

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak.



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU SONRASI
3 PRONUKLEUSLU OOSİTLERDE MİTOKONDİRİ
AKTİVİTESİ VE HÜCRE İSKELETİ
ORGANİZASYONUNUN İNCELENMESİ**

TUĞBA KOTİL

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEYHUN SOLAKOĞLU**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tuğba Kotil (İmza)

İTHAF

Tezimi gerçek anlamda ona doyamadan kaybettiĐim deĐerli dedem makine mühendisi
Ahmet Tokan’a ithaf ediyorum. Mekanı cennet olsun.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmalarım sırasında bana ışık tutup her konuda destek veren danışman hocam Prof. Dr. Seyhun Solakoğluna en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez konumun belirlenmesinde önerilerini ve derin bilgisini paylaşan ve çalışmalarımın devam edebilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Ertan Kervancioğlu'na çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında karşılaştığım olumsuzluklar karşısında önerilerini ve yardımlarını sunan ve bana moral veren Prof. Dr. Leyla Tapul ve Prof. Dr. Filiz Aydın'a teşekkür ederim.

Elektron mikroskop çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Biyolog Fadime Aktar ve Biyolog Ebru Karabulut Akyön'e teşekkür ederim.

İmmunfloresan bulgularımın elde edilme sürecinde benimle birlikte çalışan ve metodik olarak bana tavsiyelerde bulunan Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Uzman Dr. Bilge Özerman Edis'e teşekkür ederim.

Tezim için kullanılacak materyalin temin edilmesinde bana yardımcı olan 29. Mayıs Hastanesi IVF ünitesi çalışanı Biyolog Gülçin Ekter Kanten'e ve Zeynep Kamil Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek merkezi çalışanı Uzm. Dr. Gülden Tunalı'ya ve International Hospital IVF ünitesi çalışanı Tıbbi Biyolog Ersin Devseren'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin özetini Fransızcaya çeviren ve bu sıkıntılı süreçte manevi desteği ile hep yanımda olan arkadaşım Biyolog Türkan Sarıoğlu'na çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **3287**

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
RESUME	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Ovaryum Gelişimi ve İşlevi	5
2.2. Oosit Olgunlaşma Süreci	5
2.2.1. Nuklear Olgunlaşma.....	6
2.2.2. Sitoplazmik Olgunlaşma	7
2.3. Fertilizasyon	7
2.4. Anormal Sayıda Pronukleuslu Zigotlar	11
2.4.1. Üç Pronukleuslu Zigotların Oluşması.....	11
2.5. Sitoplazmik Olgunlaşma ve Ooplazmanın Düzeni.....	12
2.5.1. Mitokondri.....	12
2.5.1.1. Mitokondri Dağılımı.....	13
2.5.1.2. Mitokondri Yapısı	14
2.5.1.3. Mitokondrinin Görevleri.....	15
2.5.2. Endoplazma Retikulumu	16
2.5.3. Hücre İskeleti Dinamikleri	17
2.5.3.1. Mikrotübüller	17
2.5.3.2. Mikrofilamanlar	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. 3 Pronukleuslu Oositlerin Temini:	22

3.2. Elektron Mikroskobu İncelemesi:	22
3.3. İmmünfloresan Çalışması:	23
3.4. Mitokondri Membran Potansiyelinin Değerlendirilmesi:	23
4. BULGULAR	25
4.1. Elektron Mikroskobu Bulguları:.....	25
4.2. İmmünfloresan Çalışmasının Bulguları:	45
4.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Çalışması Bulguları:	50
5. TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	68
FORMLAR	78
ETİK KURUL KARARI	79
ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİLLER LİSTESİ

Resim 4-1: Üç pronukleuslu oositin kortikal alanında sitoplazmik hale oluşumu.....	27
Resim 4-2a-b: Bazı 3 pronukleuslu oositlerin kortikal alanındaki DER vesiküllerinin ince yapısal görüntüsü.....	28
Resim 4-2c: Bazı 3 pronukleuslu oositlerin kortikal alanındaki DER vesiküllerinin ince yapısal görüntüsü.....	29
Resim 4-3: Ekzositoz olmamış kortikal granüller.....	29
Resim 4-4: Kortikal alandaki vakuoller.....	30
Resim 4-5: Düz yüzlü endoplazma retikulumu anormallikleri.....	31
Resim 4-6: Pronukleusların ooplazma içerisindeki konumu.....	32
Resim 4-7: Pronukleus ve NPClerin oluşum durumuna ait elektron mikroskop fotoğrafı.....	33
Resim 4-8: Seri kesitler üzerinden incelen nuklear prökürsör cisimlerin konumlarına ait şekil.....	34
Resim 4-9a-b: Sitoplazmik annulat lamel birikimine ait elektron mikroskobu fotoğrafı.....	35
Resim 4-9c-d: Sitoplazmik annulat lamel birikimine ait elektron mikroskobu fotoğrafı.....	36
Resim 4-10: İntrapronuklear annulat lamel birikimine ait elektron mikroskobu fotoğrafı.....	37
Resim 4-11: Pronukleus nuklear membranındaki invajinasyona ait elektron mikroskobu fotoğrafı.....	38
Resim 4-12a: Mitokondri ince yapı anormalliklerine ait elektron mikroskobu fotoğrafı.....	38
Resim 4-12b-c: Mitokondri ince yapı anormalliklerine ait elektron mikroskobu fotoğrafları.....	39
Resim 4-12d-e: Mitokondri ince yapı anormalliklerine ait elektron mikroskopi fotoğrafları.....	40
Resim 4-13: Multilamellar cisimlere ait elektron mikroskobu fotoğrafı.....	41
Resim 4-14: Golgi aygıtına ait elektron mikroskop fotoğrafı.....	42
Resim 4-15: Lipofuskin granüllerine ait elektron mikroskop fotoğrafları.....	43

Resim 4-16: Mikrotübüllere ait elektron mikroskobu fotoğrafları.....	44
Resim 4-17: Sentriole ait elektron mikroskop fotoğrafı.....	45
Resim 4-18a-b: Üç pronukleuslu oositlerde FITC – falloidin ile işaretlenen aktin filamanların düzenini gösteren floresan mikroskop fotoğrafı.....	46
Resim 4-18c: Üç pronukleuslu oositlerde FITC – falloidin ile işaretlenen aktin filamanların düzenini gösteren floresan mikroskop fotoğrafı.....	47
Resim 4-19a-b: Üç pronukleuslu oositlerde gama – tübülün dağılımını gösteren floresan mikroskop fotoğrafı.....	48
Resim 4-19c-d: Üç pronukleuslu oositlerde gama – tübülün dağılımını gösteren floresan mikroskop fotoğrafı.....	49
Resim 4-20a: Üç pronukleuslu oositlerde mitokondri membran potansiyelinin floresan mikroskop fotoğrafı.....	50
Resim 4-20b: Üç pronukleuslu oositlerde mitokondri membran potansiyelinin floresan mikroskop fotoğrafı.....	51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- 1PN: monopronuklear
2PN: bipronuklear
3PN: triprouuklear
AL: Annulat Lamel
ATP: Adenozin trifosfat
Ca⁺²: Kalsiyum
CDC42: Cell division cycle 42
CDK-1: Siklin dependent kinaz – 1
DER: Düz yüzlü endoplazma retikulumu
ER: Endoplazma Retikulumu
F-aktin: Filamentöz aktin
FFCP: Carbonyl cyanide p-(tri-fluoromethoxy) phenyl-hydrazone
FITC: Fluorescein isothiocyanate
FSH: Folikül stimulan hormon
GER: Granüllü endoplazma retikulumu
GV: Germinal Vezikül
GVBD: Germinal vezikül yıkılması
hCG: İnsan koryonik gonadotropin
HSA: İnsan serum albumin
ICSI: Intrastoplazmik sperm enjeksiyonu
InsP₃-R: İnositol trifosfat reseptörü
IVF: İn vitro fertilizasyon
LH: Lüteinizan hormon
MAPK: Mitojen activated protein kinaz
M-I: Metafaz I
M-II: Metafaz II
MPF: Maturasyon promoting faktör
mtDNA: Mitokondrial DNA

MTOC: Mikrotübül organize edici merkez

NPC: Nukleolar prekürsör cisim

NUMA: Nuclear Mitotic Apparatus

PB: Kutup cismi

PBS: Fosfat tamponu

PCM: Perisentriolar madde

PLC ζ : Fosfolipaz-C zeta

PN: Pronukleus

Ran GTPaz: RAs-related Nuclear protein guanozin trifosfataz

ROT: Reaktif oksijen türevleri

SERCA: Sarco/endoplasmic reticulum Ca⁺²-ATPase

DER-T: Düz yüzlü endoplazma retikulumu tübül kümeleri

DER-V: Büyük düz yüzlü endoplazma retikulumu vesikülleri

γ -TURC: Gama-tübülin halka kompleksi

Arp 2/3: Aktin related protein 2/3

JC-1: 5,5', 6,6'-tetrakloro- 1,1', 3,3' tetraetilbenzimidazolkarbosiyanin

ÖZET

Kotil, T. (2012). İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonrası 3 pronukleuslu oositlerde mitokondri aktivitesi ve hücre iskeleti organizasyonunun incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Amaç: Dijini, fertilizasyon sonrası ikinci kutup cisminin atılamayıp ooplazma içerisinde kalmasıyla üçüncü bir pronukleus oluşturma durumudur. Oosit olgunlaşmasında, fertilizasyon sırasında ve sonrasındaki gelişim sürecinde baskın organel olan mitokondri enerji üretimi ve Ca^{+2} metabolizmasını düzenlemesi açısından önemli rollere sahiptir. Oositte hücre iskelet elemanları mitotik iğ ipliğinin oluşması, kromozomların ayrışması, pronukleusların appozisyonu, sitokinezin normal bir şekilde gerçekleşmesinde rol alır. Çalışmamızda 3 pronukleuslu oositlerde mitokondri membran potansiyelinin durumu, hücre iskeleti elemanların düzeni ve bu anormal süreçle olan muhtemel ilişkisi ve 3 pronukleuslu oositlerin ince yapısal özellikleri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Yardımcı üreme teknikleri aracılığıyla gebe kalabilmek için IVF ünitelerine başvuran hastalardan bilgilendirme formu ile ICSI sonucu oluşmuş 3 pronukleuslu oositler alındı. %4'lük paraformaldehit ile tespit edilen oositlere anti-gama tübülün ve FITC-falloidin antikorları kullanılarak immünfloresan çalışma uygulandı. %1'lik gluteraldehit ile fikse edilen oositler elektron mikroskobu takibine alındı. Alınan ince kesitler Jeol Jem 1011 transmisyon elektron mikroskobu ile incelendi. Taze oositler mitokondri membran potansiyelinin değerlendirilmesi için JC-1 mitokondri boyası ile boyandı ve floresan mikroskopta değerlendirildi.

Bulgular: İncelendiğimiz oositlerde mitokondri membran potansiyeli boyanması iki pronukleuslu normal bir zigotta görülen özelliklere benzer sonuçlar verdi. Gama – tübülün subplazmalemmal alanda çok sayıda yaygın işaretlenme sergiledi. Mikrofilamanlar kortikal alanda mevcuttu, pronukleusların çevresinde izlenmedi. Bazı vakalarda sitoplazmik hale kısmen oluşurken bazılarında oluşmadığı, ooplazma içerisinde lipofuskin granüllerinin olduğu, mitokondride dejenerasyon ve multilamellar cisim oluşumu görüldü.

Sonuç: Elde edilen bulgulara göre ikinci kutup cisminin atılamamasında mitokondri membran potansiyelinin etkili olmadığı fikri ortaya çıkmıştır. Oosit kalitesindeki zayıflığa bağlı olarak hücre içi iskelet elemanlarında meydana gelmiş olan düzensizlikler bu anormal süreci tetikleyebilir.

Anahtar Kelimeler: Oosit, ICSI, mitokondri, hücre iskeleti, ince yapı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **3287**

ABSTRACT

Kotil, T. (2012). Investigation of mitochondrial activity and cytoskeleton organization in 3 pronuclear oocytes after intracytoplasmic sperm injection. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Department. PhD Thesis. İstanbul.

Introduction: Digyny, is the existence of the third pronucleus due to failure of the extrusion of the second polar body. The mitochondria of the oocyte have critical roles such as production of ATP or regulation of Ca^{+2} homeostasis during oocyte maturation, fertilization and subsequent development. The cytoskeleton of the oocyte has regulatory activity in meiotic spindle formation, chromosome segregation, pronuclear apposition and cytokinesis. In our study mitochondrial membrane potential, distribution of F- actin and gama- tubulin, and ultrastructure of the 3 pronuclear oocytes were investigated.

Material and Method: The 3 pronuclear oocytes after ICSI process were taken from patients who were engaged to assisted reproduction programme. Informed consents were taken from all patients. Some oocytes were fixed by %4 paraformaldehyde and treated by anti-gama tubulin and FITC – phalloidin antibodies for immunoflourescent study. Oocytes for the ultrastructural evaluation fixed with %1 glutaraldehyde. Sections were investigated by transmission electron microscopy. For mitochondrial membrane potential examination, fresh oocytes were stained with JC-1 and evaluated by fluorescent microscope.

Results: Mitochondrial membrane potential of three pronuclear oocytes showed similar results like normal zygotes. Gama – tubulin were stained widely at the subplasmalemmal domain and microfilaments were localized at the cortical area but not perinuclear. Cytoplasmic halo were partly or not detected. Lipofuscin granules, degenerated mitochondria and multilamellar bodies were seen in the ooplasm.

Conclusion: These findings suggest that mitochondrial membrane potential has not direct effect on extrusion of the second polar body. This abnormality can be triggered by disturbed cytoskeleton because of poor oocyte quality.

Key words: Oocyte, ICSI, mitochondria, cytoskeleton, ultrastructure

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. **3287**

RESUME

Kotil, T. (2012). Examinasson du squelette cellulaire et de l'activité mitochondriale des ovocytes a trois pronucléus apres injection intracytoplasmique de spermatozoide. Université d'Istanbul ensttue de santé, séction de Histologie et d'embryologie. Thèse de doctorat. İstanbul

L'objectif: La situation dite Dijini est la formation du troisième pronucléus par la remise dans l'ovoplasme du deuxième globule qui n'est pas jeté après la fécondation. La mitochondrie étant l'organelle dominant lors de la maturation ovocytaire, de la fécondation et de son développement, a des rôles essentiels a la fois en termes de production d'énergie et de régulation du métabolisme du Ca^{+2} . Les éléments du squelette cellulaire de l'ovocyte prennent rôle lors de la formation du fuseau mitotique, de la séparation des chromosomes, de l'apposition des pronucléus et de la réalisation d'une cytokinèse normale. L'étude du potentiel de la mitochondrie, l'ordre des éléments du squelette cellulaire, la relation éventuelle avec ce processus anormale et l'ultra structure des ovocytes à 3 pronucléus a été réalisés.

Matériels et méthodes : Les ovocytes à 3 pronucléus obtenues par ICSI ont été procuré des malades qui ont recourus a des techniques de procréation médicalement assistée sous la permission d'une forme d'information. il a été appliqué aux ovocytes fixés sous la paraformaldéhyde de 4% avec l'immunofluorescence, les anticorps tubuline anti-gama et phalloidine-FITC. Les ovocytes fixés sous glutaraldéhyde de 1% ont été préparé pour l'examen au microscope électronique. Les sections fines ont été analysées sous microscope électronique de transmission Jeol Jem 1011. Pour l'évaluation du potentiel des membranes mitochondriales des ovocytes fraîches, elles ont été colorées avec le colorant pour mitochondrie JC-1 et ont été valorisé sous microscopie fluorescent.

Résultats : Les examens des mitochondries des ovocytes ont donnés des résultats semblables a ceux des zygotes normal a deux pronucléus. La tubuline-gama a montré une notation répandue sous la membrane plasmique. Les micros filaments étaient présentent dans la zone corticale alors qu'ils n'ont pas été aperçues autour des pronucléus. Il a été observe que dans certains cas il y avait la formation d'une auréole cytoplasmique et dans d'autre pas. Des granules de lipofuscin, la dégénération de mitochondrie et des corps multi lamelles ont été vue dans l'ovoplasme.

Conclusion : Les résultats obtenus a fait posé l'idée, que lors la remise du second globule, le potentiel de la membrane mitochondriale n'avait aucun effet. La désorganisation de squelette cellulaire lié a la faiblesse de la qualité l'ovocyte peut déclencher ce processus anormal.

Mots clés : ovocyte, ICSI, mitochondrie, squelette cellulaire, ultra structure.

Cette étude a été soutenue par l'unité des projets de recherche scientifique. numéro du projet: **3287**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Graaf folikülünden atılan oosit ikinci mayoz bölünmenin metafaz (M-II) aşamasındadır. Spermin oosit sitoplazması içerisine girmesi ile oosit aktive olur, mayoz tamamlanır, ikinci kutup cismi (PB) atılır ve oosit sitoplazması içinde iki pronukleus (PN) gözlenir. PNlerden biri anneye, diğeri babaya ait haploid kromozom takımıdır. Bu iki PN'nin birleşmesi ile diploid kromozoma sahip zigot oluşur. Mikroskop altında incelendiğinde iki PN ve iki PB gözlenmesi normal fertilizasyonun gerçekleştiğinin kanıtı olduğu için sitoplazmalarında ikiden daha az veya daha fazla sayıda PN içerenler anormal döllenmiş oosit olarak kabul edilirler. En sık görülen multipronuklear zigotlar 3 PN olanlardır. Zigot 3 PN'li ve 2 PB'li ise fazla PN dispermi sebebi ile oluşmuştur. Bazı durumlarda ise zigot 3 PN ve 1 PB içerebilir; bu durumda fazla PN anne kökenlidir (Feenan ve Herbert 2006). Yapılan çeşitli çalışmalarda intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonucu oosit içerisinde 3 PN oluşumu görülmüş ve bu durumla in vitro fertilizasyona (IVF) kıyasla daha sık karşılaşıldığı bildirilmiştir (Staessen ve Van Steirteghem 1997). ICSI'de tek sperm kullanıldığından 3. PN'nin, oluşan ikinci PB'nin dışarı atılamamasına bağlı olduğu ileri sürülmektedir (Feenan ve Herbert 2006, Staessen ve Van Steirteghem 1997, Porter ve ark. 2003).

Oosit'in içerdiği birçok faktör; maternal RNA, proteinler, antioksidanlar ve organeller mayoz sürecini, fertilizasyonu ve segmentasyon bölünmesinin erken evrelerini ve embriyogenezdeki birçok olayı kontrol etmektedir. Bu yüzden oosit kalitesindeki değişiklikler embriyo gelişim yeterliliğini etkileyecektir (Acton ve ark. 2004). Diğer memelilerde olduğu gibi eksiksiz gelişmiş insan oositlerinde en fazla bulunan organel mitokondridir. Mitokondri, solunum ile kimyasal enerji oluşturabilen ökaryotik hücrelerdeki enerji kaynağıdır. (Acton ve ark. 2004, Thouas ve ark. 2004). Yapılan çeşitli çalışmalarda IVF başarı oranlarındaki düşüşten mitokondriyal hasarların sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Acton ve ark. 2004). M-II evresindeki oositler kültür ortamında belirli sürelerde ışığa maruz bırakılıp bu oositler IVF sürecine sokulduğunda oluşan zigotlardaki mitokondri morfolojisinin değiştiği, membran potansiyelinin düştüğü ve blastokist gelişiminin baskılandığı gösterilmiştir (Thouas ve ark. 2004).

Mitokondrinin oosit gelişimi ve embriyo gelişimi sırasında, hücre içi Ca^{+2} dengesini belirleyen ana düzenleyici olduğu düşünülmektedir (Van Blerkom 2004, Van

Blerkom ve Davis 2007, Dumollard ve ark. 2004). Fare ve insan oositlerinde bulunan mitokondriyumlar morfolojik olarak benzer olsa da mitokondri iç zarlarındaki elektriksel potansiyelin büyüklüğüne bağlı olarak iki farklı gruba ayrılabilirler. Yapılan çalışmalarda olgun oositlerde (M-II) ve erken embriyoda özellikle plazma membranı altına konumlanmış mitokondriyumların membranlarındaki elektriksel potansiyelin, geri kalan mitokondriyumlara göre yüksek olduğu belirlendiğinden oosit gelişim aktiviteleri ve preimplantasyon evresindeki embriyo içi olayların, iç membran elektriksel potansiyeli ile ilintili olabileceği düşünülmektedir (Van Blerkom ve Davis 2007). Yapılan bir çalışmada mitokondriyumlarda ATP sentetaz enzimi mutant farelerde mitotik iğ ipliği oluşumunun bozuk olduğu gösterilmiş bu durum mikrotübüllerin oluşumu ve organizasyonunda da mitokondrilerin rol oynayabileceği düşüncesini doğurmuştur (Kidd ve ark. 2005).

Oositlerin mayoz sürecini tamamlamaları sırasında ve fertilizasyondan sonraki olaylarda hücre iskeleti organizasyonunda da değişiklikler olduğu ve başta mitoz mekiğinin yapısına katılan mikrotübüllerin rolü çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Tremoleda ve ark. 2003, Kim ve ark. 1998, Veselska ve Janish 2001, Velilla ve ark. 2005). Yapılan çalışmalarda mikrotübüllerin, kromozomların düzenlenmesinden ve mitokondri göçünden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Kim ve ark. 1998, Yaffe ve ark. 1996). Oogenez, oosit olgunlaşması ve erken embriyogenezde hücresel asimetrisinin sağlanması ve devamlılığı ışınsal mikrotübül demetlerine bağlıdır. Bilindiği gibi mikrotübüllerin oluşumunda sentrozom belirleyici rol oynamaktadır. Bu sebepten ötürü sentrozom, mikrotübül organize edici merkez (MTOC) olarak bilinir (Combelles ve Albertini 2001). Memeli oositlerindeki sentrozomlar sentriolden yoksundur yalnızca perisentriolar madde (PCM) içerirler. PCM, mikrotübül oluşturma aktivitesine sahiptir. γ -tübülün, tübülün süperailisinin bir üyesidir ve mikrotübül oluşumunda anahtar rol oynar. MTOC'nin yapısında bulunur ve mayotik iğ ipliğinin yapımını sağlar (Combelles ve Albertini 2001, Lee ve ark. 2000). Fare oositi üzerinde yapılan çalışmalarda ooplazma içindeki γ -tübülün odaklarının agregasyonundan sonra mikrotübülün α -tübülün birimleri tarafından uzatıldığı görülmüştür (Meng ve ark. 2004). Oosit olgunlaşması sırasında γ -tübülün odaklarının evrelere bağlı olarak yer değiştirdiği ve iğ ipliği ve oosit korteksi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Combelles ve Albertini 2001, Lee ve ark. 2000). Combelles ve Albertini (2001) Germinal vezikül (GV) evresindeki oositlere taxol uygulayarak mikrotübül gelişimini baskıladıklarında, hücrelerin metafaz - I (M-I)

evresinde tutulduğu ve bazıları PB atılmasında gecikme yaşarken bazılarında ise PB'nin 3. PN'yi oluşturacak şekilde hücre içinde kaldığı görülmüştür. Tremoleda ve arkadaşları (2003) ICSI uygulaması sonrası oluşan çekirdek ve hücre iskeleti değişikliklerini incelemişler ve ICSI sonrası bazı oositlerin ikinci mayoz bölünmelerini tamamlayamadıklarını gözlemişlerdir. Yapılan incelemede bu oositlerde düzensiz mikrotübüller, hasarlı iğ ipliği ve 3. PN'ye rastlanmıştır (Tremoleda ve ark. 2003).

Memeli oositlerinde mikrofilaman dağılımı üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda mikrofilamanların esas olarak hücre korteksinde mayotik iğ ipliğinin üzerinde bir ağ halinde yer aldığı belirlenmiştir. Mikrofilamanlardan zengin bu bölgenin mayotik iğ ipliğinin devamlılığından ve kromozomların düzeninden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Kim ve ark. 1998, Veselska ve Janish 2001). Yapılan çalışmalarda kortikal filamentöz aktinin (F-aktin) oosit olgunlaşması ve fertilizasyon sırasında yeniden düzenlendiği gösterilmiştir (Kim ve ark. 1998, Veselska ve Janish 2001, Velilla ve ark. 2005). GV evresinde mikrofilamanlar kortekste gözlenirken, GV dağıldıktan sonra kromatine yakın olarak konumlandıkları, M-I'de kromozomlarla ilişkili olan ve olmayan kalın ve ince olmak üzere iki kortikal alanın ayrıştığı, anafaz ve telofazda ise çentik kuşağında yer aldıkları gösterilmiştir (Kim ve ark. 1998). Ayrıca atılan PB'nin çevresinde de mikrofilamanlar olduğu belirtilmiştir (Kim ve ark. 1998, Veselska ve Janish 2001, Velilla ve ark. 2005). Fare ve insan oositleri ile yapılan çalışmalarda asimetric bölünme sırasında PB'nin atılmasının mikrofilamanlara bağlı olabileceği bildirilmiştir (Kim ve ark. 1998, Zhu ve ark. 2003). Başka bir çalışmada da ICSI ile döllenmiş at oositlerinde iskelet organizasyonu incelenmiş ve 3 PN oluşumu gösteren oositlerde iskelet ağında bir hasar olabileceği sonucuna varılmıştır (Tremoleda ve ark. 2003).

