod Dom Anim* 2006; 41:501–509.
- 136. Jablonka-Shariff A**, Olson LM. The Role Of Nitric Oxide In Oocyte Meiotic Maturation And Ovulation: Meiotic Abnormalities Of Endothelial Nitric Oxide Synthase Knock-Out Mouse Oocytes. *Endocrinology.* 1998 Jun;139(6):2944-54
- 137. Reimann JD**, Jackson PK. Emi1 is required for cytotstatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature.* 2002 Apr 25;416(6883):850-4. PubMed PMID: 11976684.
- 138. Holt JE**, Lane SI, et al. (2013). "The control of meiotic maturation in mammalian oocytes.". *Curr. Top. Dev. Biol.* 102: 207-26.
- 139. Luo J**, McGinnis LK, Kinsey WH. Role of Fyn kinase in oocyte developmental potential. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22(6):966-76. doi: 10.1071/RD09311.
- 140. Ross HM**, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas.* 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757.
- 141. Adhikari D**, Liu K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol.*2013 Aug 3. doi:pii: S0303-7207(13)00321-3. 10.1016/j.mce.2013.07.027.

- 142. Karen Wigglesworth, Kyung-Bon Lee, Marilyn J. O'Brien, Jia Peng, Martin M. Matzuk and John J. Eppig** Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. vol. 110 no. 39, Contributed by John J. Eppig, August 5, 2013 (sent for review July 16, 2013)
- 143.** <http://www.pnas.org/content/110/39/E3723/F1.expansion.html>
- 144. Eva Hörmanseder; Thomas Tischer; Thomas U Mayer** Modulation of cell cycle control during oocyte-to-embryo transitions. The EMBO journal 2013 Vol: 32(16):2191-2203.
- 145.** <http://www.reproduction-online.org/content/130/6/801.figures-only>
- 146. Jewgenow K, Heerdegen B, Müller K (1999).** In vitro development of individually matured bovine oocytes in relation follicular wall atresia. Theriogenology, 51: 745-756.
- 147. Svanberg B, 1999.** Apoptosis the cellular mechanism of rat ovarian follicular atresia. Doctora Thesis, Göteborg University, Sweden.
- 148. Gordon I (1994).** Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International CoWallingford UK.
- 149. Zeuner A, Müller K, Reguszynski K, Jewgenow K, 2003.** Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. Theriogenology, 59 (5-6): 1421-1433.
- 150. Alper KOÇYIĞİT, Mesut ÇEVİK, Memeli Reprodüktif Dokuları, Gamet Hücreleri ve Embriyolarında Apoptozis, Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2011; 8(1) 33-41.**
- 151. Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F, 2002.** Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. Mol ReprodDev, 61 (2): 180-186.
- 152. Svensson E, 2001.** Regulation of apoptosis and steroidogenesis in ovarian preovulatory granulosa cells. Doctora thesis, Department of Physiology and Pharmacology, Göteborg University, Sweden.
- 153. Palumbo A, Yeh J, 1994.** In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. Biol Reprod, 51 (5): 888-895.

- 154. Yang YM, Rajamahendran R, 2000.** Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-1 on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod*, 62 (5):1209-1217.
- 155.** <http://www.studyblue.com/notes/note/n/reproductive-histology/deck/7435543>
- 156. Doktora tezi,** Oosit olgunlaşmasında Nitrik Oksitin Rolü, Hakan Darıcı, Danışman: Doç. Dr. Meral ÖNCÜ, 2007
- 157. Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, et al. (1973).** "Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of *cdc* Mutants." *Genetics* 74(2): 267-86.
- 158. Evans T, Rosenthal ET, et al. (1983).** "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." *Cell*.
- 159. holtand J. L. Maller (1991).** "Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation." *EMBO J*.
- 160.** http://missinglink.ucsf.edu/lm/cell_cycle/cdks.html
- 161. Kishimoto, T. (2003).** "Cell-cycle control during meiotic maturation." *Curr Opin Cell Biol* 15(6): 654-63.
- 162. Harbour, J. William, and Douglas C. Dean.** "Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis." *Nature Cell Biology* 2.4 (2000): E65-E67.
- 163. Sherr, Charles J.** "Cancer cell cycles." *Science* 274.5293 (1996): 1672-1677.
- 164. Royzman I, Hayashi-Hagihara A, Dej KJ, Bosco G, Lee JY, Orr-Weaver TL.** The E2F cell cycle regulator is required for *Drosophila* nurse cell DNA replication and apoptosis. *Mech Dev.* 2002 Dec;119(2):225-37.
- 165. Holt JE, Lane SI, et al. (2013).** "The control of meiotic maturation in mammalian oocytes." *Curr. Top. Dev. Biol.* 102: 207-26.
- 166.** <http://themedicalbiochemistrypage.org/cell-cycle.php>
- 167.** http://www.nature.com/onc/journal/v26/n30/fig_tab/1210226f3.html
- 168.** http://en.wikipedia.org/wiki/File:Signal_transduction_pathways.svg

- 169. Delilbaşı L.** İn vitro Fertilizasyon (İVF) Laboratuvar Yöntemleri 2008. Güneş Tıp Kitapevi, 89-104.
- 170. Delilbaşı L.** 10, Tüp Bebek: Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuvar Yöntemleri. Bayındır Sağlık, Eğitim ve Araştırma Vakfı, Ankara, 1997;102-103.
- 171. Stephanie Beall,** Carol Brenner, James Segars, Oocyte maturation failure: a syndrome of bad eggs, Fertility and Sterility, Volume 94, Issue 7 , Pages 2507-2513, December 2010.
- 172. Gardner DK,** Lane M, Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum Reprod Update. 1997 Jul-Aug;3(4):367-82.
- 173. McKiernan SH,** Bavister BD, Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. Hum Reprod. 2000 Jan;15(1):157-64.
- 174. Kölle S,** Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F, 2002. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. Mol ReprodDev, 61 (2): 180-186.
- 175. Svensson E,** 2001. Regulation of apoptosis and steroidogenesis in ovarian preovulatory granulosa cells. Doctora thesis, Department of Physiology and Pharmacology, Göteborg University, Sweden.
- 176.** <http://molehr.oxfordjournals.org/content/15/12/843/F1.expansion>
- 177. Günes H.** Sitokinlerin hücre döngüsü üzerine etkileri. Tr. J. of Biology,1998; 23 : 283–292
- 178. Heikinheimo O,** Gibbons WE. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. Molecular Human Reproduction 1998; 4(8):745–756.
- 179. Jamnongjit, M.** and S. R. Hammes (2005). "Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell." Semin Reprod Med 23(3): 234-41.
- 180. Gilchrist RB,** Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Human Reproduction Update. 2008; 14(2): 1559-177.

- 181. D. Richani**, L.J. Ritter, J.G. Thompson, and R.B. Gilchrist, Mode of oocyte maturation affects EGF-like peptide function and oocyte competence, Submitted on February 7, 2013; resubmitted on April 12, 2013; accepted on April 14, 2013.
- 182. Tervit HR**, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil.* 1972 Sep;30(3):493-7. PubMed PMID: 4672493.
- 183. Menezo Y.** [Synthetic medium for gamete survival and maturation and for culture of fertilized eggs]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1976 Jun 14;282(22):1967-70.
- 184. Quinn P**, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril.* 1985 Oct;44(4):493-8.
- 185. Gardner DK**, Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil.* 1990 Jan;88(1):361-8.
- 186. Menezo Y**, Testart J, Perrone D. Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer. *Fertil Steril.* 1984 Nov;42(5):750-5.
- 187. Quinn P.** Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J Assist Reprod Genet.* 1995 Feb;12(2):97-105.
- 188. Gardner DK.** Blastocyst culture: toward single embryo transfers. *Hum Fertil (Camb).* 2000;3(4):229-237.
- 189. Barnes FL**, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J, Wood C, Trounson AO. Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod.* 1995 Dec;10(12):3243-7.
- 190. Summers MC**, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update.* 2003 Nov-Dec;9(6):557-82.