Sonuç olarak sperm ile döllenmiş oositin mayozu tamamlayabilmesi, PB oluşumu ve atılması, mitokondrinin ve hücre iskeletinin rol aldığı karyokinez ve sitokinez ile gerçekleşebilecektir. Bu bilgiler ışığında oositin asimetric olan ikinci mayoz bölünmesini gerçekleştirirken oluşan ikinci PB'nin dışarı atılmasında insan oositlerinde kortikal aktin filamanlarının organizasyonunun ve mitoz mekiğini oluşturan sentrozomun konumunun önemli olabileceğini düşünerek bu çalışmada ICSI uygulaması sonrası sitoplazmalarında 3. PN görünen oositlerde sentrozom ve mikrofilamanların immünhistokimyasal lokalizasyonlarını incelemeyi amaçlamaktayız.

Ayrıca oosite ait olan mitokondriyumların oosit ve embriyo gelişiminde oynayabileceği önemli rolü ortaya koymak açısından mitokondriyumlarda görülen yüksek iç membran potansiyelinin PN oluşumu ve PB atılmasında önemli olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle mitokondri yerleşimi ve mitokondri membran potansiyeline yönelik araştırmaları immünohistokimyasal yöntemlerle ve ince yapı düzeyinde elektron mikroskop ile gerçekleştirdik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum Gelişimi ve İşlevi

Embriyonik yaşamın ilk ayının sonuna doğru vitellus kesesi duvarındaki primordial germ hücreleri gonad taslaklarına göç ederler. Gonadlara yerleşen bu hücreler bölünürler ve oogonyum ana hücrelerine dönüşürler. Oldukça yoğun bölünmeler sonucunda uterus içi yaşamın ikinci ayında 600.000 adet, beşinci ayda ise 7 milyon adet oogonyum oluşur. Fetal gelişimin üçüncü ayının başlangıcında oogonyumlar birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten aşamasında gelişimlerini durdururlar. Bu hücreler artık primer oosit olarak isimlendirilir. Primer oositler germinal vezikül (GV) evresi oositleri olarak da isimlendirilir. Primer oositler yassı folikül hücreleri ile çevrilidir ki hepsinin oluşturduğu bu yapıya primordiyal folikül denir. Fetal gelişim esnasında bu foliküllerde meydana gelen atrezi ile çoğu dejenere olur ve doğumda ovaryumda yaklaşık 1 milyon primordial folikül bulunur. Puberteye kadar bu foliküllerin sayısı 400.000'e kadar iner. Primordial folikülde bulunan primer oositler puberte ile hipofizden salgılanmaya başlayan Folikül stimulan hormon (FSH) ve Luteinizan hormon'un (LH) etkinliği ile olgun bir dişi gamet oluşturmak için oogenez (oosit olgunlaşma) sürecine girerler (Solakoğlu ve Aytekin 2009 p: 435–436, Loutradis ve ark. 2006).

2.2. Oosit Olgunlaşma Süreci

Oosit olgunlaşması nuklear ve sitoplazmik farklılıkların meydana geldiği uzun bir süreçtir. Sitoplazmik olgunlaşma, organellerin yeniden düzenlenmesi, proteinlerin sentezi, mikro ve makro moleküler değişimler gibi sitoplazmik değişimleri içerir. Bu değişimler oositin nuklear olgunlaşmayı gerçekleştirebilmesi, başarılı bir şekilde döllenebilmesi ve embriyonik gelişimin erken evrelerini tamamlayabilmesi için gereklidir. Nuklear olgunlaşma ise birinci mayozun profazından ikinci mayozun metafazına kadar olan kromatin değişikliklerini içerir. Nuklear olgunlaşmanın tamamlanması oositin metafaz II'de (MII) tutuklu kalmasına neden olur. Yalnızca tamamen büyümüş MII evre oositleri mayozu devam ettirebilir. Bu durum sitoplazmik değişimlerin oositin olgunlaşma yeterliliğini kazanması için gerekli olduğunun göstergesidir. Kısmi sitoplazmik olgunlaşma tamamen büyümüş oositlere zarar verebilir ve nuklear olgunlaşmayı olumsuz etkileyebilir. Örneğin 26 günlük farelere ait MII evre

oositlerinden elde edilen embriyoların iki blastomerli evreden blastokist evresine gelişiminin 18 günlük farelerden elde edilen oositlere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Eppig ve ark. 1994). Yani oositler mayotik olarak olgun olup birinci kutup cisminin atılmış olduğu görülse de fertilizasyon, pronukleus oluşumu ve embriyo gelişimi için gerekli maternal faktörlerden yoksun olabilir. Bu nedenle oositin döllenebilme kalitesinin belirlenmesinde oogenez sürecindeki tüm aşamalar arasında kompleks bir etkileşim vardır (Marteil ve ark. 2009, Swain ve Pool 2008).

2.2.1. Nuklear Olgunlaşma

Doğumda memeli oositi birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten aşamasındadır. Bu evre GV evresi olarak bilinir. Puberte ile salgılanan gonadotropinlerin uyarısı ile tamamen büyümüş oosit durgun halinden çıkar ve mayoz kaldığı yerden devam eder. Bu evre GV'nin çözülmesi ile tanımlanır ve Germinal Vezikül Yıkımı (GVBD) olarak isimlendirilir (Swain ve Pool 2008). GVBD, sitoplazmik maturasyon promoting faktörün (MPF) aktivasyonu ile gerçekleşir. MPF, hücrenin M-fazına girişini kontrol eden düzenleyicidir. Siklin – bağımlı kinaz 1 (CDK1) ve siklin B'den oluşur. *Xenopus laevis* ve fare oositinin olgunlaşma süreci ile ilgili yapılan çalışmalar MPF aktivitesinin GVBD'den hemen önce ortaya çıktığını, birinci mayoz bölünmenin sonunda tekrar azaldığını ve ikinci mayoz bölünmenin başlangıcında yeniden ortaya çıkarak fertilizasyona kadar yüksek seviyesini koruduğunu göstermiştir (Gerhart ve ark. 1984, Masui ve Markert 1971). Birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin tamamlanması sırasında homolog kromozomlar eşleşir ve rekombine olurlar. İyice kondanse olan kromozomlar, MTOC'lerce oluşturulan mikrotübüllerin meydana getirdiği bipolar mayotik iğ ipliğine bağlanırlar. Bu aşamada metafaz evresine girilmiştir ve kromozomlar oluşturulan metafaz plağı üzerindedir. Homolog kromozomların farklı kutuplara çekilmesi ile anafaz gerçekleşir. Memeli oositleri asimetrik sitokinez süreci ile genetik materyalin yarısını birinci kutup cismi olarak dışarı atar. İkinci mayoz bölünmenin metafaz evresine gelen oosit artık sekonder oosit ismini alır ve fertilizasyona kadar bu durumunu korur.

Işık mikroskobu seviyesinde başarılı bir nuklear olgunlaşmanın sadece GVBD ve birinci kutup cisminin dışarıya atılması olan iki göstergesi izlenir. Oysa başarılı bir fertilizasyonun gerçekleşmesi için nuklear olgunlaşmanın kritik birçok aşaması vardır. Bunlar, uygun kondansasyon, kromozomların düzeni, düzgün iğ ipliği oluşumu ve

fonksiyonu, kromozomların doğru ayrılmasıdır. Bu nedenle yalnızca birinci kutup cisminin varlığı ile oositi sağlıklı ve fertilizasyona yeterli olarak varsaymak uygun değildir (Swain ve Pool 2008).

2.2.2. Sitoplazmik Olgunlaşma

Sitoplazmik olgunlaşma oosit yeterliliğin gelişiminde önemli rol oynar. Sitoplazmik olgunlaşma genel olarak üç bölüme ayrılır.

- 1- Organellerin yeniden düzenlenmesi
- 2- Hücre iskeleti dinamikleri
- 3- Moleküler olgunlaşma

Bu aşamalarındaki eksiklik ya da düzensizlikler fertilizasyon ve sonraki gelişim süreçlerini etkileyecektir.

2.3. Fertilizasyon

Birçok memeli türünde olduğu gibi insanda da ovulasyon ile atılan oosit ikinci mayoz bölünmesinin metafaz evresinde durmaktadır. Oositin mayoz sürecini tamamlayabilmesi için bir sperm ile döllenmesi gerekmektedir (Plachot 2000).

Döllenme (Fertilizasyon) süreci yedi farklı evreye ayrılabilir.

1. Spermatozoon'un oosit çevresindeki kumulus ooforus'a penetrasyonu
2. Spermatozoon'un oosit çevresindeki Zona Pellusida'ya bağlanması ve penetrasyonu
3. Spermatozoon ve oosit plazma membranlarının birleşmesi
4. Oosit aktivasyonu
5. Spermatozoon nükleusunun dekondansasyonu
6. Dişi ve erkek pronükleusların gelişimi ve hücre merkezine göç etmeleri
7. Pronükleusların kaynaşması ve diploid kromozomlu zigot'un oluşması (Plachot 2000, Swain ve Pool 2008).

Epididimde ve dişi genital kanalda gerçekleşen çeşitli moleküler mekanizmalar ile kapasitasyonunu tamamlayan spermatozoa oositin etrafında bulunan zona pellusida glikoproteini 3'e bağlanarak akrozom reaksiyonunu uyarır. Akrozom reaksiyonu ekzositotik bir olaydır ve akrozomal vesiküllerin içerikleri Ca^{+2} bağımlı bir yol ile dışarı atılır. Zona penetrasyonundan sonra sperm başı perivitellin aralığa girer ve oosit membranı ile sperm membranı kaynaşır. İki gametin birleşmesi ile oosit aktivasyonu uyarılır. Birçok memeli türünde olduğu gibi insanda da ovulasyon ile atılan oosit ikinci mayoz bölünmenin metafaz aşamasındadır. Oosit aktivasyonu ile hücrede bazı morfolojik değişiklikler meydana gelir. Bunlar; kortikal granüllerin ekzositozu, ikinci mayoz bölünmenin tamamlanması (mayozun beklemekte olduğu M – II evresinden bölünmeye devam etmesi, kardeş kromatidlerin ayrılması ve ikinci kutup cisminin atılması) ve oosit korteksinin yeniden düzenlenmesidir. Oositin tüm bu süreçleri kapsayacak şekilde aktivasyonu Ca^{+2} dalgalanmalarına bağlıdır (Swain ve Pool 2008).

Spermin oosit sitoplazması içine girmesi ile hücre içindeki Ca^{+2} seviyesinde hızlı bir artış meydana gelir ve bunu hızlı ve tekrarlayan Ca^{+2} dalgalanmaları izler. Bu olay gametler birleştikten birkaç dakika sonra gerçekleşir ve pronukleusların oluşumu sırasında durur (Swain ve Pool 2008). Sperm uyarılı Ca^{+2} dalgalanmalarının oluşumunda hem mitokondri hem de endoplazma retikulumunun (ER) rolü vardır. Somatik hücrelerdekine benzer olarak olgunlaşmasının ilk anlarından itibaren oositte ve embriyoda da mitokondri, endoplazma retikulumu sisternalarının yakınında kümeler halinde bulunur. Böylece ER ve mitokondrinin yakın çevresinde lokal bir mikroçevre meydana gelir. Bu alanda tüm sitoplazmadakinden daha çeşitli çözünür metabolitler bulunur. Mitokondri esas olarak ATP ve reaktif oksijen türevleri (ROT) kaynağıdır, ER ise ana Ca^{+2} deposudur. ER ve mitokondri arasındaki bu mikroçevrede bulunan ATP, Ca^{+2} ve ROT konsantrasyonu tüm sitoplazmadaki seviyeden daha fazladır. ER ve mitokondri arasındaki bu yakınlık iki organel arasında fonksiyonel bir etkileşim olduğu fikrini desteklemektedir (St. John 2007 pp. 33-34, Dumollard ve ark 2006). Spermin oosite girmesi ile meydana gelen ani Ca^{+2} yükselişi ER kökenlidir. Ca^{+2} dalgalanmalarının oluşum mekanizması konusunda insan yumurtası üzerinde yapılan çalışmalar spermin fertilizasyon sırasında ooplazmaya aktardığı sitozolik bir molekülün dalgalanmaları tetiklediği fikrini ortaya koymaktadır. Bu molekül sperme özgü fosfolipaz C zeta (PLC ζ)'dır. PLC ζ , inositol trifosfat reseptörlerini (InsP₃-R) ve sinyalleşme yolağını aktive eder ve hücre içi ana Ca^{+2} deposu olan ER'den Ca^{+2} 'nin

salgılanmasını uyarır. ER depolarından salıverilen Ca^{+2} , sisternalarının hemen yakınında bulunan mitokondri matriksine aktarılır (Swain 2008 Herbert 1997). Mitokondrinin fizyolojik Ca^{+2} sinyalleri sırasında önemli miktardaki Ca^{+2} 'yı alabildiği ve salgılayabildiği kanıtlanmıştır. Fertilizasyonda mitokondrinin Ca^{+2} 'yı alması ilk defa denizkestanesi yumurtasında gösterilmiştir. Mitokondri, matriksine Ca^{+2} 'nın aktarılmasını sağlayan elektronegatif bir potansiyele sahiptir. Carbonyl cyanide *p*-(tri-fluoromethoxy)phenyl-hydrazone (FCCP) kullanılarak mitokondri elektrik potansiyeli kollabe edildiğinde Ca^{+2} alımı durur ve matriksteki depolanmış Ca^{+2} salgılanır. Ca^{+2} 'nın mitokondri matriksinde mitokondri fonksiyonları üzerinde etkisi vardır. Mitokondri içerisindeki Ca^{+2} oksidatif fosforilasyonun çoklu bölge aktivatörüdür. Ca^{+2} , Krebs çemberindeki ve elektron transfer zincirindeki birçok dehidrogenazı uyarır ve F0-F1 ATP sentaz üzerine etkisi vardır. Mitokondriyal Ca^{+2} artışı mitokondriyal ATP üretimini artırır. Üretilen ATP, ER'ye ait Ca^{+2} pompalarına (SERCAs) etki eder ve ER'deki Ca^{+2} deposu yeniden dolar. (St. John 2007 pp. 33–34, Dumollard ve ark 2003, 2006).

Ca^{+2} seviyesindeki artış ve dalgalanmaların sıklığı, büyüklüğü ve süresi fertilizasyon ve embriyo gelişimi üzerinde etkilidir. Ca^{+2} sinyalleşme mekanizması oositin olgunlaşma sürecinde gelişir. Yapılan çalışmalarda oositin olgunlaşma süreci sırasında ER düzeni ve InsP_3 -R düzeninin değiştiği gösterilmiştir. Oosit tam boya ulaştığında Ca^{+2} dalgası oluşturma yeteneği kazanılır ama eksiksiz dalgalanma kapasitesi sadece başarılı bir oosit olgunlaşmasını takiben elde edilir (Swain ve Pool 2008, Herbert ve ark. 1997). Olgun fare oositine göre olgunlaşmamış fare oositleri sperm girişine cevap olarak daha az seviyede Ca^{+2} salgılar (Jones ve ark 1995). Preovulator fare oositlerinin Ca^{+2} dalgalanmalarına cevap olarak kortikal reaksiyonu gerçekleştirebilme yeterliliği yoktur (Abbott ve ark. 1999). Bu yetersizlik henüz olgunlaşmamış oositin Ca^{+2} dalgalanmalarına cevap verme yeteneğinin olmamasından kaynaklanmaktadır (Abbott ve ark. 2001). Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* olgunlaştırılan oositlerde aktivasyon ile meydana gelen Ca^{+2} dalgalanma paterni arasında fark olduğu bildirilmiştir (Herbert ve ark. 1997). Bu durum, *in vitro* olgunlaştırılan oositlerde görülen yetersiz gelişim kapasitesini kısmi olarak açıklamaktadır (Heikinheimo ve Gibbons 1998).

Ca^{+2} artışına cevap olarak kortikal granüller perivitellin aralığa enzim içeriklerini boşaltmak için oolemmaya doğru göç ederler. Bu olaya kortikal reaksiyon denir. Böylece zona pellusida'nın kimyasal ve fiziksel özellikleri değişir ve diğer spermilerin sitoplazma içine girişleri engellenir (Swain ve Pool 2008). Oositin kortikal granül ekzositozunu gerçekleştirebilme yeteneği Ca^{+2} sinyalleşme mekanizmasının kazanılmasına bağlı olarak olgunlaşma sürecinde kazanılır.

Aktive olan oosit ikinci mayoz bölünmesini tamamlamak üzere anafaz ve telofaz süreçlerini geçirir ve meydana gelen asimetrik bölünme ile farklı boyutta iki hücre oluşturur. Bu hücrelerden küçük olanı ikinci kutup cisimidir. Büyük olan ve sitoplazmik içeriğin çoğuna sahip olan hücre ise döllenmiş oositir. Bu asimetrik bölünme ile erken embriyo gelişimi için gerekli birçok molekül oosit sitoplazmasında tutulmuş olur ve sitoplazmik kayıp en aza indirgenir. Normal döllenmiş insan oositi 2PN oluşturur. Bir pronukleus oositin gelen haploid kromozom kümesidir, diğeri ise spermden gelen haploid kromozom takımıdır. Oosite ait kromatin materyalinin etrafında çekirdek zarının oluşması ile dişi PN meydana gelir. Oosit mayoz bölünme sürecini tamamlarken sperm nükleusu da bir seri değişiklik yaşar. Sperm hücresinin başı şişer, protamin disülfid bağları azalır ve sperm kromatini dekonpanse olur. Sperme özgü olan protaminler histonlarla yer değiştirirler ve kromatin dekonpansasyonu olarak adlandırılan süreç sonucunda oositin merkezinde erkek PN haline dönüşür. Zaman ayarlı çalışmalar sperm başının dekonpansasyonunun her zaman ikinci kutup cisminin atılmasından önce olduğunu göstermektedir. Paternal kökenli sentrozom, dişi pronukleusa uzanan mikrotübül tabanlı sperm asterlerinin organizasyonunu başlatır. İmmün işaretleme çalışmaları bu olayın spermin girişinden 6 saat sonra gerçekleştiğini göstermektedir. İki PN oositin merkezinde birbirlerine temas edinceye kadar dişi pronukleus erkek pronukleusa doğru çekilir. Merkezde PN boyutu 15–17 mikrondan 22–24 mikrona çıkar (Feenan ve Herbert 2006, Plachot 2000). Pronukleusların appozisyonu sırasında nuklear membranın yapısında bulunan porların ve bu porların sitoplazmik yüzeyinde toplanan dinaktin ve vimentin proteinlerinin rolü vardır. Dişi pronukleusu erkek pronukleusa doğru çekme görevini üstlenen sperm asterini oluşturan mikrotübüllerin pozitif uçlarında motor proteinlerden dinein yer almaktadır ve dinein bu şekilde dişi pronukleusa taşınır. Burada nuklear porlardaki dinaktin ve vimentine bağlanır, motor aktivitesini gösterir ve appozisyon sağlanır (Payne ve ark. 2003).

Işık mikroskopik incelemede oosit sitoplazması içinde iki adet PN ve dışında iki adet PB izlenmesi fertilizasyonun normal bir şekilde gerçekleştiğinin göstergesidir. İki taneden daha az ya da daha fazla PN içeren zigotlar anormal döllenmiş olarak nitelendirilir.

2.4. Anormal Sayıda Pronukleuslu Zigotlar

Geleneksel in vitro fertilizasyon ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulamalarından sonra pronukleus sayısı ile ilgili iki ana bozukluk bildirilmiştir. Bunlar; monopronuklear (1PN) oositler ve tripronuklear (3PN) oositlerdir. Oluşan 1PN ve 3PN oositler erken gelişim bölünmelerini geçirme yetisine sahiptir. Bölünen embriyolar bipronuklear (2PN) oositlerden kökenlenen embriyolar ile aynı morfolojik görünümündedirler (Staessen ve Steirteghem 1997).

2.4.1. Üç Pronukleuslu Zigotların Oluşması

En sık rastlanan multipronuklear zigotlar, 3PN zigotlardır. Hücresel düzeyde bu durum iki haploid kromozom kümesi yerine üç tanenin varlığını gösterir. Bu durum diandrik triploidi olan iki erkek ve bir dişi kromozom setinin kombinasyonu ya da dijinik triploidi olan bir erkek ve iki dişi kromozom setinin kombinasyonu ile gerçekleşir. Hangisi olduğunu belirlemek için kutup cismi sayısına bakılır. Eğer zigot 3PN ve 2PB içeriyorsa dispermik kabul edilir. Diandrik triploidinin nedeni iki veya daha fazla spermin oosit sitoplazması içerisine girmesidir. Böyle zigotlar genellikle IVF uygulaması sonrası oluşur. Zigot, 3PN ve 1PB içeriyorsa gözlenen ekstra pronukleusun anne kökenli (digyny) olduğu kabul edilir. Dijinik triploidide ise diploid bir oosit tek bir sperm ile döllenir. Diploid oositler iki şekilde meydana gelebilir.

1) Mononuklear veya binuklear diploid GV oositinin olgunlaşması ile,

2) Birinci veya ikinci metafaz, anafaz, telofaz evrelerinin bloke olması ile (Rosenbusch 2008 ve Tarin ve ark. 1999 ve Feenan ve Herbert 2006, Plachot 2000).

Hem mononuklear hem de binuklear dev diploid oositler normal bir oositin iki katı büyüklüğündedir bu nedenle oositin olgunlaşma süreci sırasında sitoplazmik ve nuklear bölünmede bir hata olduğu ya da iki oogonyumun birleşmesi sonucu oluştuğuna inanılır. Yapılan çalışmalar bu hücrelerin döllenebileceğini ve in vitroda dijinik triploid zigot ve embriyoları oluşturabileceğini göstermiştir (Rosenbusch 2008).

Birinci mayoz bölünme sürecinin bloke olması, ovaryumun eksojen kaynaklarla uyarılması, sigara içmek ve nükleer ve mitokondrial genotip ile alakalıdır. Maternal yaştan ilerlemesi de birinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde oosit duraklamasına neden olur.

İkinci mayoz bölünme sürecinin bloke olması, M-II evresindeki oositlerin kriyopreservasyonu, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ve postovulatör oosit yaşlanması ile alakalı olabilir. Özellikle intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonrasında görülen bu anormallikte izlenen fazla pronukleus dışarı atılamayan ikinci kutup cisimidir. Çeşitli sebeplerle, 23 kromozom içeren kutup cismi dışarı atılamaz, ooplazma içinde kalır ve fazla dişi pronukleusu oluşturur (Rosenbusch 2008 ve Tarin ve ark. 1999).

İkinci kutup cisminin atılamamasının nedeni, hücre içi iskeletin yapısında meydana gelen bozulmalar, oositin dondurulması, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulama tekniği, oositin kalitesi ve yaşlanması gibi faktörler olabilir.

2.5. Sitoplazmik Olgunlaşma ve Ooplazmanın Düzeni

Organellerin aktif hareketleri ve sitoplazma içinde doğru pozisyona gelmeleri oosit büyümesi, olgunlaşması ve fertilizasyon için önemlidir. Memeli oositinin büyümesi sırasında organeller organel zonunu oluşturmak üzere oosit korteksine göç ederler. Oositin olgunlaşma sürecinde ise kortikal granüller dışındaki tüm organeller hücrenin merkezine göç ederler ve kortekste organelden yoksun bir zon oluştururlar (Sun ve Schatten 2006). Olgunlaşan oositler ve embriyolardaki baskın sayıda bulunan organel mitokondridir ayrıca kortikal granüller, düz yüzlü endoplazma retikulumu (DER), kaba yüzlü endoplazma retikulumu (GER), Golgi aparatı ve lizozomlar da mevcuttur.

2.5.1. Mitokondri

Oosit sitoplazması içinde baskın miktarda bulunan mitokondrinin fonksiyonel bütünlüğü, hücresel devamlılık ve gelişim süreci için önemlidir. Oositte bulunan mitokondri maternal kökenlidir. Paternal mitokondri fertilizasyon sırasında spermatozoa ile ooplazmaya girse de ubiquitin-bağlı proteoliz yolağı ile yıkıma uğrar (Schwartz ve Vissing 2002; 2003). Memeli oositinde yaklaşık olarak 100,000 – 200,000 mitokondriyal DNA (mtDNA) kopyası vardır. Mitokondri embriyo gelişimi sırasında

tüm kardeş hücrelere bölüştürülür. Postimplantasyon evresine kadar mtDNA replikasyonu olmadığından oositler her türlü mitokondriyal bozukluğa karşı hassastır. Ooplazmada bulunan mitokondrinin esas görevi fertilizasyon ve implantasyon öncesi embriyo gelişimi için ATP üretmektir. Bunun yanı sıra oosit aktivasyonunda önemli rol oynayan Ca^{+2} metabolizmasının düzenlenmesinde de etkilidir (Wang ve ark. 2009). Mitokondrinin, oosit olgunlaşması ve embriyo gelişimi sürecinde dağılımı ve morfolojisi oositin veya embriyonun metabolizmasının artışına, oksijen tüketimine, karbondioksit üretimine göre değişim gösterir (Sathananthan ve Trounson 2000). Yapılan çalışmalar yapısal, genetik ve konumsal mitokondri bozukluklarının erken insan gelişimi sırasında normal iç ipliği organizasyonu, kromozomların ayrılmasını, hücre siklusunun süresi, kompaksiyon, kavitasyon ve blastokist soyulması gibi morfolojik olayları olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Yani mitokondriyal özellikler ve mitokondri ile alakalı değişiklikler oosit kalitesinin ve oosit gelişim yeterliliğinin belirteçidir (Van Blerkom 2004, Wang ve ark. 2009).

2.5.1.1. Mitokondri Dağılımı

Oosit olgunlaşması ve erken embriyogenez sırasında mitokondrinin dağılımında evreye özgü değişimler meydana gelir. Mitokondrinin hücre içi düzenindeki değişim süreçleri hücre iskeleti elemanlarına bağlı olarak gerçekleşir. Fetal ovaryumlardaki oogonyumlarda ve primordial foliküllerdeki oositlerde mitokondri perinuklear konumludur. Erken antral foliküllerde mitokondri periferik dağılım sergiler. Büyük foliküllerden toplanan tamamen büyümüş oositlerde mitokondri periferik sitoplazmada ve GV'nin çevresinde birikim gösterir. GVBD'den anafaz I'e kadar süren mayotik süreç sırasında mitokondri perinuklear alanda lokalizedir. Fertilizasyondan sonra mitokondri mikrotübül aracılı yol ile peripronuklear bölgeye göç eder ve yanyana gelmiş pronukleusların çevresinde yoğun bir küme oluşturur. Bu alanda pronuklear oluşum ve singami için enerjiye ihtiyaç vardır. Nuklear membranın çevresindeki mitokondrial polarizasyon, oogenez ve fertilizasyon sırasında birçok kere yenilenir. Bunun nedeni nuklear materyalin düzenlenmesi gibi olaylarda mitokondrial aktiviteye özellikle ihtiyaç duyulmasıdır (Marteil ve ark. 2009, Sathananthan ve Trounson 2000, Sun ve Schatten 2006). Pronuklear evrede pronukleusların çevresindeki mitokondri birikiminin simetrik olması segmentasyon bölünmeleri ile oluşacak her blastomere eşit sayıda mitokondri aktarılmasını sağlar. Van Blerkom ve ark. (2000) yayınladıkları çalışmada pronuklear

mitokondri geometrisinin mikrotübül ışınlarının düzenine bağlı olduğunu ve iç ve dış faktörlerden etkilendiğini bildirmiştir. Mitokondri genellikle DER membranları ile ilişkilidir. DER ve mitokondri birlikte ooplazmanın kortikal alanına yayılmış çok sayıda ve sıklıkla büyük yapılar oluştururlar. Bunlar, birbirleriyle anoztomoz yapmış ve mitokondri ile sıkıca karışmış tübüler DER membran kümeleri ve mitokondri çemberi ile çevrili hafif elektron yoğun materyal ile dolu büyük vesiküller halindedir. (Motta ve ark 2000, Sathananthan ve Trounson 2000, Van Blerkom 2004).). GVBD, birinci ve ikinci metafaz iğ ipliği oluşumu, pronukleusların oluşması ve birbirlerine doğru göçü, birinci mitotik iğ ipliğinin oluşması gibi yüksek ATP seviyesine ihtiyaç duyulan gelişim süreçlerinde mitokondri ve DER sisternalarının birlikte oluşturduğu alanlar bolcadır (Van Blerkom 2004).

Mitokondri reorganizasyonu nuklear olgunlaşma yeterliliği için önemlidir. Düşük olgunlaşma oranına sahip olan oositlerde mitokondrinin yeniden düzenlenme süreçlerine girmediği bilinmektedir (Marteil ve ark 2009). MII oositler ve embriyolarda mitokondri dağılım anormallikleri yaygındır. Mitokondrinin sitoplazmada büyük kümeler halinde bulunması gelişim yeterliliğini olumsuz yönde etkiler. Tipik olmayan mitokondriyal kümelenmenin nedeni mitokondri hareketlerini yöneten hücre iskeleti elemanlarının organizasyonundaki bozulmadır. Bu durum hücre içi yapısal bozuklukların gelişim yeterliliğini olumsuz yönde etkileyebileceğinin göstergesidir (Van Blerkom 1991, Katayama ve ark. 2006).

2.5.1.2. Mitokondri Yapısı

Büyüyen ve olgulaşan oositlerde mitokondri çoğunlukla küre ya da oval şekillidir. Çapı 0,3 – 0,5 mikron arasındadır. Tipik olarak çok az miktarda kısa yay şeklinde kristalara ve elektron yoğun bir matrikse sahiptir. Bu gelişmemiş morfoloji düşük solunum aktivitesinin göstergesidir. Dumollard ve ark. (2004) göre oosit ve erken embriyodaki gelişmemiş mitokondri morfolojisi kısıtlı oksidatif fosforilasyon kapasitesi sağlamak ve böylece ROT oluşma potansiyelini azaltmaktadır. Fertilizasyondan sonra ve implante olmamış embriyonun büyümesi sırasında mitokondri yuvarlak-oval şekilli, yoğun matriksli ve az kristalı yapısından uzamış, daha seyrek matriks ve daha fazla sayıda mitokondrinin uzun eksenini boyunca enine yerleşimli krista içeren morfolojiye farklılaşır. Matriks yoğunluğundaki azalma ve krista sayısındaki artış metabolik aktivitenin arttığının göstergesidir. Bununla birlikte bölünme süreci sırasında yuvarlak,

oval ve uzamış mitokondriler bir arada bulunabilir. Özellikle erken pronuklear evrelerde merkezinde daralma olan uzamış mitokondriye de raslanır ve bunlar bölünmekte olan mitokondri olarak nitelendirilir. Gelişim sürecinde mitokondrinin yapısından meydana gelen farklılıklar gelişim evresine özgü hücrel aktiviteyi desteklemek için gerekli olan yükselmiş ATP ihtiyacını karşılayabilmek içindir. Mitokondri ince yapısında meydana gelecek bozukluklar gelişimin bloke olması ya da anormal embriyo gelişimi ile alakalıdır (Motta ve ark. 2000, Sathannathan ve Trounson 2000, Van Blerkom 2004).

2.5.1.3. Mitokondrinin Görevleri

Mitokondrinin oositteki esas görevi oosit olgunlaşması ve embriyo gelişimi için ATP üretimi olsa da fertilizasyon ve sonraki gelişim süreçlerinin normal bir şekilde ilerleyebilmesi için gerekli olan hücre içi Ca^{+2} homeostazının kontrolünde de önemli etkilere sahiptir. (Krisher 2004, Torner ve ark. 2004, Van Blerkom ve Davis 2007). Olgun bir oosit (M-II) içerisindeki mitokondri morfolojik olarak homojen görünüm sergilese de mitokondriyal polaritenin yüksek ve alçak seviyede olmasına bağlı olarak iki popülasyona ayrılırlar. Mitokondriyal polarite, iç mitokondriyal membrandaki elektrik potansiyelinin ölçümüdür. Düşük membran potansiyeline sahip mitokondri bol sayıdadır ve tüm sitoplazmayı kaplar. Yüksek membran potansiyeline sahip olanlar ise yalnızca subplazmalemmal alanda lokalize olmuşlardır ve toplam mitokondri içeriğinin %5'inden daha azdır (Van Blerkom 2004; 2009, Van Blerkom ve Davis 2007). Polaritenin büyüklüğündeki farklılıklar solunum seviyesi, ATP üretimi, organel hacminin korunması, sinyal iletimi ve Ca^{+2} homeostazını düzenleme gibi farklı mitokondri fonksiyonlarını doğrudan etkiler (Van Blerkom 2009). Düşük membran potansiyeline sahip olanlarla kıyaslandıklarında yüksek membran potansiyeline sahip mitokondri ATP üretimi ve Ca^{+2} homeostazını düzenlemede daha etkilidir (Van Blerkom ve ark. 2002; 2003). Mitokondri iç membran potansiyelinin büyüklüğünü inceleyen birçok çalışma, mitokondriyal aktivite ile memeli oosit ve embriyosunun gelişim yeterliliği arasında bağ olduğunu göstermiştir (Wilding ve ark. 2001; 2002; 2003, Van Blerkom 2002; 2003, Acton ve ark. 2004, Jones ve ark. 2004). Mitokondrinin fertilizasyon sürecinde, oositin mayoza kaldığı yerden devam etmesi ve erken embriyo bölünmeleri sırasında mayotik ve mitotik iğ ipliği organizasyonu ve sitokinezin başarısında düzenleyici rolü olduğu bilinmektedir (Van Blerkom 2009). Van Blerkom ve ark. (2003; 2006) yayınladıkları çalışmalarda oosit ve implantasyon öncesi

embriyolarda belirli gelişim aktivitelerin membran potansiyeli büyüklüğü ile kontrol edilebileceğini ve eğer mitokondrideki polarite büyüklüğü normalin altındaysa bu süreçlerin olumsuz etkilenebileceğini bildirmişlerdir (Van Blerkom ve Davis 2007).

Canlı hücrelerin mitokondriyumlarının iç membran potansiyelindeki farklılıklar JC-1 (5,5',6,6'- tetrakloro- 1,1',3,3'- tetraetilbenzimidazolkarbosiyanin iodid) gibi membran potansiyelinin şiddetine duyarlı florometrik ajanlarla belirlenebilir. JC-1 katyonik, lipofilik, karbosiyanin bazlı, potansiyele duyarlı floresan bir boyadır. Mitokondri matriksinde birikir ve floresans emisyonu mitokondri iç membran potansiyelinin şiddetine bağlıdır. Düşük membran potansiyelinde yeşil floresan veren JC-1 monomerleri yüksek membran potansiyelinde bir araya gelip JC-1 agregatlarını oluşturur ve 590nm emisyonunda parlak kırmızı renkte floresan verir. Bu tür boyaların kullanıldığı immünfloresan yöntemler oositlerin ve preimplantasyon evresi embriyoların blastomerlerindeki solunum hızını ölçmede kullanılabilir (Reers ve ark. 1991; 1995, Van Blerkom ve ark. 2002, Van Blerkom 2004, Wilding ve ark. 2001).

2.5.2. Endoplazma Retikulumu

Oosit olgunlaşması sürecinde ER düzeninde gelişim evrelerine bağlı olarak değişiklik olduğu bilinmektedir. GV evresindeki bir insan oositinin kortikal bölgesinde genellikle kümeler halinde organize olmamış küçük ER sisternaları, bazen benek tipi lekeler şeklinde küçük ER alanları bulunur. GV etrafında ER izlenmez. Olgunlaşmış M-II oositler ise korteks ve tüm sitoplazmaya dağılmış, iyi organize olmuş büyük ER membranları ve yaklaşık 2-3 µm çapında ER kümeleri içerir.

ER, protein ve lipid sentezinin gerçekleştiği organeldir. Ayrıca kalsiyumun ana hücresel deposu olduğu için Ca^{+2} 'nin hücre içi düzenlenmesinde de rol oynar. Bu nedenle ER fertilizasyon sırasında oosit aktivasyonunda etkinlik gösterir. Oosit aktivasyonundan sonra ER membranında bulunan $InsP_3$ -R aracılığıyla Ca^{+2} salgılanır. Oosit olgunlaşması sırasında ER düzeninde meydana gelen değişikliklere ilave olarak $InsP_3$ -R miktarı GV evresine göre MII oositlerde %50 oranında artar (Mann ve ark. 2010, Marteil ve ark. 2009).

2.5.3. Hücre İskeleti Dinamikleri

Hücre iskeleti üç tip filamandan oluşur. Bunlar; mikrotübüller, mikrofilamanlar ve ara filamanlardır (Marteil ve ark. 2009). Mikrotübüller ve mikrofilamanlar globüler alt birimlerin polimerleridir. Ara filamanlar ise fibröz polipeptitlerin tetramerlerinden oluşur. Bu filamanlar içinde oosit olgunlaşması ile yakından ilişkili olanlar ise mikrotübüller ve aktin filamanlarıdır. Nuklear olgunlaşma sırasında hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi gerçekleşir. Bunlar;

- 1- Kromozomlara bağlı mikrotübüllerin iğ ipliğini oluşturmaları,
- 2- Sitoplazmik mikrotübüllerin geçici varlığı,
- 3- Mikrofilamanların sitoplazmadan oosit korteksine ve kromatin etrafına lokalize olmaları şeklinde tanımlanır (Marteil ve ark. 2009).

Oosite ait iskelet elemanlarının yeniden organizasyonu sadece nuklear olgunlaşma için değil oositin gelişim yeterliliğini kazanabilmesi için de gereklidir (Marteil ve ark. 2009).

2.5.3.1. Mikrotübüller

Mikrotübüller, α ve β tübülün dimerlerinin polimerizasyonu ile oluşan ve dinamik bir yapıya sahip olan elemanlardır. Esas olarak organellerin özellikle de mitokondrinin konumlanmasında ve kromozomların ayrılmasında etkin rol alırlar. Mayotik olgunlaşma sırasında kromozomların uygun pozisyona gelmelerini ve ayrılmalarını sağlarlar (Marteil ve ark. 2009). İnsan oositinin olgunlaşması sırasında farklı gelişim evrelerinde mikrotübüllerin sitoplazmik düzeni α -tübülünün floresan işaretlemesi ile gösterilmiştir.

GV evresindeki bir oositin sitoplazmasında organize olmuş bir mikrotübül ağı görülmez ama korteks ve GV çevresinde yoğun tübülün boyanması izlenir. GVBD'den sonra kondanse kromatinin yakınında küçük mikrotübül asterleri görülür. Prometafaz evresinde her kromatin partikülü ile ilişkili mikrotübül asterleri oluşur. Birinci mayozun metafazında asterler uzar ve iğ ipliğini oluştururlar. Anafaz ve telofaz evrelerinde mikrotübüller organize olmuş iğ ipliğinin ortasında bulunur. İkinci mayozun metafazında mikrotübüller mayotik iğ ipliğinde ve kutup cisminin çevresinde konumlanır. İnsan mayotik iğ ipliği fare, inek ve domuzda olduğu gibi simetrik, fiçi

şekillidir ve anastral geniş kutupları vardır. Mayotik metafaz iğ ipliğinin boyutu 18-21 μm 'dir (Kim ve ark. 1998).

Mikrotübüller sitoplazma içinde bulunan MTOC'ler tarafından üretilirler. Ökaryotik hücre sitoplazmalarında bulunan MTOC sentrozomdur. Sentrozom, fibröz PCM ile ilişkili bir çift sentriolden oluşur. Sentrioller 0,3 – 0,6 μm uzunluğunda ve 0,2 μm çapında simetrik olarak düzenlenmiş 9 adet mikrotübül tripletinden oluşan silindir şeklinde yapılardır. İki sentriol birbirine dik şekilde konumlanmıştır. Sentrozom membran içermez ve sürekli olarak hücresel elemanlarla iletişim halindedir. PCM, yapısal proteinler, düzenleyici moleküller, sentrozomla ilişkili proteinler ve ısı şok proteinlerini içeren 100 kadar proteinden oluşan fibröz bir kafestir. Bu karmaşık yapı içinde γ - tübülün halka kompleksi (γ -TURC), esas olarak γ – tübülün ile birlikte aksesuar proteinlerden oluşur ve mikrotübül nukleasyonundan sorumludur. γ -TURC, PCM içine gömülü olarak bulunur ve sentrozom proteinlerinden perisentrine bağlanmıştır.

Diğer organellerle kıyaslandığında sentrozomun belirgin bir şekli, boyutu ve sınırının olmadığı görülür. Hücre tipine, hücre döngüsünün evrelerine, organizmanın türüne bağlı olarak moleküler ve yapısal değişime giren bir organeldir. PCM'de oldukça dinamik bir yapıya sahiptir ve mükemmel fertilizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan farklı konfigürasyonlara değişebilir. (Schatten ve Sun 2010, Manandhar ve ark. 2005).

Erkek ve dişi gametler oldukça farklılaşmış hücrelerdir. Hem oogeneze hem de spermatogeneze süreçlerinin son aşamalarında erkek ve dişi gametlerdeki sentrozomlar dejenerasyon ve modifikasyona gider. Böylece gamet fonksiyonlarını ve fertilizasyonu başarı ile gerçekleştirebilecek hale getirilirler. Bu olaya sentrozom indirgenmesi denir.

Spermatogeneze sırasında spermatidlere ait sentrozomlar erken evrede ilk olarak mikrotübül nukleasyon yeteneklerini yitirirler. γ – tübülün, spermiyasyon evresinde meydana gelen sitoplazmik artık cisimler içerisinde atılır. Olgun bir spermatozoa hücresinde sentrozomal proteinler türe bağlı olarak kısmen veya tamamen yok olmuştur. Sentriol çiftinden distal sentriolde dejenerasyon görülse de varlığını sürdürür. Distal sentriol sperm kuyruğunda bulunan 9+2 aksonem yapısını oluşturan MTOC'dir. Spermatogeneze sürecinde distal sentriolde görülen kısmi dejenerasyon epididimde meydana gelmeye başlar, mikrotübüllerinin %50'sini yitirir ve olgun bir sperm

hücresinde artık cisim olarak kalır. Proksimal sentriol ise bütünlüğünü korur. Proksimal sentriol fertilizasyondan sonra oluşan sperm asterlerinin organizasyon merkezi olarak görev yapar. Olgun bir spermin sentrozomal elemanlarında defekt olması erkek faktörlü infertiliteye neden olur (Manandhar ve ark. 2005).

Oogenez sırasında ise sentrioller yok olur. Oogonyum ve fetal oositler pakiten evresine kadar sentriole sahip olsalar da sonraki evrelerde sentriol kaybolur. GVBD sırasında sitoplazma içinde çok sayıda perinüklear MTOC oluşur ve bunlar zaman içinde bir araya gelerek meydana gelen metafaz iğ ipliğinin kutuplarını oluştururlar. Oluşan perinüklear MTOCler ve iğ ipliği kutuplarında sentriol bulunmaz. Esas olarak fare oositinde olmak üzere tavşan, inek, denizyıldızı, *Xenopus* ve insan oositinde de metafaz II iğ ipliği kutuplarında sentriol olmadığı bilinmektedir. Bu asentriolar sentrozomlar çok sayıda sentrozomal protein (γ – tübülün ve NUMA gibi) içerir. Mayotik iğ ipliği kutuplarına ek olarak ooplazma içerisinde sentrozomal elemanlar bulunur. İmmünfloresan çalışmalarda aktive olan oosit sitoplazmasında sentrozomal elemanların ilk olarak küçük sayısız nokta olarak belirdiği, aktivasyonun ilerleyen evrelerinde ise daha az ama büyük sentrozomal odaklar halinde toplandıkları gösterilmiştir (Schatten ve Sun 2009; 2010, Manandhar ve ark. 2005).

Fertilizasyonun başarılı olabilmesi için sperm ve yumurtaya ait indirgenmiş sentrozom elemanlarının eksiksiz bir şekilde bir araya gelerek fonksiyonel sentrozomu oluşturmaları gerekmektedir. Birçok omurgalı ve omurgasız türde spermin çok az PCM ile çevrili sentriolü, oosite ait sentrozomal proteinlerin bir araya toplanması için dominant yapıyı oluşturur. γ - tübülün molekülünün küçük bir bölümü sperm sentriolü ile ilgili olsa da, döllenmiş yumurtada zigot sentrozomuna devşirilen γ - tübülünün büyük miktarı ooplazmadan gelir. Spermin ooplazma içine girişinden kısa süre sonra sperme ait sentriolar kompleks oosit sitoplazmasından γ - tübülün, sentrin, perisentrin ve NUMA'yı toplar. Dekondanse olan erkek PN'nin etrafındaki aşırı γ - tübülün birikimi sperm asterini oluşturma yeteneğine sahiptir. Ooplazmadaki sentrozomal proteinlerin sperm sentriolü çevresinde toplanmasını sağlayan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır, ancak γ - tübülünün sentrozomun toplanmasında ana rol oynadığı, mikrotübül nukleasyonu ve zigot asterinin sayısını ve boyutunu arttırdığı bilinmektedir. Maternal γ - tübülünün paternal sentrozoma doğru şekilde taşınması çok önemlidir. Yetersiz γ - tübülün sperm aster oluşumunda bozulmaya ve singamide hataya sebep olur.

Aşırı γ - tübülün birikimi ise aşırı mikrotübül nukleasyonu ve segmentasyon sırasında kromozomların eşit dağılmaması ile sonuçlanır (Schatten ve Sun 2009; 2010).

2.5.3.2. Mikrofilamanlar

Aktin, memeli oositindeki ana proteinlerinden birisidir. Mikrofilamanlar, globüler aktin (G-aktin) monomerlerinin polimerizasyonu ile oluşan filamentöz aktinden (F-aktin) oluşurlar. Oosit olgunlaşması, fertilizasyon ve embriyo gelişimi sırasında aktin filamanları önemli rol oynar. Oosit olgunlaşması ve fertilizasyon sırasında kortikal granül, endoplazma retikulumu sisternaları, mitokondri, Golgi kompleksi gibi organellerin dağılımı ve kromozomların pozisyonunu gibi dinamik olayları kontrol ederler. Ayrıca kutup cisminin atılması da filamentöz aktinin dağılımına bağlıdır. Bu olaylar aktin filamanların polimerizasyon ve depolimerizasyonuna, yani aktin dinamiklerine bağlıdır. Birçok hücre tipinde sitoplazmada büyük G-aktin havuzu vardır ve çevresel uyarılara bağlı olarak hızla F-aktin polimerizasyonunu gerçekleştirebilirler. Mayotik maturasyon sırasında insan da dahil olmak üzere birçok türün oositinde aktin filamanlarının yeniden organize olduğu bilinmektedir. GV evresinde mikrofilamanlar tüm sitoplazmaya dağılmış halde bulunurken GVBD sırasında oosit korteksine ve kromatinin etrafına doğru göç ederler. Metafaz II'de mikrofilamanlar oosit membranının altında ve yoğun olarak da mayotik iğ ipliğinin üzerinde konumlanmıştır (Marteil ve ark. 2009, Wang ve ark. 2000). Domuz olgun (MII) oositinde yapılan çalışmalarda oosit korteksinde kalın ve ince aktin filaman ağından oluşan iki farklı bölge tespit edilmiştir. İnsanda yapılan çalışmada da metafaz I evresinde bulunan oositlerin korteksinde kalın ve ince mikrofilaman bölgesi olduğu ve kromozomların kalın mikrofilaman bölgesinde konumlandığı bildirilmiştir. Kalın aktin filaman alanında kromozomlar yer aldığı için bu bölgenin kutup cisminin atılması ve fertilizasyonun normal gerçekleşebilmesi için önemli olduğu düşünülmektedir (Wu ve ark. 2001, Kim ve ark. 1998). Anafaz ve telofazda kardeş kromatidlerin arasında mikrofilamandan zengin yarıklanma oluşu vardır. Kutup cisminin atılmasından sonra mikrofilamanlar hem metafaz II kromatinin çevresinde hem de kutup cisminde izlenir (Kim ve ark. 1998). 2 – 4 hücreli embriyolarda plazma membranının altında ve perinuklear sitoplazmada bolca aktin filaman bulunur. Yapılan çalışmalarda Sitokalsin B uygulaması ile mikrofilaman polimerizasyonunun baskılanmasının GVBD ve metafaz üzerine etki etmediği, ancak mayotik iğ ipliğinin oosit korteksine göç

edememesi sonucu kutup cisminin atılmasının baskılandığı bildirilmiştir. (Kim ve ark. 2000, Longo ve Chen 1985, Marteil ve ark. 2009, Wang ve ark. 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. 3 Pronukleuslu Oositlerin Temini:

Çalışmamızda kullandığımız materyal İnternational Hospital, Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve 29 Mayıs Hastanesinde bulunan yardımla üreme teknikleri merkezlerine başvurmuş 23 – 47 yaş arası (ortalama 32 yaş) hastalardan ICSI uygulaması sonucu 3PN oluşan toplam 21 adet oosit bilgilendirilmiş onam formu ile temin edilmiştir.

3.2. Elektron Mikroskobu İncelemesi:

Elde edilen 3 pronukleuslu oositler için primer fiksasyon +4°C %1'lik Gluteraldehit (Sigma G-7776) solüsyonu ile yapıldı. Fosfat tamponu (PBS) (Sigma – P4417) ile yıkama sürecinden sonra oositler ancak mercek altında görülebilecek boyuta sahip olduğu için materyal kaybı yaşamadan elektron mikroskop takibinin devam ettirilebilmesi amacıyla yeni süzölmüş yumurta akı damlası içine yerleştirilerek damla asma yöntemi ile sekonder fiksatif olan %1 Osmiyum tetroksit (Merck 124505) buharına maruz bırakıldı. Osmiyum tetroksit buharının etkisi ile hem sekonder fiksasyon uygulandı hem de yumurta akının sertleşmesi sonucu oositin yumurta akı içinde stabilizasyonu sağlandı. Oositi içeren yumurta akı parçası PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakikalık uygulamalar ile yükselen (%30, %50, %70, %90, %100) aseton serilerinden geçirildi. 1 saat süre ile 1:1, 1:3 aseton - epon karışımı ve yine 1 saat süre ile saf epon ile muamele edildikten sonra Epon-812 (Fluka - 45359) doldurulmuş kapsül içine gömüldü. Kapsüller epon polimerizasyonu için 60 °C'lik etüvde 18 saat inkübe edildi. Kapsül yüzeyinin bistüri ile triminden sonra ultramikrotom ile alınan yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskobu ile oositin yeri belirlendi. Sonrasında ultra mikrotom ile seri olarak alınan ince kesitler nikel veya bakır gridler üzerine yerleştirildi. Gridler, uranil asetat damlası üzerinde 30 dakika ve kurşun sitrat damlası üzerinde 10 dakika inkübe edilerek kesitlerin kontrastlaması yapıldı. Kesitler Jeol JEM 1011 transmisyon elektron mikroskobu ile incelendi. Görüntüler Megaview III dijital kamera ile Soft Imaging System Analysis programı ile bilgisayara aktarıldı. Fotoğraflar çekilerek ince yapı değerlendirildi.

3.3. İmmü floresan Çalışması:

İmmü floresan çalışması için elde edilen tüm 3 pronukleuslu oositler %4'lük paraformaldehit solüsyonu ile tespit edildi. PBS ile yıkandıktan sonra uygulanacak antikorun plazma membranını geçerek sitoplazma içine girebilmesi ve uygun antijene bağlanabilmesi için PBS'te hazırlanan % 0.5 Triton – X (Fluka 93418) solüsyonu ile 30 dakika muamele edildi. PBS ile tekrar yıkama yapıldıktan sonra spesifik olmayan boyanmaları önlemek amacıyla PBS ile hazırlanan %1'lik İnsan Serum Albumini (HSA) (Sigma A1653) içinde 20 dakika boyunca bekletildi. Gama tübülün işaretlemesi için anti gama – tübülün antikor (Sigma - T5192) %1'lik HSA içeren PBS ile 1/400 oranında sulandırılarak hazırlandı. Oositler antikor damlası içine koyularak 1 saat boyunca oda ısısında muamele edildi. Süre sonunda PBS ile yıkanan oositlere %1'lik HSA içeren PBS ile 1/1000 oranında sulandırılan FITC işaretli sekonder antikor (Sigma – F0382) 1 saat boyunca oda ısısında ve karanlıkta uygulandı. Aktin iskeletin görüntülenebilmesi için ise HSA uygulamasından sonra Phalloidin – FITC işaretleyicisi (Sigma P5282) 1:1000 oranında %1'lik HSA içeren PBS ile sulandırılarak 1 saat boyunca oositler muamele edildi. Uygulamaların bitiminde oositler PBS ile yıkandı. Nukleus boyaması için, lam lamel arası preparat hazırlanırken DAPI içeren ve solmayı önleyen kapatıcı ajan (Invitrogen Molecular Probes – P36935) kullanıldı. Örnekler İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda DP72 kamera sistemi ile donatılmış Olympus DP-TWAIN yazılımı ile kontrol edilen Olympus BX51 Araştırma Floresan mikroskobu ile değerlendirildi ve fotoğrafları sayısal ortama kaydedildi.

3.4. Mitokondri Membran Potansiyelinin Değerlendirilmesi:

Mitokondri iç membran potansiyeli, potansiyele duyarlı floresan boyacı JC-1 ile ölçüldü. Çalışmada JC-1 mitokondri boyama kiti (Sigma – CS0390) kullanıldı. Boyamadan önce toz JC-1 boyası 10mg/ml konsantrasyonda dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok solüsyon halinde hazırlandı, -20°C'de muhafaza edildi. Çalışma solüsyonu için 1ml distile su içerisine 6µl JC-1 stok solüsyonu eklendi ve vorteks ile 1-2 dakika karıştırıldı. Bunun üzerine boyama kiti içeriğinde olan x5 boyama tamponundan 0.25 ml eklendi. Elde edilen solüsyon oositlerin içinde bulunduğu kültür medyumunu ile 1:1 oranında karıştırılarak 37 °C'de 20 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 5X boyama tamponu distile su ile 1:4 oranında sulandırılarak 1X boyama solüsyonu elde edildi ve inkübasyondan çıkarılan oositler buz üzerinde bu solüsyon ile

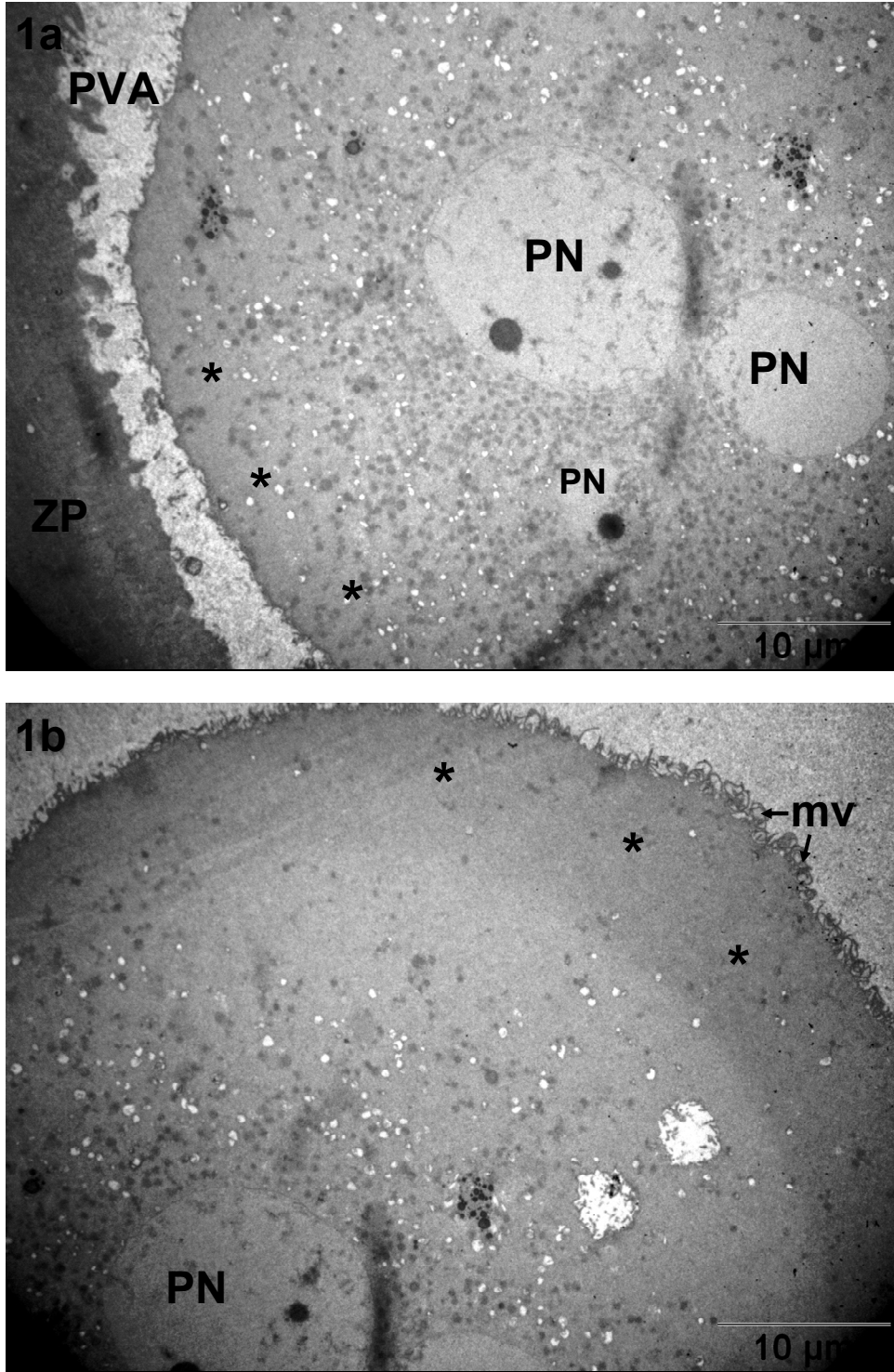
yıkandı. Oositler lam-lamel arası preperat haline getirildi. Örnekler İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda DP72 kamera sistemi ile donatılmış Olympus DP-TWAIN yazılımı ile kontrol edilen Olympus BX51 Araştırma Floresan mikroskobu ile değerlendirildi ve fotoğrafları sayısal ortama kaydedildi. Yüksek membran potansiyeline sahip mitokondriyumlar FITC kanalında turuncu- kırmızı renkte gözlendi. Düşük membran potansiyelinde sahip olanlar ise yeşil renkte görüldü.

4. BULGULAR

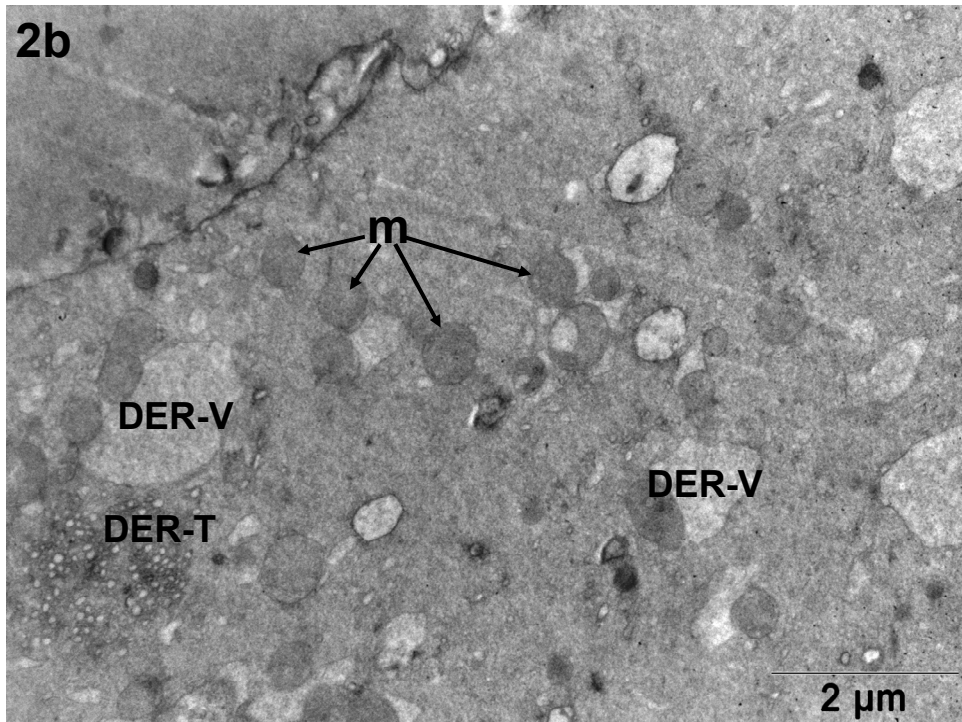
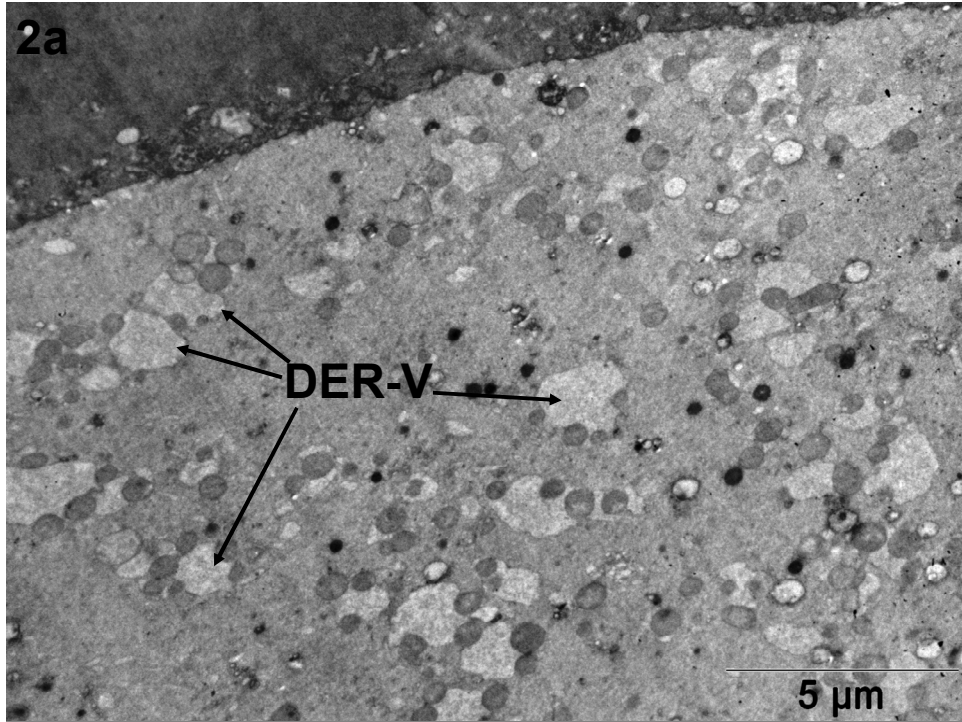
4.1. Elektron Mikroskobu Bulguları:

Elde edilen ve elektron mikroskobu çalışması için incelenen oositlerin plazma membranlarında çok sayıda mikrovilli mevcuttu. Oositin kortikal bölgesinde sitoplazmik hale ya kısmen mevcuttu ya da yoktu (Resim 4.1a ve Resim 4.1b). İncelenen bazı oositlerin kortikal bölgelerinde mitokondri ile ilişkili büyük düz yüzümlü endoplazma retikulumu vesikülleri ve düz yüzümlü endoplazma retikulumu tübül kümeleri mevcuttu (Resim 4.2a, 4.2b ve 4.2c). Bazı oositlerde hem kortikal alanda hem de subkortikal alanda oosit aktivasyonu sürecinde ekzositoz ile atılması gereken kortikal granüllerin, az sayıda olmakla birlikte varlığını sürdürdüğü izlendi (Resim 4.3). Kortikal alanda büyük vakuol oluşumları vardı (Resim 4.4a ve 4.4b). Bazı oositlerde endoplazma retikulumu sisternalarında şişme ve membranlarında yırtılmalar görüldü (Resim 4.5a ve 4.5b). Oosit ve sperme ait genetik materyali barındıran, oluşumunu tamamlamış erkek ve dişi pronukleuslar ile üçüncü pronukleus bir oositte periferde konumlanmalarına rağmen (Resim 4.6a) genel olarak incelenen diğer oositlerde ooplazmanın merkezinde grup halinde bulunmaktaydılar (Resim 4.6b). Periferde konumlanmış olan pronukleuslardan birinin halen oluşumunu tamamlayamadığı görüldü (Resim 4.7a). Bir araya gelmiş olan pronukleusların içinde nukleolar prekürsör cisimler (NPC) vardı. NPC'lerin bazılarının fibriller formda olmakla birlikte, bazıları granüler yapıda izlendi (Resim 4.7b). Ultramikrotom ile alınan seri kesitler incelendiğinde NPC'lerin her pronukleusta 3'ten fazla sayıda olduğu görüldü. NPC'lerin çoğunluğu nuklear membrana yakın bir şekilde kutuplaşma göstermekle birlikte bazı NPC'ler pronukleusların birbirlerine komşu olan yüzüne doğru bazıları ise tam zıt yönde kutuplaşma sergiliyordu. Ayrıca kutuplaşma göstermeyen NPC'ler de bulunmaktaydı (Resim 4.8). Pronuklear membran bazı bölgelerde kesintili olmakla beraber genelde bütünlüğü bozulmamış şekilde izleniyordu. Pronukleusların yakınında sitoplazmik birikimler halinde (Resim 4.9a, 4.9b, 4.9c ve 4.9d) ve pronukleus içinde kromatin materyali ile ilişkili olacak şekilde internalize olmuş annulat lamel dizileri mevcuttu (Resim 4.10a, 4.10b). İncelenen oositlerden birinde nuklear membranın bazı bölgelerinde invajinasyonlar görüldü (Resim 4.11). Mitokondri dağılımı merkezde konumlanmış pronukleusların çevresinde yoğun ve subplazmalemmal bölgede seyrek olmakla birlikte tüm sitoplazmada mevcuttu. Mitokondri genellikle yuvarlak veya oval

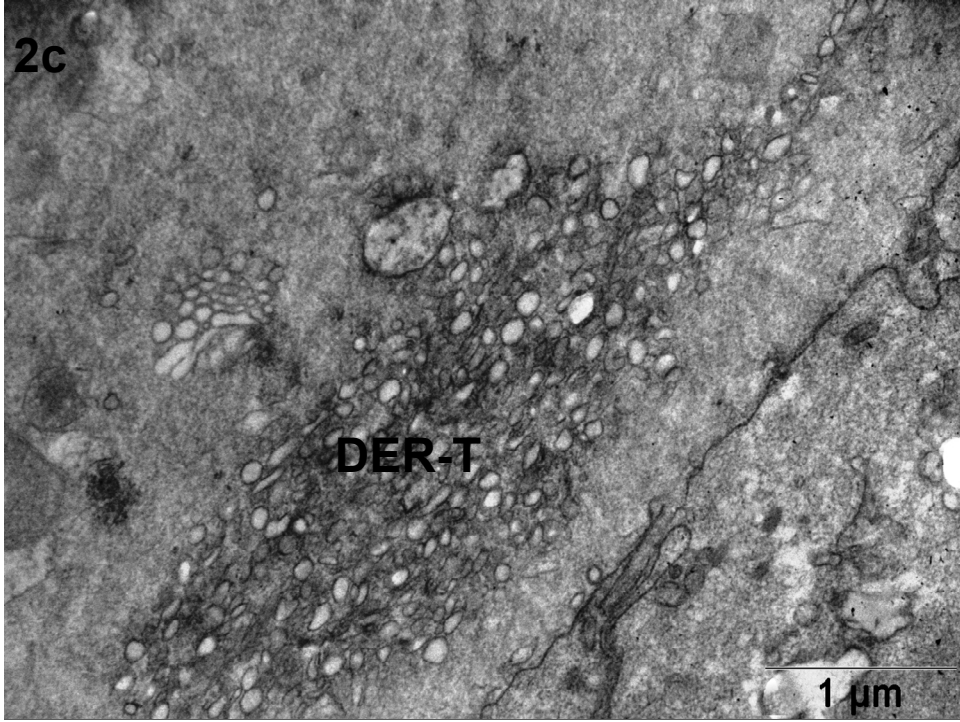
biçimliydi. Ooplazma içerisinde kristalleri ve çift membranları belirgin olan düzgün morfolojiye sahip olan mitokondrinin yanı sıra, aşırı yoğun matriksleri ile dikkati çeken morfolojiye sahip olanlara da rastlandı (Resim 4.12a). Bazı mitokondriyumlarda kristalar belirgin değildi; matrikslerinde vakuolizasyon ve dejenerasyon mevcuttu (Resim 4.12b, 4.12c, 4.12d ve 4.12e). Dejenere olan mitokondri matriksinde multilamellar oluşumlar vardı (Resim 4.13a ve 4.13b). Ayrıca pronuklear evrede oluşmaya başlaması beklenen uzamış mitokondriler izlenmedi. Sitoplazmada pronukleusların yakınında ve kortikal bölgede birkaç adet Golgi aygıtı izlendi (Resim 4.14). İncelenen tüm oositlerde ooplazma içerisinde çok sayıda lipofuskin granülü görüldü (Resim 4.15a ve 4.15b). Ooplazma içerisinde özellikle pronukleusların yakınında ve tüm sitoplazmaya yayılmış şekilde mikrotübüllere rastlandı (Resim 4.16a ve 4.16b). Sperm'e ait olan sentriol pronukleusların yakınında izlendi (Resim 4.17).



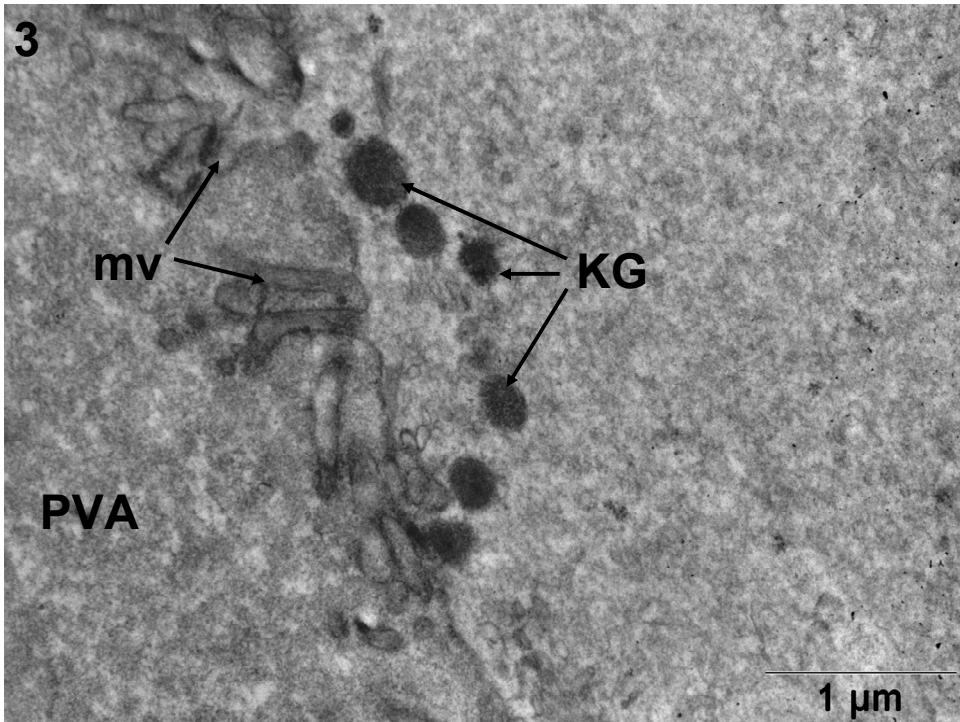
Resim 4-1: Üç pronukleuslu oositin kortikal alanında sitoplazmik hale oluşumu. 1a: Kortikal bölgede yıldız ile işaretlenen alanda sitoplazmik hale bulunmamaktadır. 1b: Kortikal alanda yıldız ile işaretlenen bölgede sitoplazmik hale mevcuttur. PN: pronukleus, mv: mikrovilli, ZP: zona pellusida, PVA: perivitellin aralık



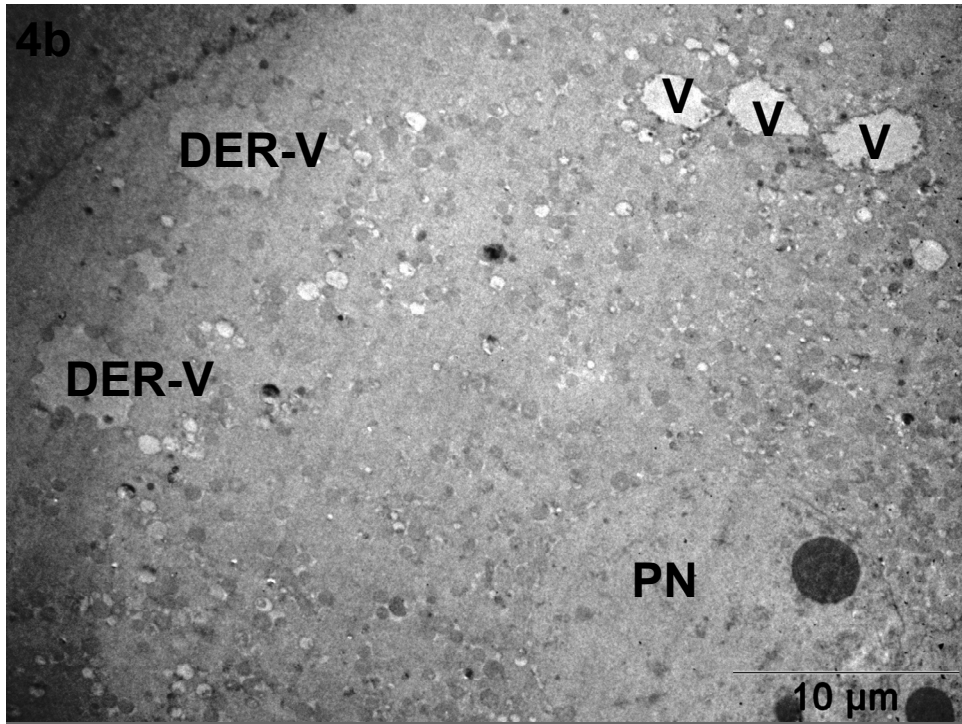
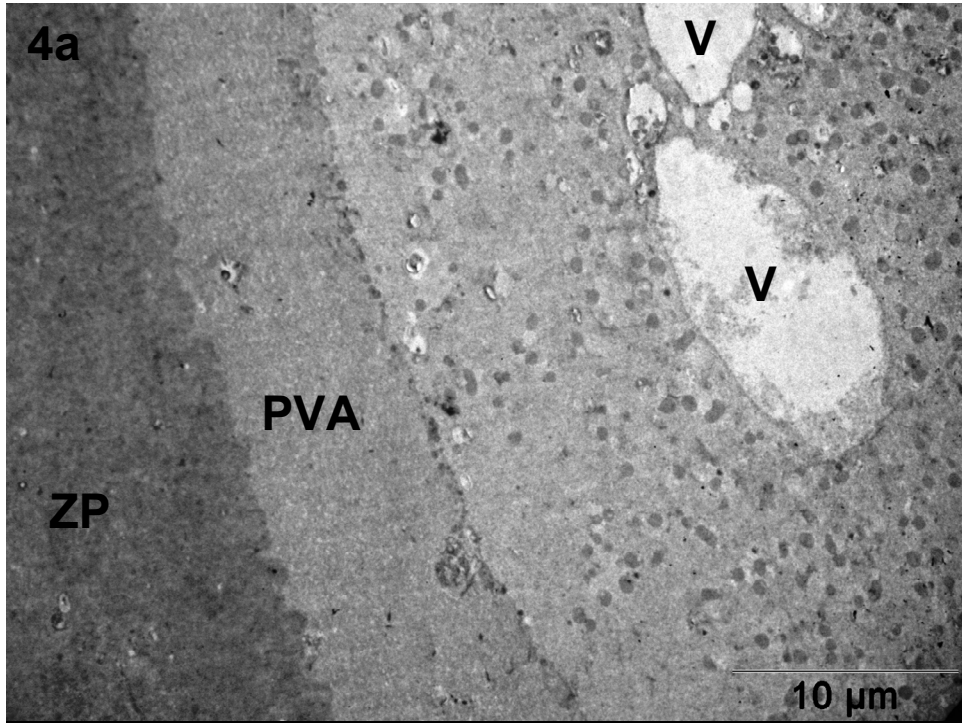
Resim 4-2a-b: Bazı 3 pronukleuslu oositlerin kortikal alanındaki DER vesiküllerinin ince yapısal görüntüsü. 2a: Büyük DER vesikülleri (DER-V) mitokondri ile birlikte görülmektedir. 2b: Büyük DER vesikülleri ve DER tübül kümeleri (DER-T) izlenmektedir. m: mitokondri



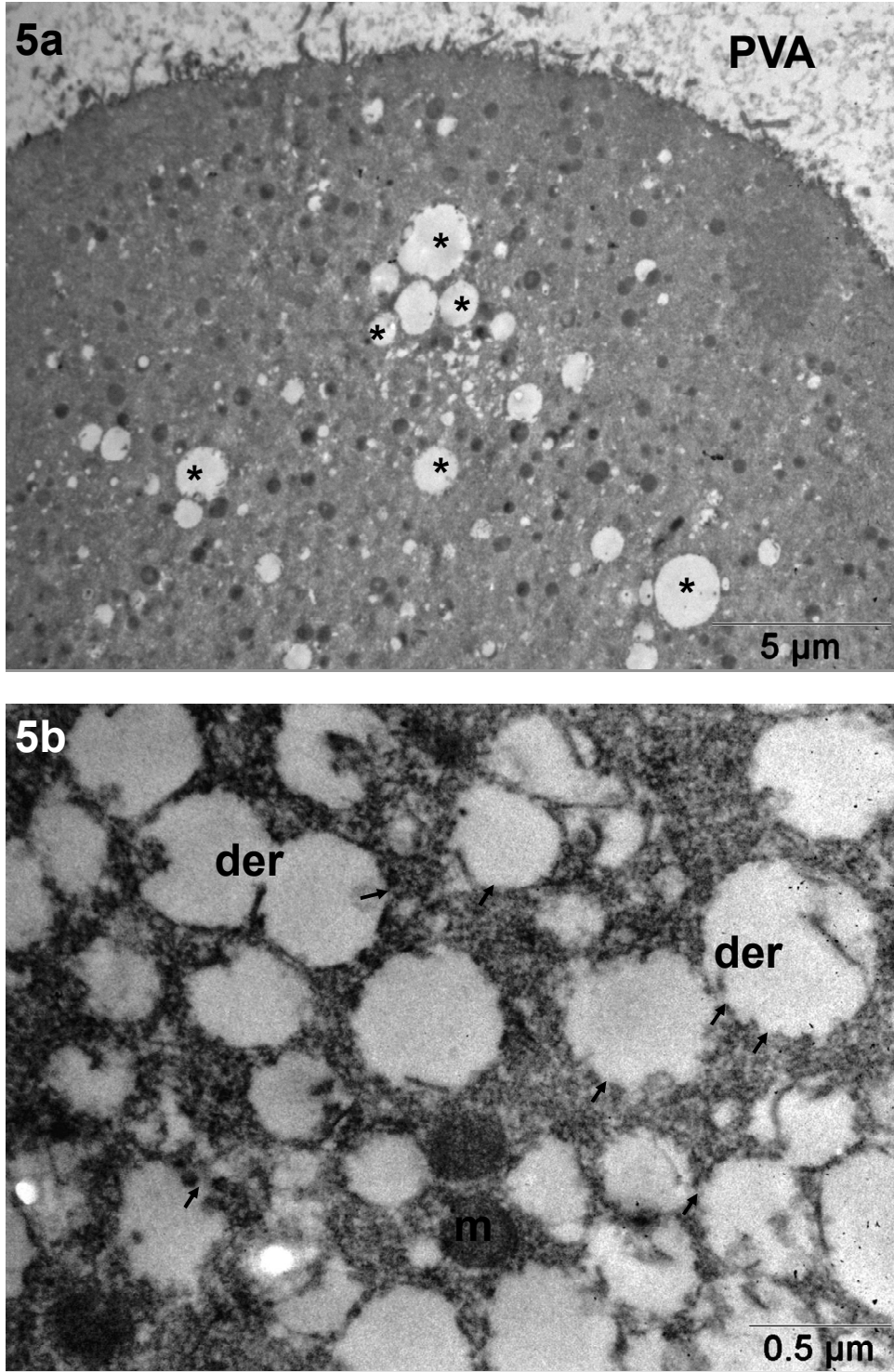
Resim 4-2c: Bazı 3 pronukleuslu oositlerin kortikal alanındaki DER vesiküllerinin ince yapısal görüntüsü. 2c: Kortikal alanda DER tübül kümeleri (DER-T) mevcut.



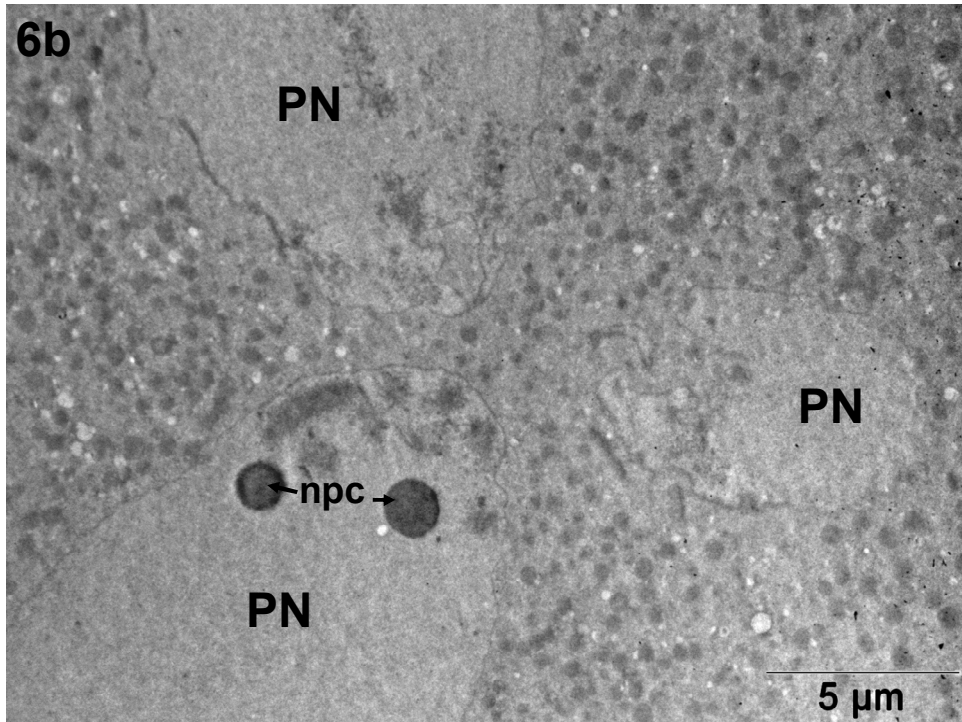
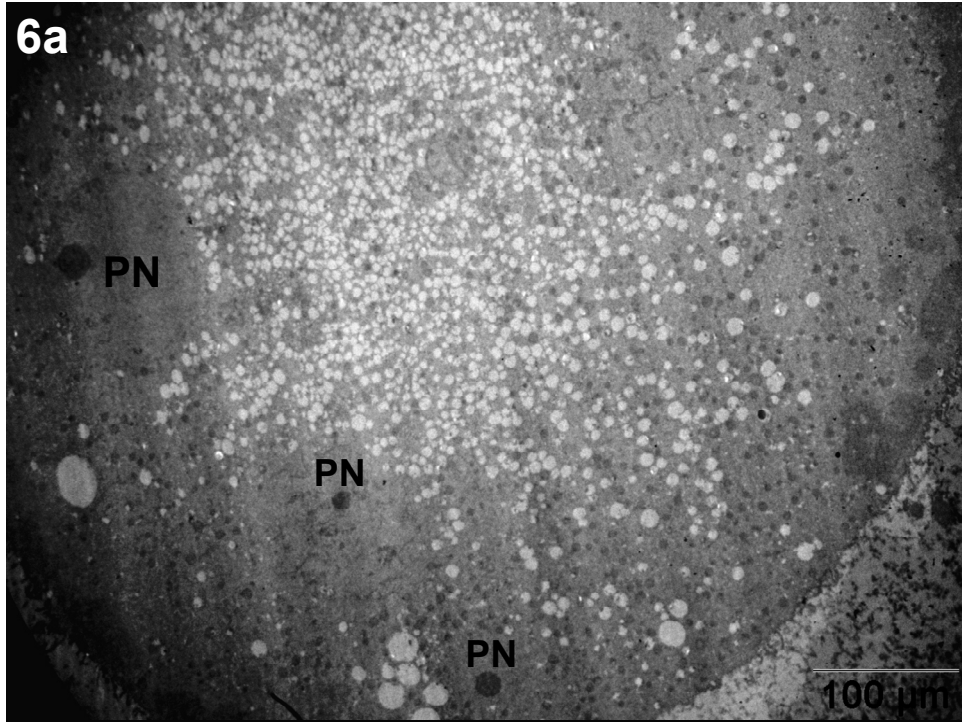
Resim 4-3: Ekzositoz olmamış kortikal granüller. Üç pronukleuslu oositin kortikal bölgesinde ekzositoz olmamış az sayıda kortikal granül izlenmektedir. PVA: Perivitellin aralık, mv: mikrovilli, KG: kortikal granül



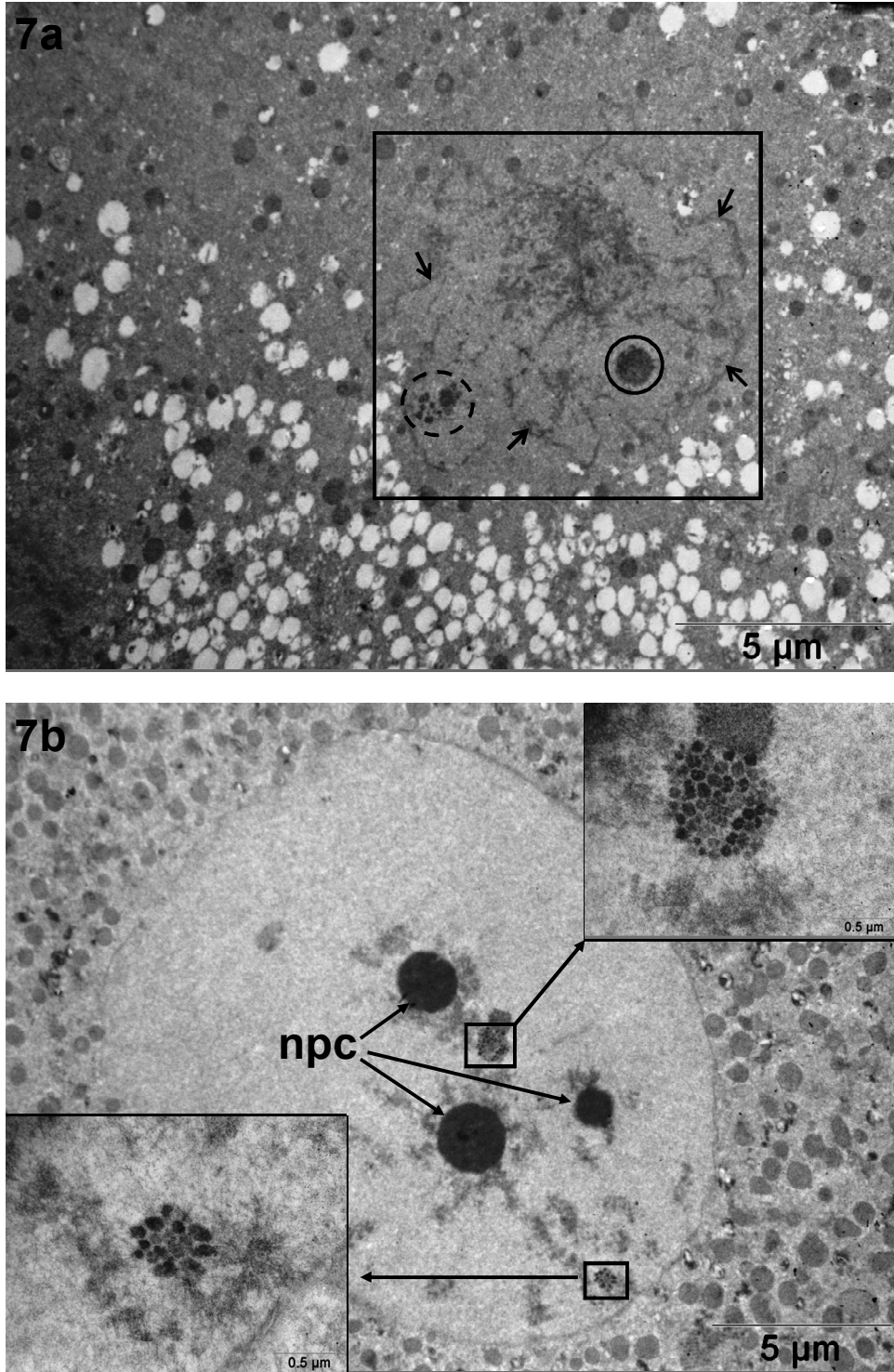
Resim 4-4: Kortikal alandaki vakuoller. 4a ve 4b: 3 Pronukleuslu oositlerin kortikal alanında vakuolizasyon izlenmektedir. PVA: perivitellin aralık, ZP: zona pellusida, V: vakuol, DER-V: büyük düz yüzlü endoplazma retikulumu vesikülleri, PN: pronukleus



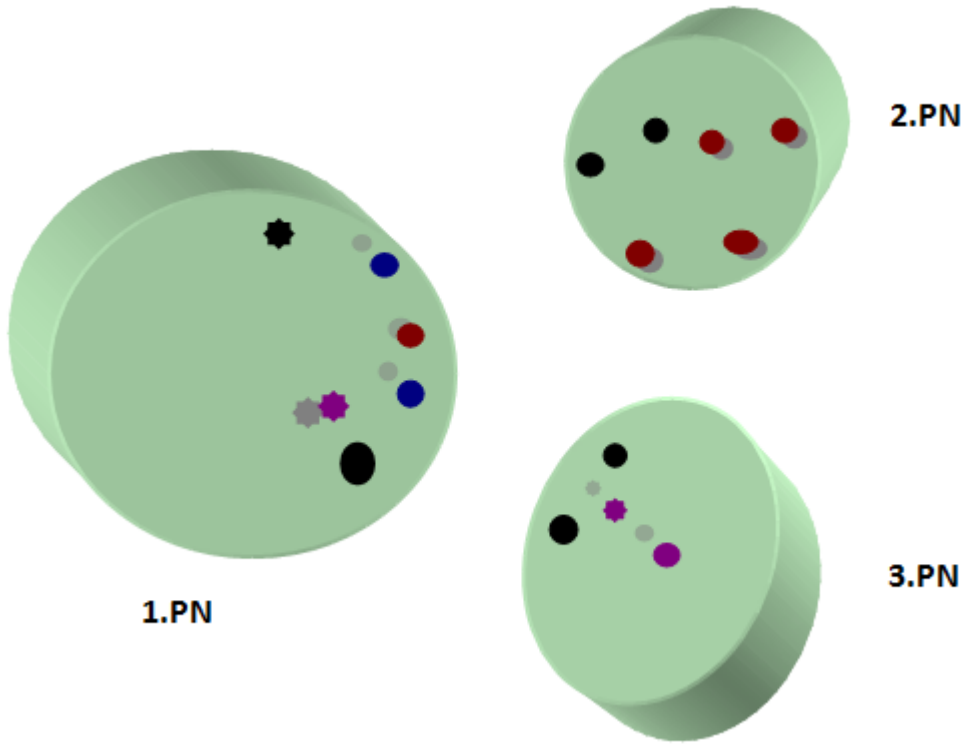
Resim 4-5: Düz yüzlü endoplazma retikulumu anormallikleri. 5a: Oositin kortikal alanında genişlemiş büyük DER vesikülleri bulunmaktadır. 5b: Genişlemiş DER vesikül membranlarında yırtılmalar (ok) izlenmektedir. PVA: perivitellin aralık, der: düz yüzlü endoplazma retikulumu, yıldız: genişlemiş DER vesikülleri, m: mitokondri, ok: membran yırtılmaları



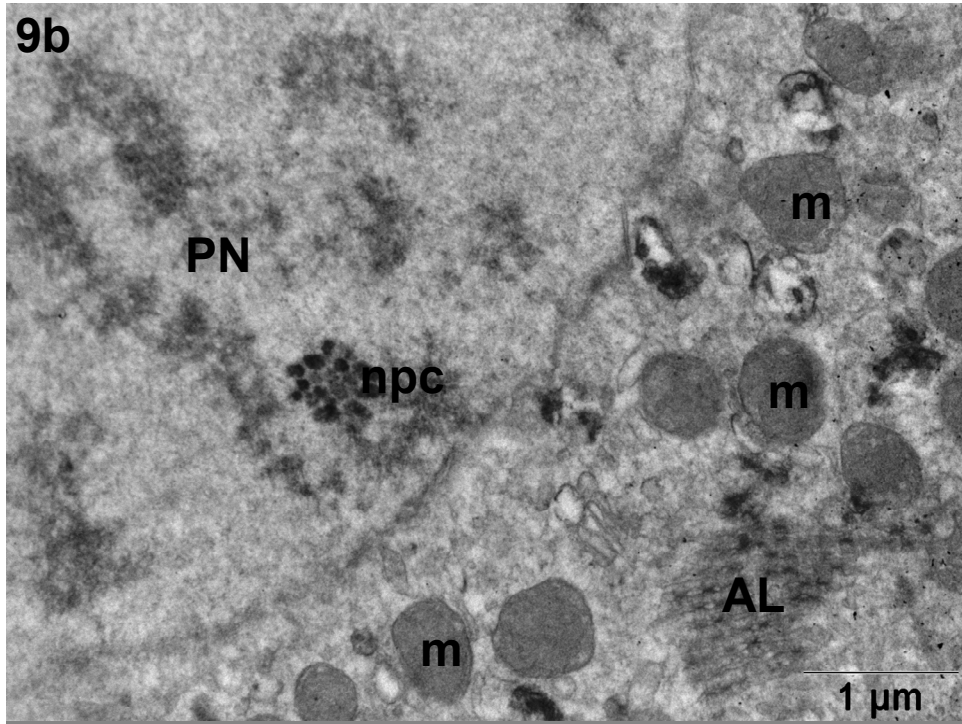
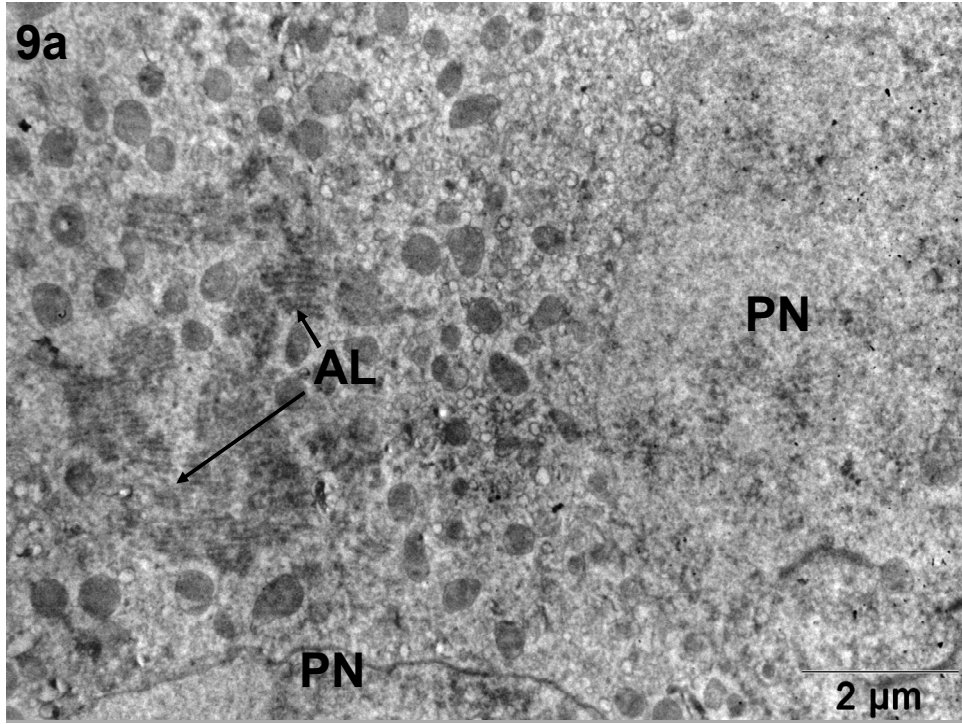
Resim 4-6: Pronukleusların ooplazma içerisindeki konumu. 6a: 3PN periferde konumlanmış olarak izlenmektedir. 6b: 3PN oositin merkezinde izleniyor. PN: pronukleus, npc: nukleolar prekürsör cisim



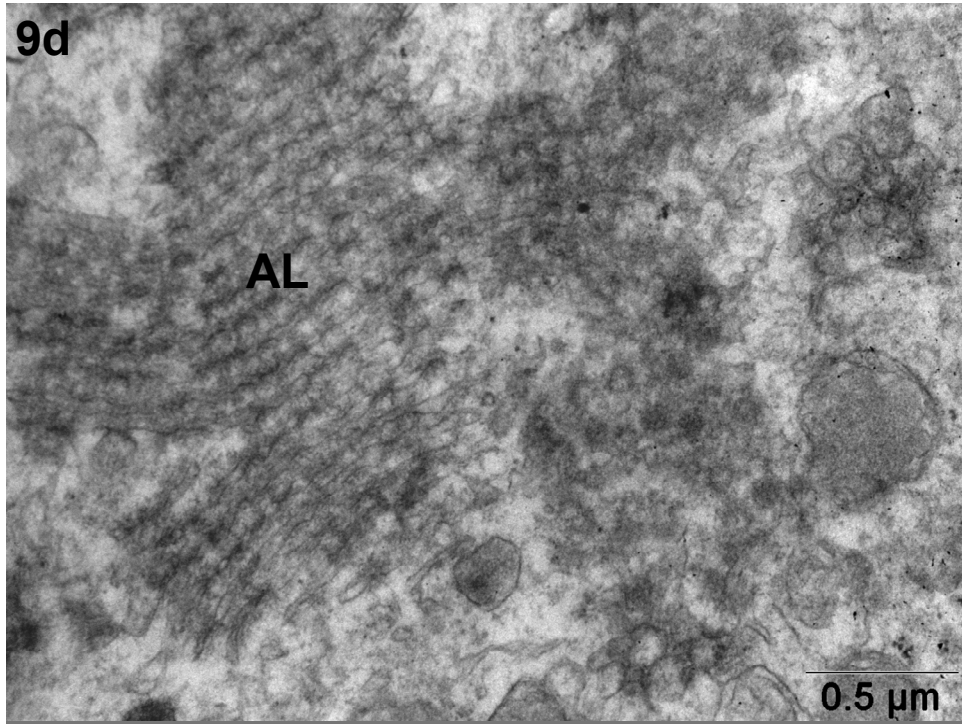
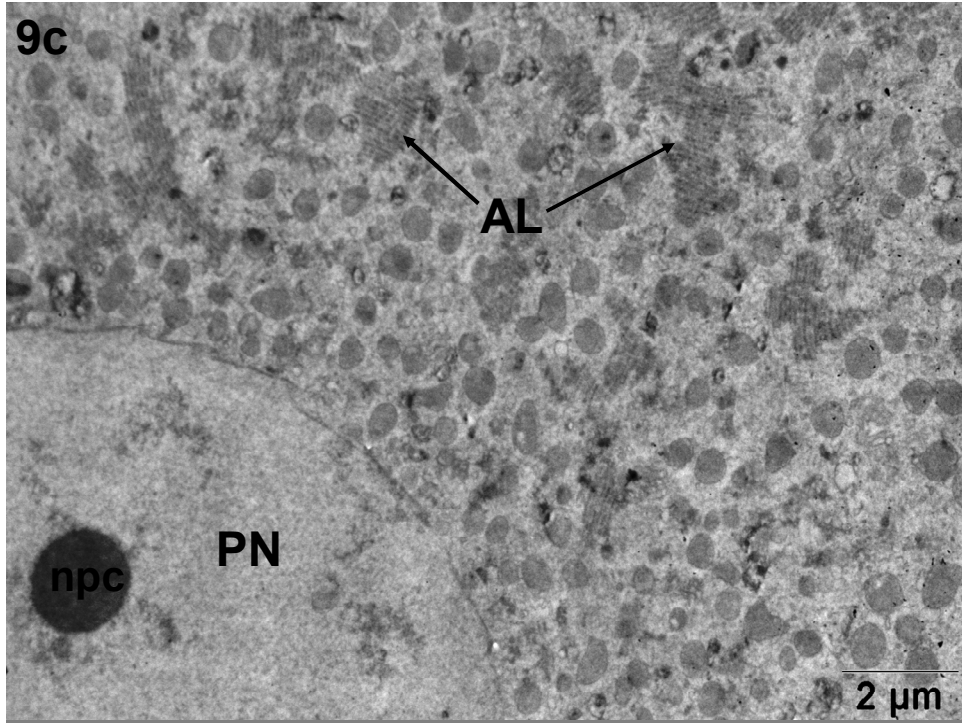
Resim 4-7: Pronukleus ve NPClerin oluşum durumuna ait elektron mikroskop fotoğrafı.
 7a: Kare içine alınmış alanda PN oluşumunu tamamlayamamış, nuklear membran dağınık izlenmektedir (oklar). Nukleolar prekürsör cisimler fibriller (daire) ve granüler (kesikli daire) formda izleniyorlar. 7b: Pronukleus oluşumunu tamamlamış, düzgün nuklear membranı ile izleniyor. NPC'ler fibriller ve granüler formda izlenmektedir. npc: nukleolar prekürsör cisim



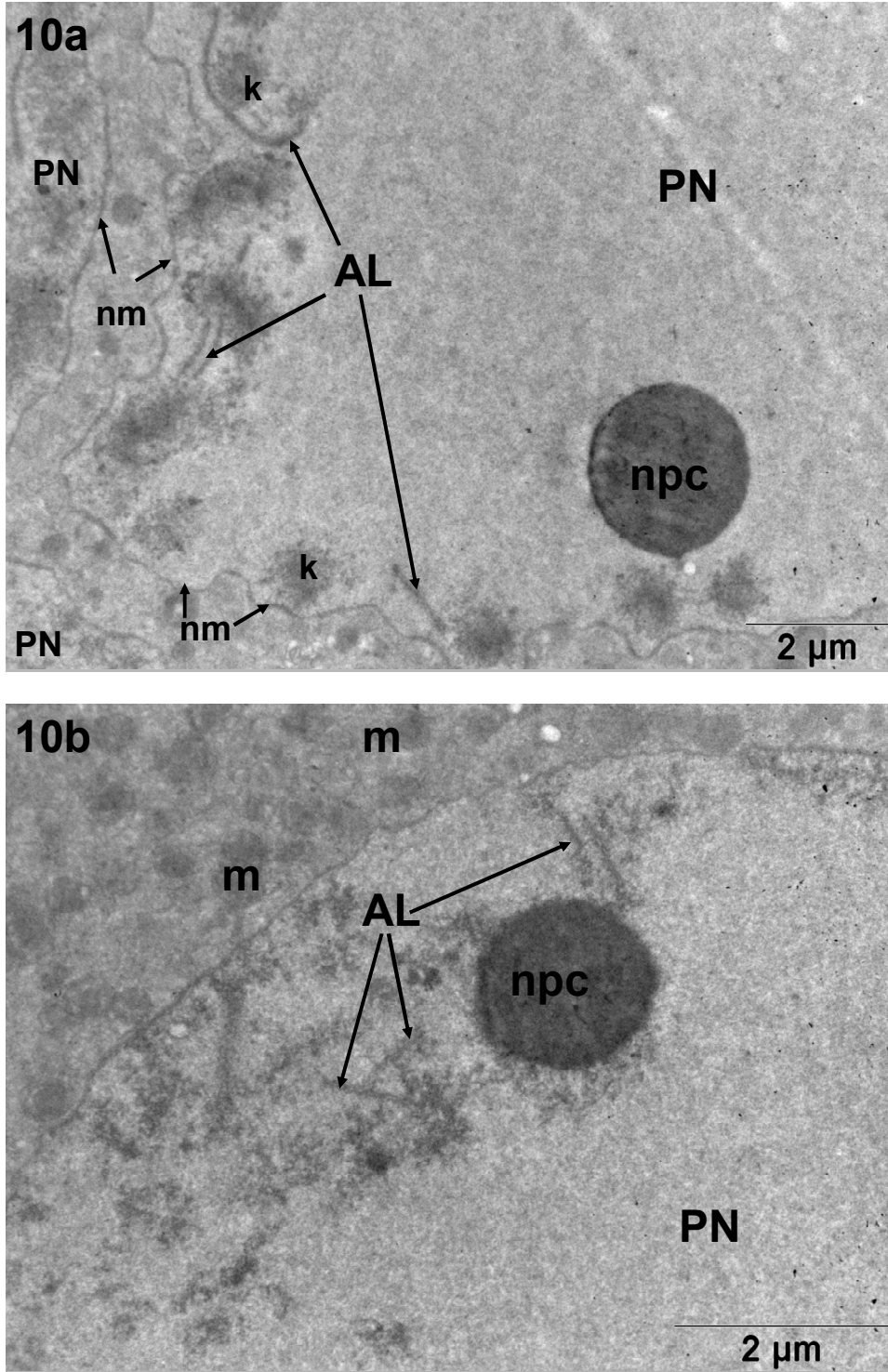
Resim 4-8: Seri kesitler üzerinden incelen nukleolar prekürsör cisimlerin konumlarına ait şekil. Farklı daire renkleri ardışık farklı kesitlerde ortaya çıkmış granüler ve fibriller formdaki NPC'leri ifade etmektedir. Tam daire: fibriller form, yıldız şekilli daire: granüler form, Siyah: İlk kesit, kırmızı: ikinci kesit, mavi: üçüncü kesit, mor: dördüncü kesit.



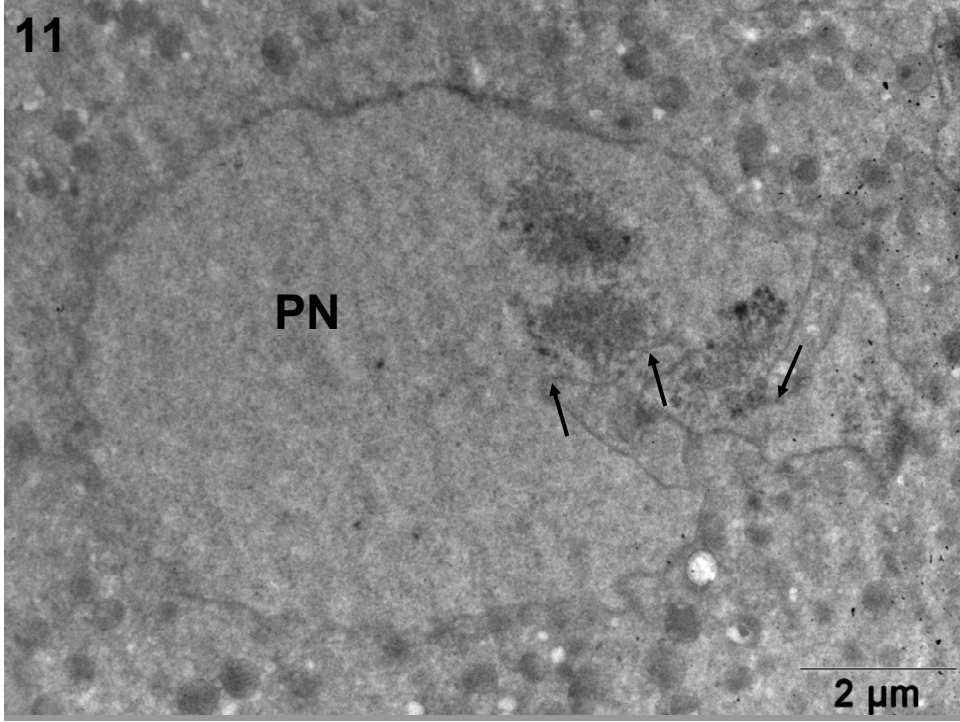
Resim 4-9a-b: Sitoplazmik annulat lamel birikimine ait elektron mikroskobu fotoğrafı. 9a ve 9b: Perinuklear alanda Annulat lamel birikimi var. AL: Annulat lamel, PN: pronukleus, npc: nukleolar prekürsör cisim, m: mitokondri



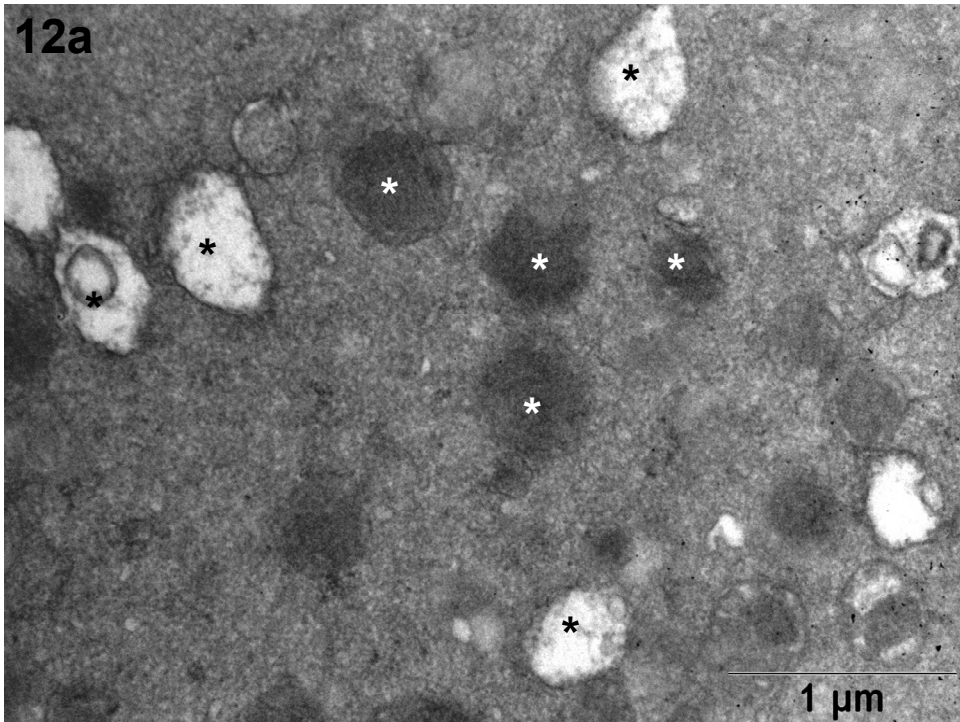
Resim 4-9c-d: Sitoplazmik annulat lamel birikimine ait elektron mikroskobu fotoğrafi. 9c ve 9d: Perinuklear alanda Annulat lamel birikimi var. AL: Annulat lamel, PN: pronukleus, npc: nukleolar prekürsör cisim, m: mitokondri



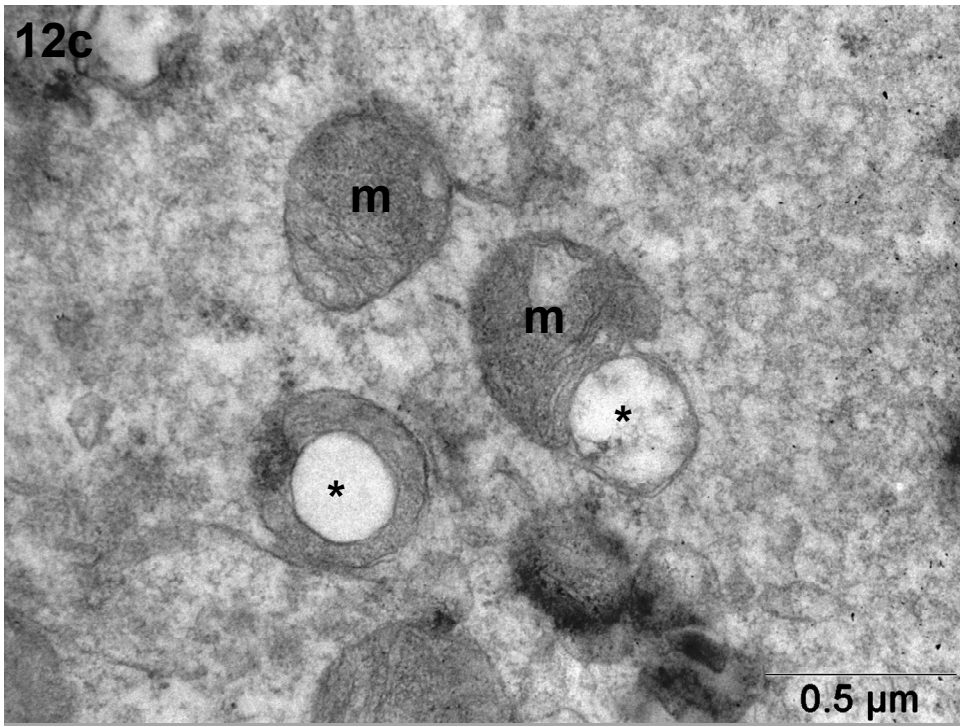
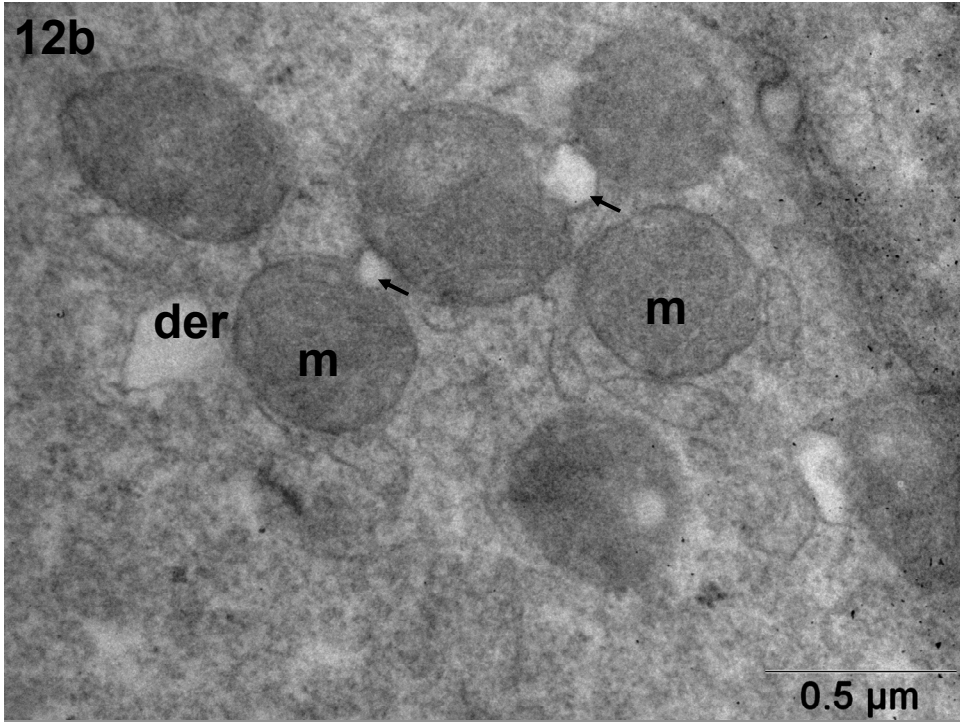
Resim 4-10a-b: İntrapronuklear annulat lamel birikimine ait elektron mikroskop fotoğrafi. 10a ve 10b: Pronukleus içinde kromatin ile ilişkili Annulat lamel birikimi mevcut. PN: pronukleus, AL: Annulat lamel, nm: nuklear membran, npc: nukleolar prekürsör cisim, m: mitokondri, k: kromatin



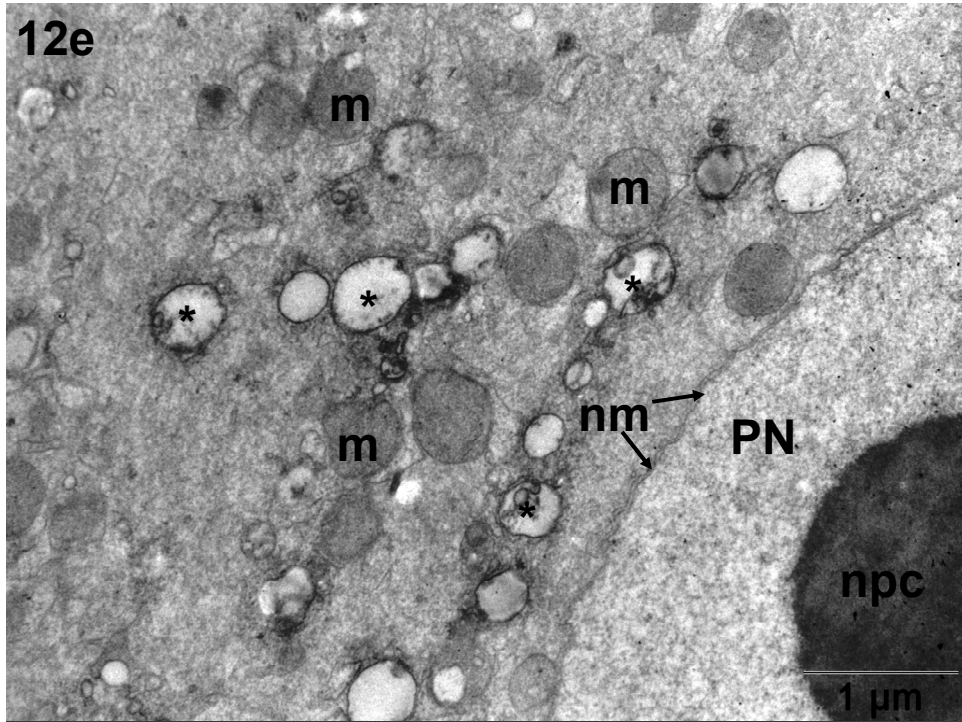
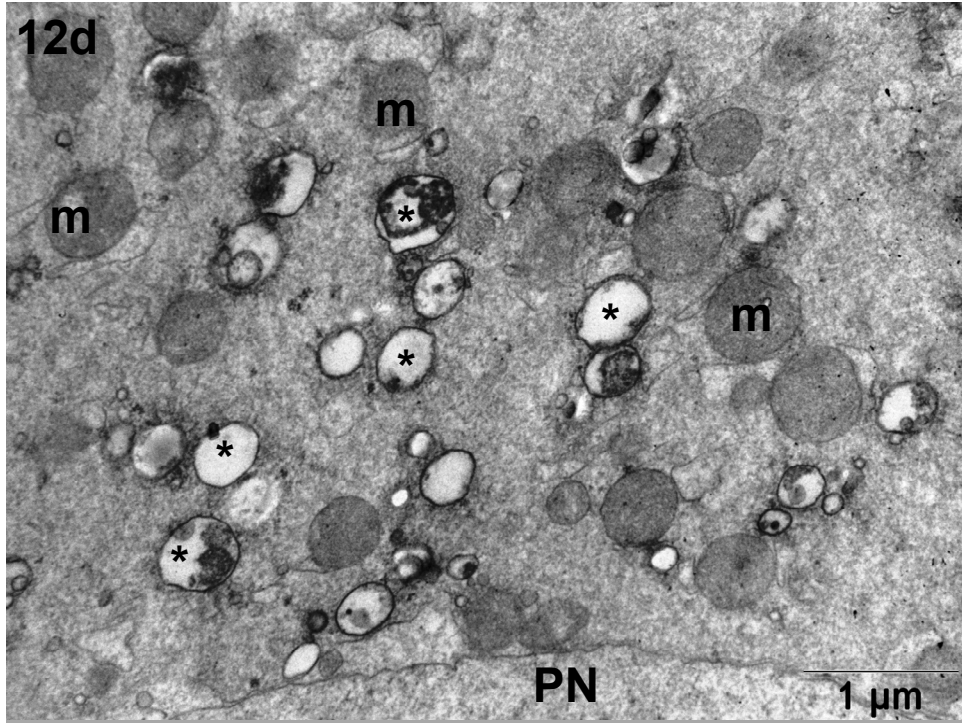
Resim 4-11: Pronukleus nuklear membranındaki invajinasyona ait elektron mikroskop fotoğrafı. Nuklear membrandaki invajinasyon (oklar) görülüyor. PN: pronukleus



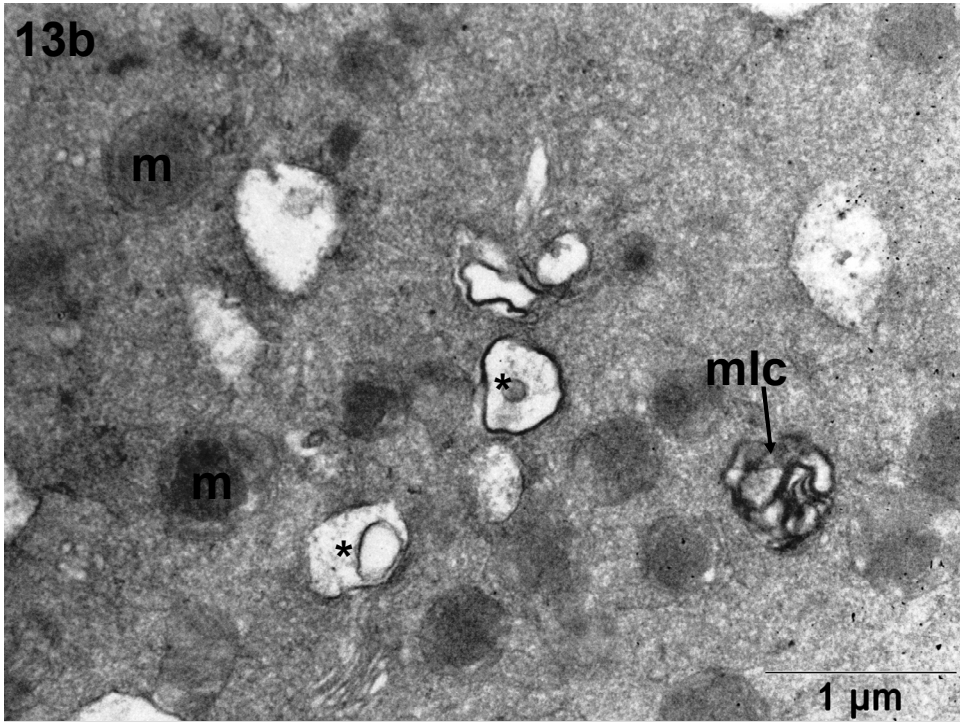
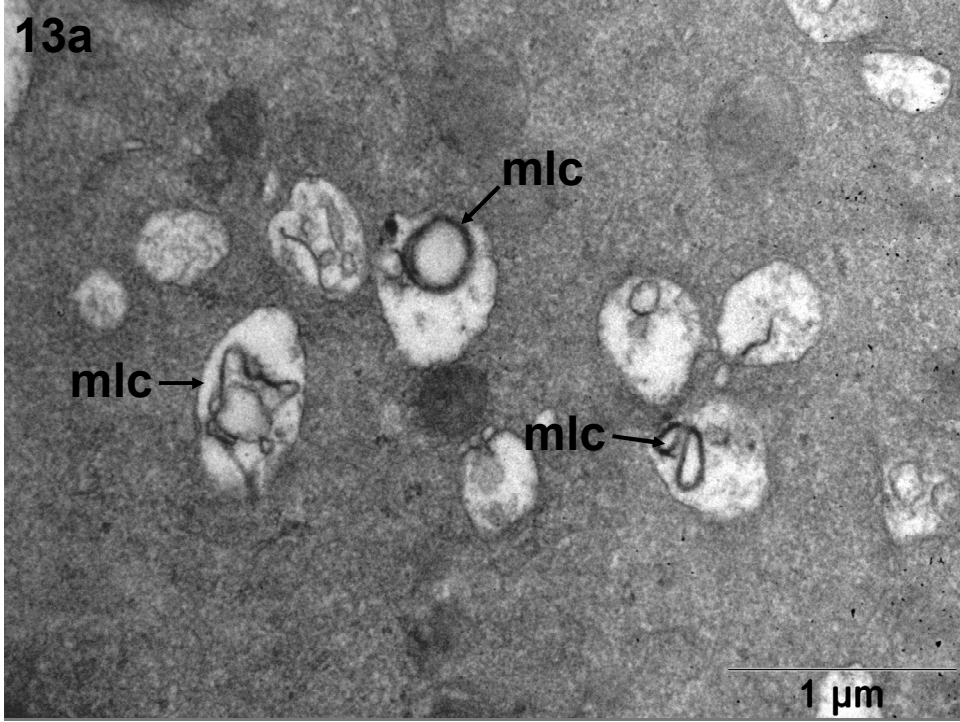
Resim 4-12a: Mitokondri ince yapı anormalliklerine ait elektron mikroskobu fotoğrafı. 12a: Ooplazmada yoğun matriksli mitokondri (beyaz yıldız) ile dejenere mitokondri (siyah yıldız) bir arada izleniyor.



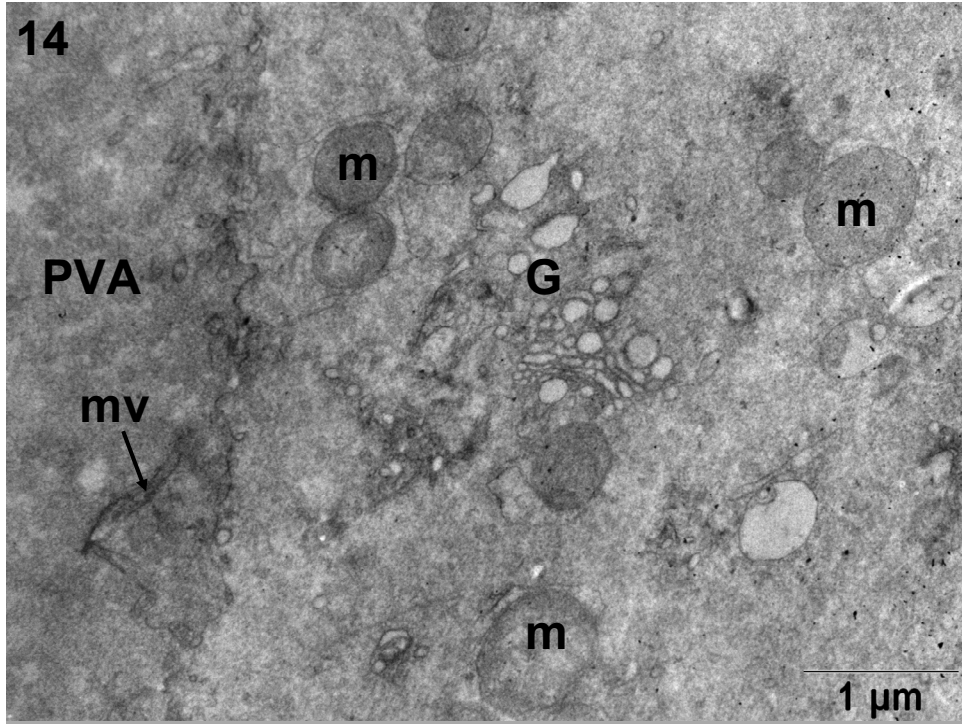
Resim 4-12b-c: Mitokondri ince yapı anormalliklerine ait elektron mikroskobu fotoğrafları. 12b: Mitokondride vakuolizasyonun başlangıcı (ok) görülüyor. 12c: Mitokondri matriksindeki vakuoller (yıldız) izleniyor. m: mitokondri, der: düz yüzlü endoplazma retikulumu



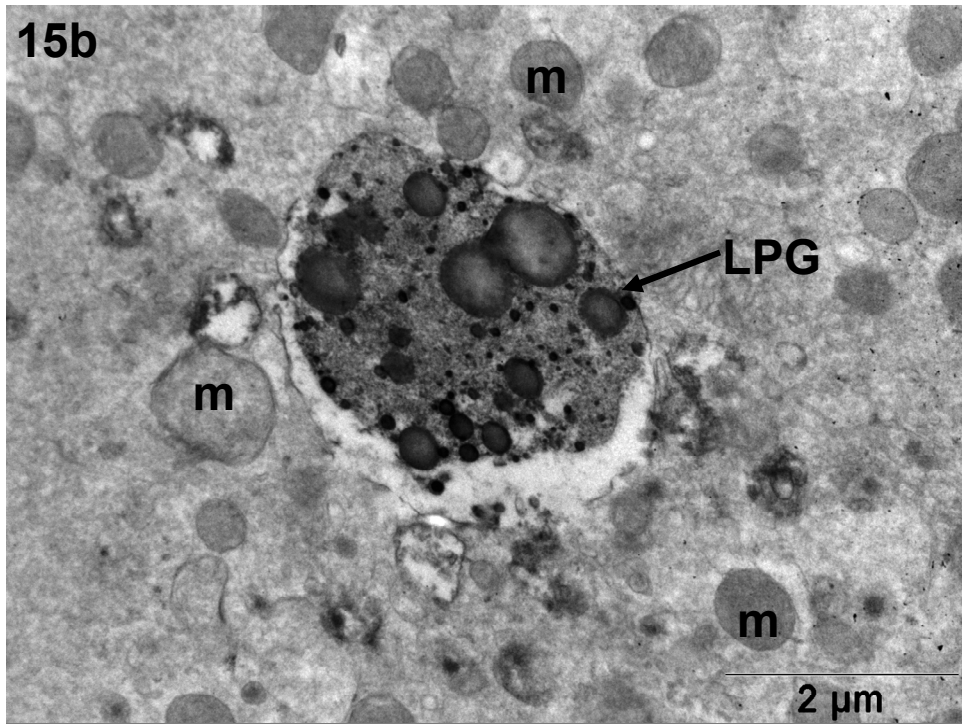
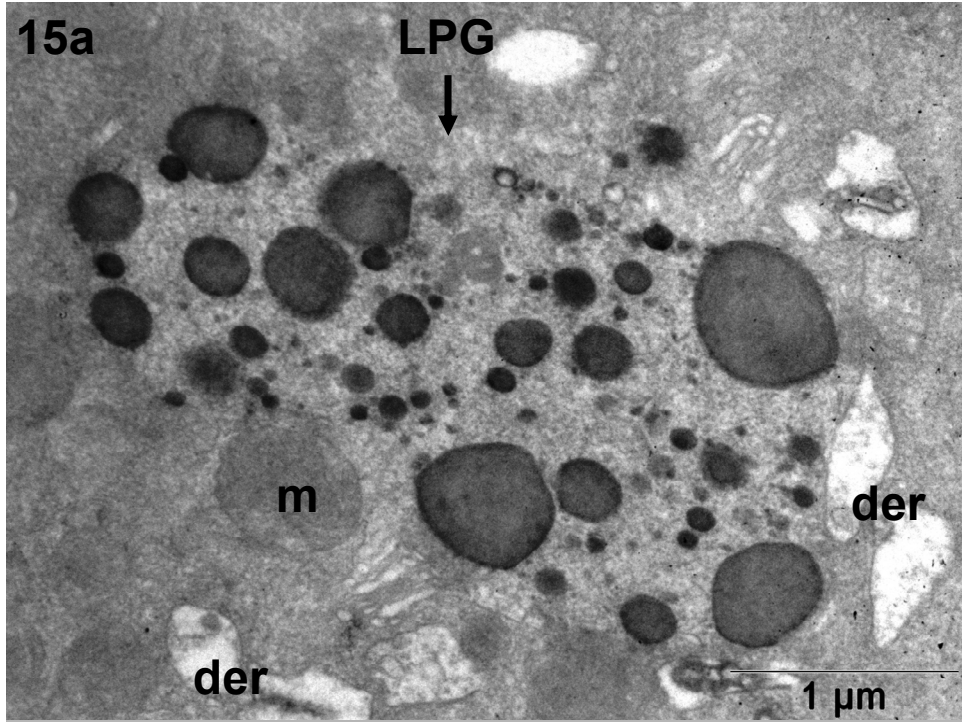
Resim 4-12d-e: Mitokondri ince yapı anormalliklerine ait elektron mikroskobu fotoğrafları. 12d ve 12e: PN yakınındaki mitokondride vakuolizasyon (yıldız) görülüyor. PN: pronukleus, npc: nukleolar prekürsör cisim, m: mitokondri, nm: nuklear membran



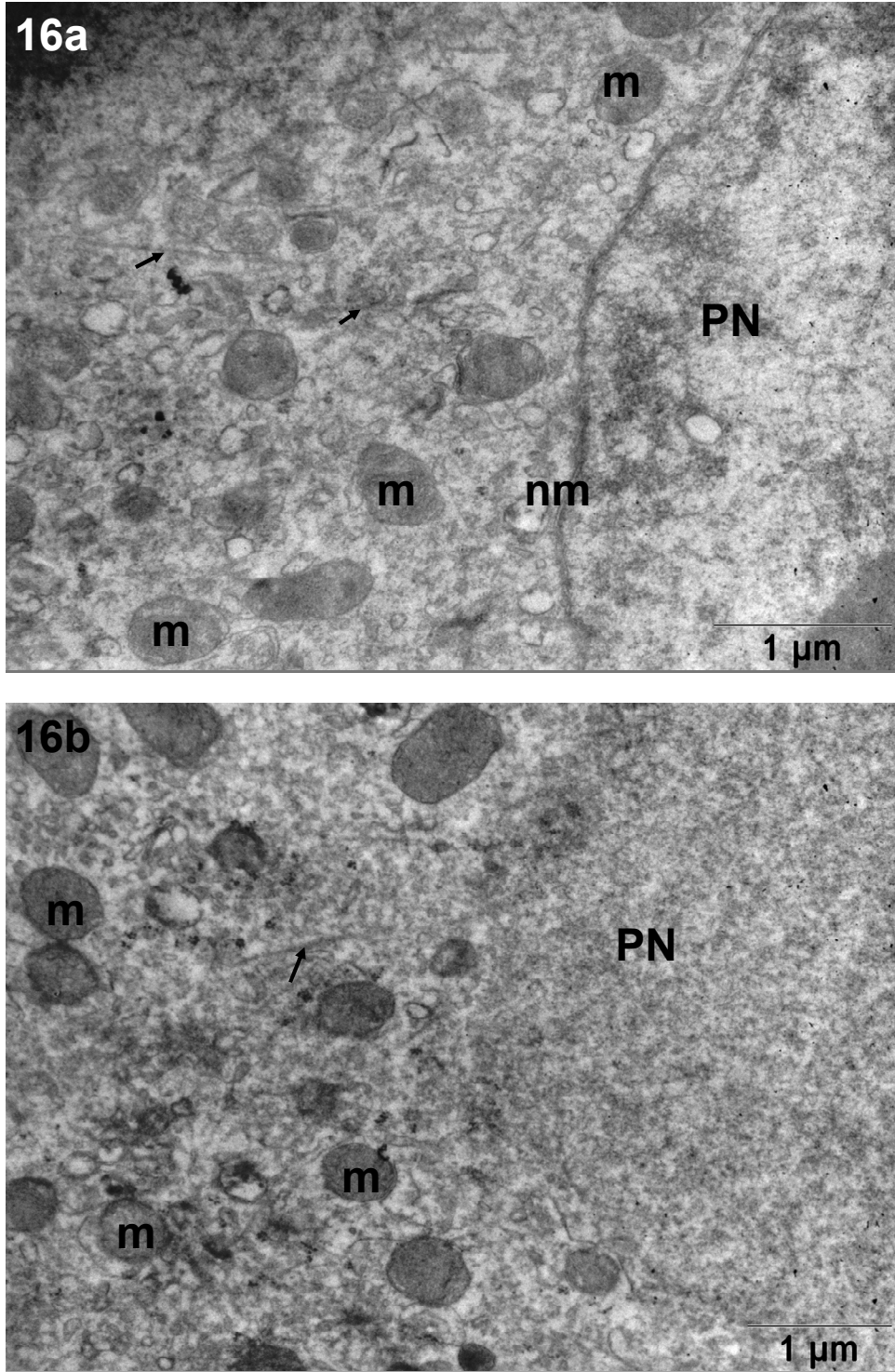
Resim 4-13a-b: Multilamellar cisimlere ait elektron mikroskop fotoğrafı: 13a ve 13b: Mitokondri matriksinde multilamellar cisim oluşumu mevcut. m: mitokondri, yıldız: dejenere mitokondri, mlc: multilamellar cisim



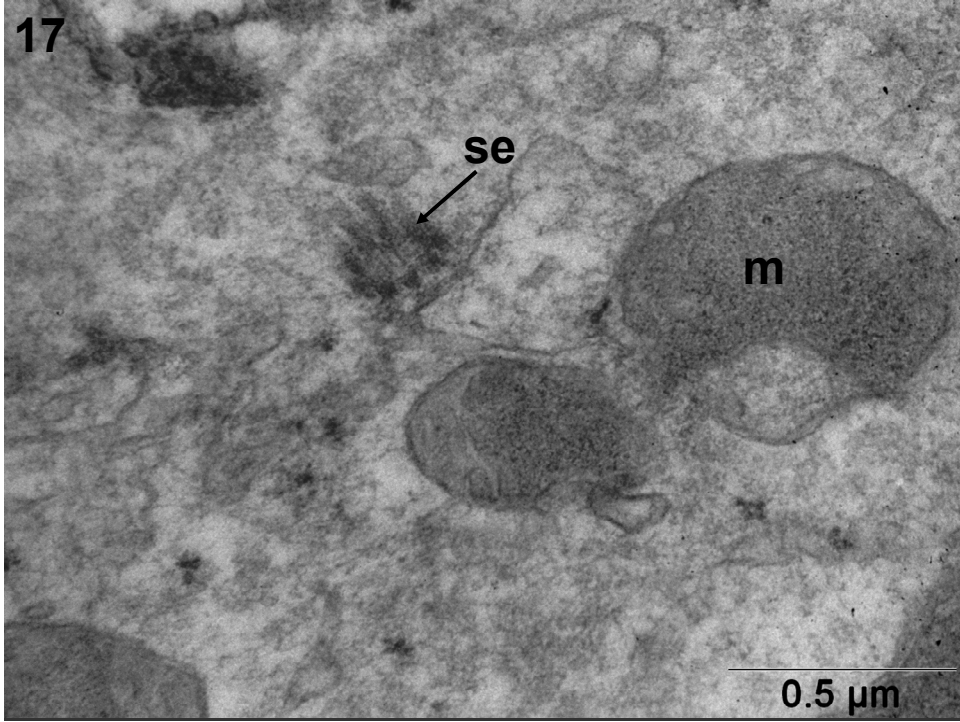
Resim 4-14: Golgi aygıtına ait elektron mikroskobu fotoğrafı. Ooplazmanın kortikal alanında yerleşmiş Golgi aygıtı izleniyor. PVA: Perivitellin aralık, mv: mikrovili, m: mitokondri, G: Golgi aygıtı



Resim 4-15a-b: Lipofuskin granüllerine ait elektron mikroskop fotoğrafları. 15a ve 15b: Ooplazma içerisinde yağ damlası birikimleri ile büyük lipofuskin granülleri mevcut. LPG: lipofuskin granülü, m: mitokondri, der: düz yüzlü endoplazma retikulumu



Resim 4-16: Mikrotübüllere ait elektron mikroskobu fotoğrafları. 16a ve 16b: Pronukleusların çevresinde nuklear membrana uzanan mikrotübüller (ok) izleniyor. PN: pronukleus, m: mitokondri, nm: nuklear membran, ok: mikrotübül

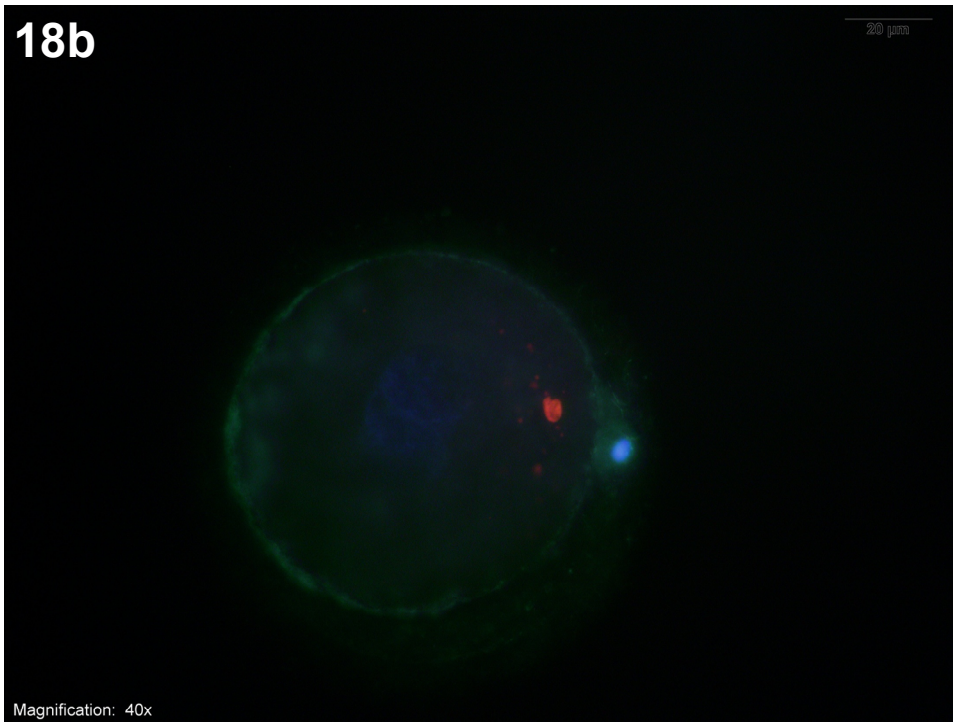
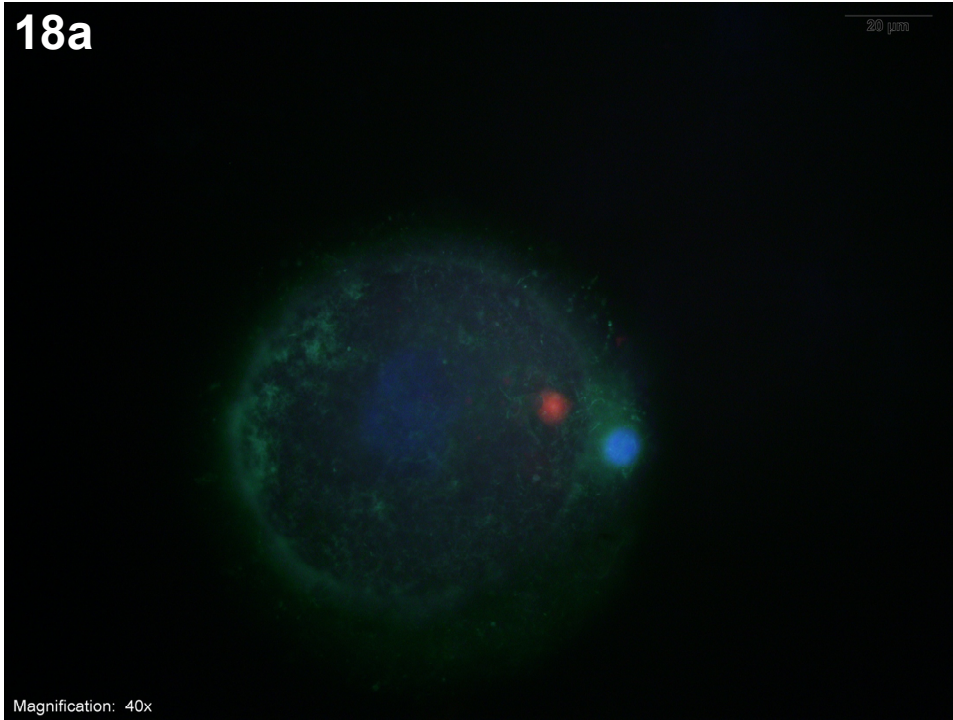


Resim 4-17: Sentirole ait elektron mikroskop fotoğrafı. Pronukleus yakınında sentriol mevcut. se:sentriol, m: mitokondri

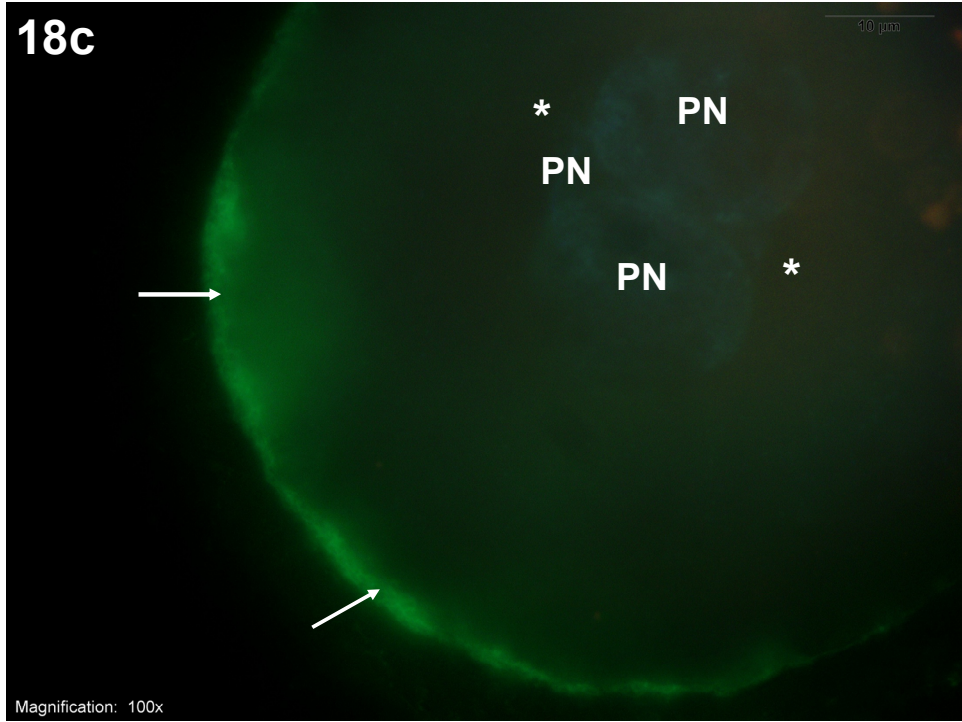
4.2. İmmunfloresan Çalışmasının Bulguları:

Aktin filamanların dağılımı esas olarak oositin kortikal alanında yoğunlaşmıştı. Pronukleusların çevresinde herhangi bir aktin filaman birikimine raslanmadı (Resim 4.18a, 4.18b ve 4.18c).

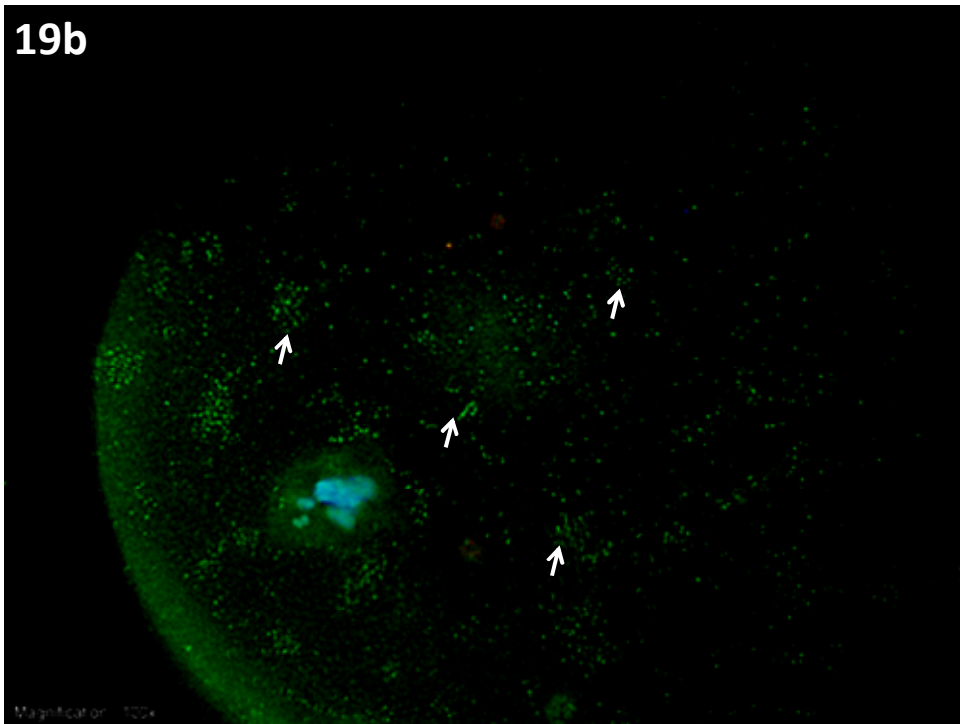
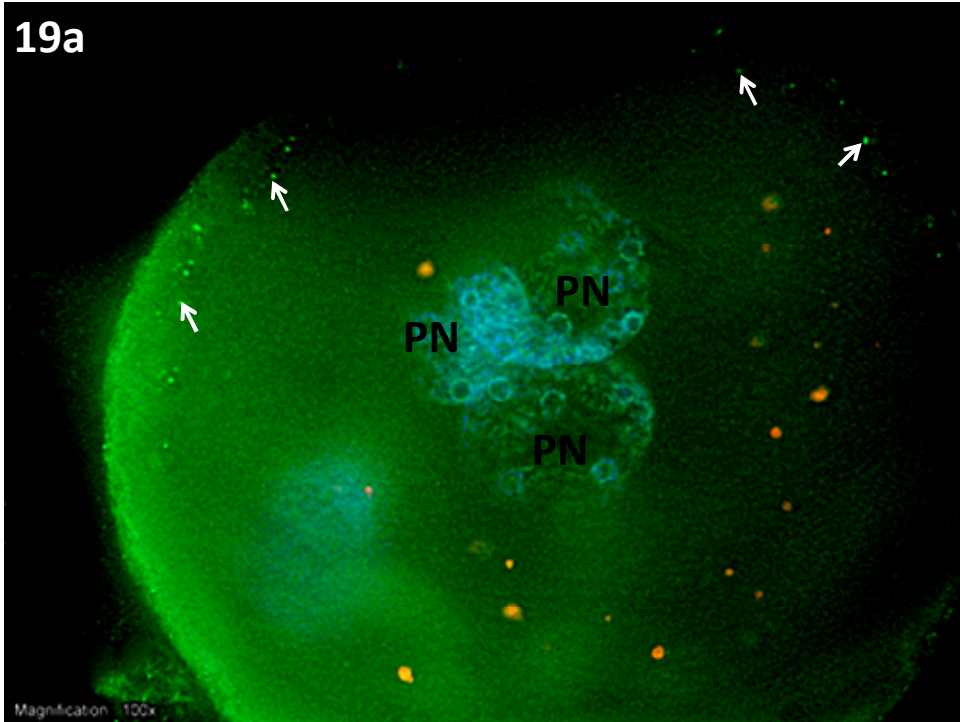
Gama tübülün plazma membranının altında tüm oositi çevreleyecek şekilde çok sayıda küçük tanecikler halinde işaretlenme sergiledi (Resim 4.19a, 4.19b, 4.19c ve 4.19d).



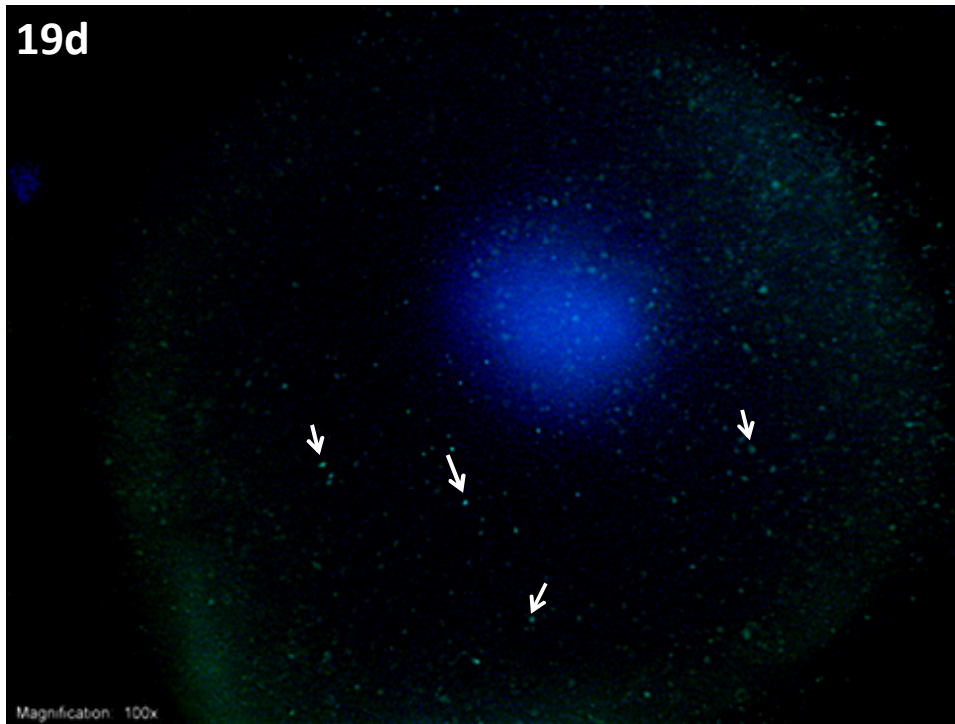
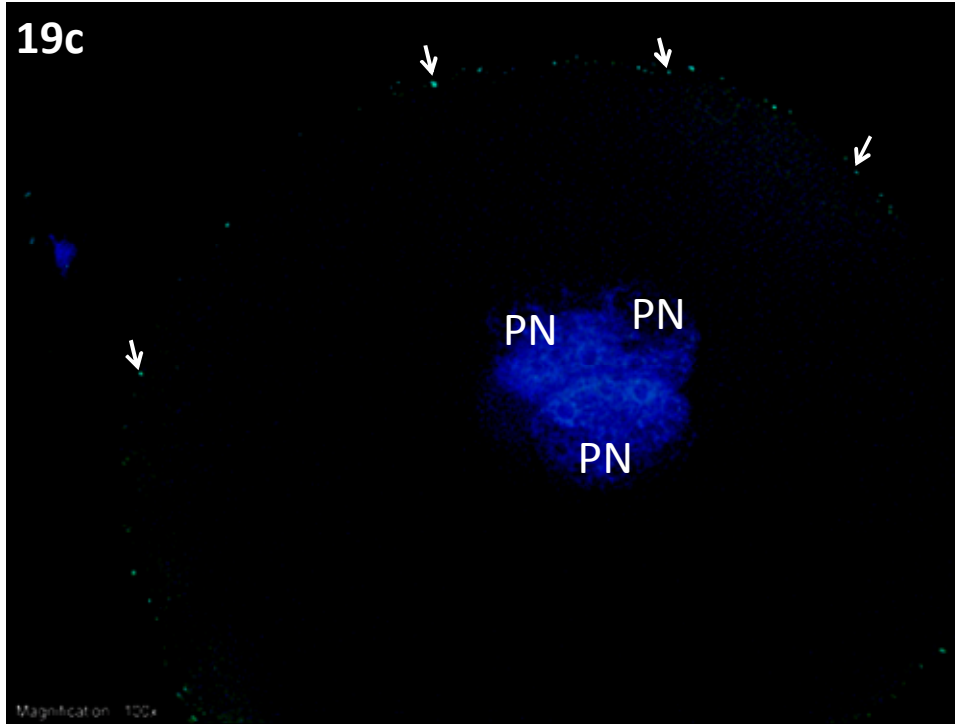
Resim 4-18a-b: Üç pronukleuslu oositlerde FITC – falloidin ile işaretlenen aktin filamanların düzenini gösteren floresan mikroskop fotoğrafı. 18a: Oositin yüzey ekseninden aktin filamanların immünfloresan reaksiyonu 18b: Oositin merkez ekseninden aktin filamanların immünfloresan reaksiyonu. (x40) PN: pronukleus (DAPI ile mavi renk), aktin filamanlar (FITC – falloidin ile yeşil renk)



Resim 4-18c: Üç pronukleuslu oositlerde FITC – falloidin ile işaretlenen aktin filamanların düzenini gösteren floresan mikroskop fotoğraf. 18c: Merkezde bulunan pronukleusların düzleminde aktin filamanlar kortikal alanda mevcut (ok), pronukleusların çevresinde işaretlenme yok (yıldız). (x100) PN: pronukleus (DAPI ile mavi renk), aktin filamanlar (FITC – falloidin ile yeşil renk)



Resim 4-19a-b: Üç pronukleuslu oositlerde gama – tübülün dağılımını gösteren floresan mikroskop fotoğrafı. 19a: Üç pronukleuslu oositin merkez düzleminden kortikal alanda konumlanmış gama – tübülün immünfloresan işaretlenmesi. 19b: Üç pronukleuslu oositin kortikal yüzeyinde yoğun gama – tübülün immünfloresan işaretlenmesi. PN: pronukleus, ok: gama - tübülün



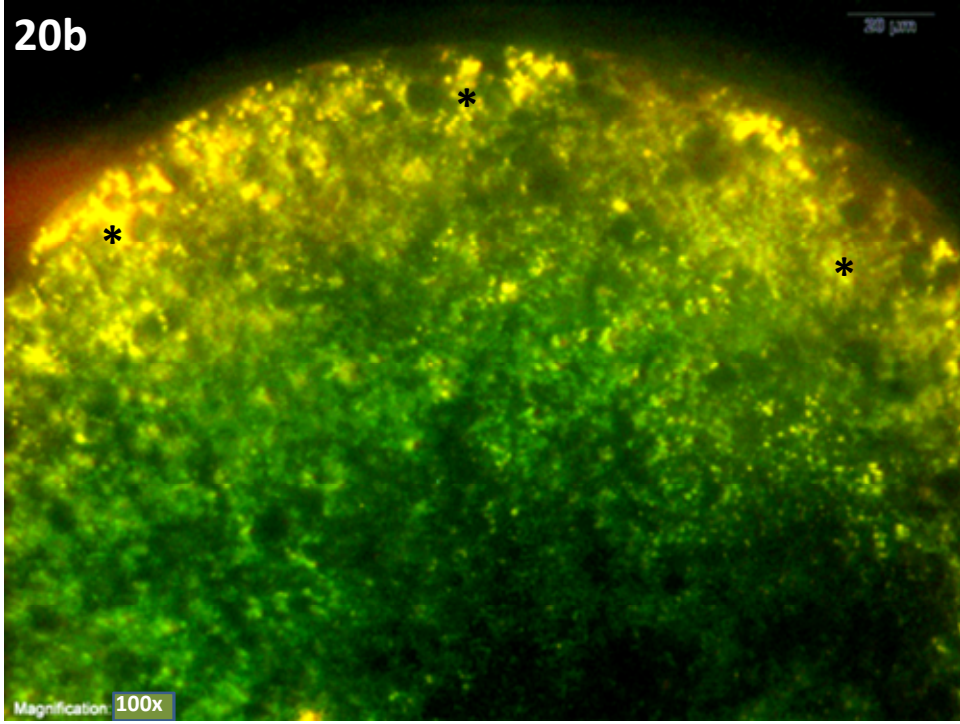
Resim 4-19c-d: Üç pronukleuslu oositlerde gama – tübülün dağılımını gösteren floresan mikroskop fotoğrafı. 19c: Üç pronukleuslu oositin merkez düzleminde kortikal alanda konumlanmış gama – tübülün immünfloresan işaretlenmesi. 19d: Üç pronukleuslu oositin kortikal yüzeyinde yoğun gama – tübülün immünfloresan işaretlenmesi. PN: pronukleus, ok: gama - tübülün

4.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Çalışması Bulguları:

Sarı-turuncu floresan işareti ile kendini belli eden yüksek membran potansiyeline sahip mitokondri birikimi subplazmalemmal alanda izlendi. Oositin merkezinde toplanmış mitokondri yaydığı yeşil floresan ile düşük membran potansiyelinin varlığını işaret ediyordu (Resim 4.20a, 4.20b).



Resim 4-20a: Üç pronukleuslu oositlerde mitokondri membran potansiyelinin floresan mikroskop fotoğrafı. JC-1 agregat birikimi ile sarı-turuncu renkli görülen yüksek membran potansiyeline sahip mitokondri (yıldız) özellikle oositin subplazmalemmal alanında mevcut.



Resim 4-20b: Üç pronukleuslu oositlerde mitokondri membran potansiyelinin floresan mikroskop fotoğrafı. JC-1 agregat birikimi ile sarı-turuncu renkli görülen yüksek membran potansiyeline sahip mitokondri (yıldız) özellikle oositin subplazmalemmal alanında mevcut.

5. TARTIŞMA

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulaması sonrası oosit aktivasyon sürecine girer. Bunlar sırasıyla, kortikal granüllerin ekzositozu, reseptör aracılı endositozun artışı, kortikal alanda bulunan endoplazma retikulum sisternalarının yeniden düzenlenmesi (tübüler sisternaların dağılması, büyük vesiküllerin iç sitoplazmaya gitmesi), ikinci kutup cisminin atılması ile mayozun tamamlanması ve erkek pronukleusun oluşumudur. Bu olayların herhangi birinde meydana gelen bir eksiklik fertilizasyon bozukluğuna sebep olur (El Shafie ve ark. 2000 pp. 37).

Mayoz sırasında memeli oositi arada replikasyon evresi olmaksızın 2 adet hücre bölünmesi geçirir. İki bölünme de asimetriktir ve sonuçta iki adet küçük kutup cismi ve bir adet büyük haploid kromozom içeren yumurta oluşur. Asimetrik bölünmelerin kusursuz bir şekilde gerçekleşebilmesi için mayotik iğ ipliğinin oositin kortikal alanında kutup cisminin dışarıya atılacağı bölgeye oldukça yakın bir şekilde konumlanmasına ihtiyaç vardır (Yi ve ark. 2011, Brunet ve Verlhac 2011, Levi ve ark. 2011). Ovulasyon ile graaf folikülünden atılan M-II evresinde bekleyen oosit belirli bir süre içerisinde döllenmek zorundadır (Miao ve ark. 2009). Memeliler de dâhil olmak üzere birçok omurgalıda oosit MII evresinde, fertilizasyonun gerçekleşmesi için saatler veya günlerce bekler (Brunet ve Maro 2005). Optimal fertilizasyon süresi türler arasında farklılık göstermekle birlikte bu süre insan oositi için 24 saatten daha kısadır. Eğer bu süre içerisinde bir sperm tarafından döllenemezse oositin kalitesinde zamana bağlı olarak bozulmalar meydana gelir. Bu duruma oosit yaşlanması denir. Yaşlı oositlerde fertilizasyon oranının azalması, polispermi, dijini, partenogenez, kromozomal anormallikler, apoptoz, aktivasyon uyarısına aşırı hassasiyet, II. mayoz anafazının başlaması, kortikal granüllerin kısmi ekzositozu, zona pellusida'da yapısal değişim ve sertleşme, MPF ve mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) aktivitesinin azalması, epigenetik değişimler ve anormal ve/veya gerileyen embriyo/fetüs gelişimi gibi fonksiyonel değişimler izlenir (Miao ve ark. 2009). Oositte yaşlanma ister in vitro ister in vivo gerçekleşsin, oositin morfolojik özelliklerinde değişimlere neden olur. Zona pellusida'da sertleşme (Nogues ve ark. 1988), perivitellin aralıkta genişleme (Miao ve ark. 2004), plazma membranında hem fertilizasyon öncesi hem de fertilizasyon sonrası anormallikler (Dalo ve ark. 2008), normalde hemen plazma membranının altında

konumlanmış olan kortikal granüllerin düzeninde sapmalar (Diaz ve Esponda 2004, Miao ve ark. 2009), aktin filamanların düzeninde ve iğ ipliğinin konumunda bozulmalar (Jin ve ark. 2010), ooplazma içerisinde dominant organel olarak bulunan mitokondri yapısında ve ATP üretiminde değişiklikler (Bruin ve ark. 2004, Hao ve ark. 2009) ve fertilizasyon sonrası Ca^{+2} dalgalanmalarında değişiklikler olduğu (Takahashi ve ark. 2009) bildirilmiştir. Ovulasyon sonrası ampullada fertilizasyon için bekleme süresinin uzaması sonucu meydana gelen oosit yaşlanmasına bağlı morfolojik değişimler, oositlerin yardımcı üreme tekniklerinin uygulanması için kültür ortamında bekletilmesi sırasında meydana gelen yaşlanmaya bağlı değişimler ile aynıdır. Fertilizasyon için bekleme sürecinde asimetrik konumlu iğ ipliği pozisyonunun devam ettirilmesi gerekmektedir. Düşük kaliteli ve ovulasyon sonrası yaşlanmaya maruz kalan oositlerde bu asimetrinin bozulması söz konusudur (Sun ve ark. 2011). İğ ipliği ve kromozomların asimetrik pozisyonundaki kayıp yaşlı kadınlarda üreme potansiyelinin düşmesine neden olmaktadır (Yi ve ark. 2011).

İn vivo ya da in vitro yaşlanma sürecinin asimetrik bölünmede birbirini izleyen olayları kontrol eden hücre iskeleti elemanları mikrofilamanlar ve mikrotübüller üzerinde olumsuz etkileri vardır. MII evresindeki tüm memeli oositlerin kortikal alanında ince ve kalın mikrofilaman bölgeleri vardır. İğ ipliği kalın mikrofilaman bölgesinde bulunur ve bu bölgenin varlığı asimetrik bölünme ile oluşan kutup cisminin atılması için önemlidir. Jin ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada in vitro ortamda yaşlandırılan kedi oositlerinde MII evresindeki kalın mikrofilaman bölgesinin oluşmadığı ve bu alanda bulunan iğ ipliğinin ise oositin merkezine göç etmiş olduğu bildirilmiştir. Bu oositlerde sitokinez gerçekleşmiş ama ikinci kutup cismi dışarıya atılamayarak ekstra dişi pronukleusu oluşturmuştur (Jin ve ark. 2010). Yaşlı domuz oositlerinde de metafaz kromatininin mikrofilamandan zengin periferel pozisyonundan oositin merkezine göç ettiği bildirilmiştir (Kim ve ark. 1996b). Suzuki ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada genç domuz oositlerinde aktin filamanının tüm sitoplazmada dağılım gösterdiğini ve özellikle de kortikal bölgede yoğun olduğunu belirtmiş, yaşlanmış oositlerde ise hem ooplazma hemde kortikal alandaki mikrofilaman dağılımının azaldığını bildirmiştir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak birçok çalışmada da oosit yaşlanması sırasında iğ ipliğini oosit korteksine bağlayan periferel aktin filamanların önemli derecede azaldığı bildirilmiştir (Webb ve ark. 1986, Kim ve ark. 1996a; 1996b). Çalışmamızda ikinci kutup cismini atamamış pronuklear evredeki oositler incelenmiştir.

Pronuklear evredeki oositlerde mikrofilamanlar oositin korteksinde ve birbirine yaklaşmış merkezdeki pronukleusların çevresinde izlenir (Kim ve ark. 1997, Branzini ve ark. 2007). Çalışmamızda 3 pronukleuslu oositlerde FITC - falloidin ile işaretlendiğimiz aktin filamanlar yalnızca oositin kortikal alanında izlenirken pronukleusların çevresinde işaretlenmeye rastlanmadı. Bu bulgu incelediğimiz oositlerde aktin dinamiğinin bozulmuş olduğunun göstergesi olabilir. Çalışmamızda etik kurallar sebebi ile 2 pronukleuslu kontrol grubu olarak değerlendirebileceğimiz oositler kullanılamamıştır. Bununla birlikte literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında çalışmamızda kullanılan oositlerdeki aktin filamanların pronukleusların çevresinde olmaması yaşlı oositlerde olduğu gibi aktin filaman yoğunluğundaki azalmanın göstergesi olabilir.

ICSI uygulamaları sonucunda 3 pronukleuslu oosit oluşum oranı yaklaşık olarak % 3'tür (De Vos 2000). M-II evresindeki bir oositte genel olarak metafaz iğ ipliği birinci kutup cisminin oldukça yakınında konumlanmış olarak bulunur. ICSI uygulaması sırasında 1. kutup cismi saat 12 ya da 6 hizasına alınır ve 90 derece açı ile tek bir sperm ooplazma içerisine enjekte edilir. Böylece mikromanipulasyon sırasında iğ ipliğinin bütünlüğüne zarar verilmez. Normal fertilizasyon oranı yüksek olan oositlerde bu şekildeki konumlanma yüzdesi yüksek olmasına rağmen (Moon ve ark. 2005) bazı oositlerde iğ ipliği ile kutup cismi arasında farklı açılarda büyüyen mesafeler izlenebilir. Rienzi ve ark. (2003) yaptığı çalışmada kutup cismi ile iğ ipliği arasında 90°'den büyük açı olan oositlerde ikinci kutup cismini atamadığı için 3 PN zigot oluşturma oranının yüksek olduğunu belirtmiştir. Öte yandan iğ ipliği ile kutup cismi arasındaki uzaklığın oositin in vitro yaşlanmasıyla doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (Miao ve ark. 2004). Yaptığımız çalışmada kullanılan oositlerde in vivo veya in vitro şartlara bağlı olarak meydana gelebilecek yaşlanma süreci sonucu metafaz iğ ipliğinin kutup cismine yakın olası konumundan ayrılıp plazma membranı boyunca uzaklaşması mümkün olabilir. Buna bağlı olarak saat 3 yönünden yapılan ICSI manipulasyonu bu bölgeye kaymış olan iğ ipliğinin yapısını bozmuş ve 2. kutup cisminin atılma sürecini olumsuz etkilemiş olabilir.

Asimetik bölünmenin gerçekleşebilmesi için iğ ipliğinin kortekse taşınması gerekmektedir. İnsanda olduğu gibi anastral sistemlerde iğ ipliği göçü mikrotübüllerden bağımsızdır (Ai ve ark. 2009). Oositlere mikrotübül polimerizasyon inhibitörü

nokodazol uygulandığında iğ ipliği oluşumu bozulsada kondanse kromozomların kortekse göç ettiği bildirilmiştir (Ai ve ark. 2009, Verlhac ve ark. 2000, Sun ve ark. 2001). Mikrofilamanlar sentrozom lokasyonu, iğ ipliğinin perifere hareketi, oosit polaritesinin kazanılması gibi birçok kortikal süreçte önemli rol oynar. Oositin merkezinde meydana gelen iğ ipliği bölünmenin asimetric olarak gerçekleşebilmesi için aktin filamanlar aracılığıyla oositin korteksine taşınır (Yi ve ark. 2011, Brunet ve Verlhac 2011, Levi ve ark. 2011, Ai ve ark. 2009). Sitokalsin B veya Jasplakinolid gibi ajanlar ile mikrofilaman dinamiğinin bozulması iğ ipliğinin kortekse göçünü engeller (Dumont ve ark. 2007, Terada ve ark. 2000). Kromozomların mikrofilamanlar aracılığı ile göç etme süreci hemstır (Terada ve ark. 1995), sığır (Kim ve ark. 2000), domuz (Sun ve ark. 2001) ve insan (Kim ve ark. 1998) gibi çeşitli türlerde gösterilmiştir. Göçün gerçekleşebilmesi için dinamik bir aktin filaman ağıının oluşması gereklidir. Non-filamentöz globular aktinin, filamentöz aktine polimerizasyonu ve aktin ağıının oluşumu Aktin related protein (Arp 2/3) kompleksi, Formin – 2, Cell division cycle - 42 (CDC-42), ve Spire (Spire - 1 ve Spire - 2) proteinleri gibi sinyalleşme moleküllerine bağlıdır. Kortekse yerleşme gerçekleştikten sonra iğ ipliğinde konumlanmış olan kromozomların Ran-GTPaz sinyal yolağı üzerinden etkileşimi ile iğ ipliğinin hemen üzerinde olan kortikal bölge filamentöz aktinden zengin bir özellik kazanır. Bu bölgeye kortikal aktin kep denir ve kutup cisminin atılmasında rol oynar (Yi ve ark. 2011, Verlhac 2011). Metafaz – anafaz geçişinde yarıklanma oluğu iğ ipliğinin orta zonunu çevreleyecek şekilde kortikal bölgede oluşur ve birinci kutup cismi atılır. İkinci mayoz bölünmeye başlayan oosit, II. metafaz evresinde durur ve ancak fertilizasyon ile oositin aktive edilmesi bu evreden çıkıp II. mayozu tamamlamasını sağlar. İnsan MII oositinin iğ ipliği, ekseni plazma membranına dik olacak şekilde filamentöz aktinden zengin kortikal aktin kepin hemen altında konumlanmıştır. Fertilizasyon ile oositte asimetric olarak yarıklanma oluğu oluşur, II. kutup cismi atılır ve böylece metafaz evresinde durakladığı II. mayozunu tamamlar (Yi ve ark. 2011, Brunet ve Verlhac 2011, Levi ve ark. 2011). Asimetric bölünmenin kusursuz şekilde gerçekleşebilmesi için iğ ipliğinin ekzantrik olarak pozisyon almasında aktin iskeletin lokal reorganizasyonu görev yapar (Brunet ve Verlhac 2011). Yi ve ark. (2011) fare oositleri üzerinde yaptıkları çalışmada MII iğ ipliğinin kortikal lokalizasyonunun devam ettirilmesinin aktin nukleasyonundan sorumlu olan Arp 2/3 kompleksine bağlı olduğunu bildirmiştir. Arp 2/3 etkinliği ile metafaz II evresindeki oositlerde zenginleşen aktin filamanlar kortikal kepten plazma

membranına paralel olacak şekilde sürekli bir akım halindedir. Akım sırasında sitoplazmik partiküller de aktin akımına paralel olacak şekilde hareket ederler. (Yi ve ark. 2011, Verlach 2011). Bu olayda aktin akımı, kortikal kepten başlar, lateral korteks boyunca aşağı doğru devam eder, oositin merkezine dönüp tekrar yukarıya yani kortikal kepe doğru yönelir. Böylece aktin akımı, iğ ipliğinin kortekste kalmasını sağlayacak şekilde ona baskı uygular. Kortikal aktin akımı sitokinezin gerçekleşebilmesi için önemlidir. F-aktin, miyozin-2 ve mikrotübül hasarı meydana getirildiğinde aktin akımının bozulduğu bildirilmiştir. (Fishkind ve ark. 1996, Shelton ve ark. 1999). Canman ve arkadaşlarının (1997) *Xenopus* oositi üzerinde yaptıkları çalışmada sitokalsin – D ve latrunculin – B gibi ajanlarla F-aktin hasara uğrattığında kortikal akımın durduğu bildirilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada miyozin inhibitörlerinin de aktinin kortikal akımını bloke ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar kortikal aktin akımının hücre yüzey proteinlerinin yeniden düzenlenmesi ile ilgili olduğunu göstermiştir. Hücre yüzey proteinlerinde yüksek konsantrasyonlarda lektinler ile çapraz bağların oluşturulması kortikal aktin akımını baskılar ve dolayısıyla sitokinez gerçekleşmez (Benink ve ark. 2000, Canman ve Bement 1997). Ayrıca aktin filaman nukleasyonundan sorumlu Arp 2/3 kompleksinin baskılanması da aktin akımını bozar (Yi ve ark. 2011). Sun ve ark. (2011) fare oositi ile yaptıkları çalışmada Arp 2/3 kompleksinin ip ipliği göçü, asimetric bölünme ve sitokinez üzerine etki ederek oosit polarizasyonunu kontrol ettiğini bildirmiştir. Arp 2/3 kompleksinin baskılanması asimetric bölünmeyi, iğ ipliği göçünü ve dolayısıyla sitokinez sürecini bozmaktadır. Sun ve ark. (2012) asimetric bölünme için önemli olan aktin kep oluşumu ile tanımlanan oosit polaritesinin yaşlı fare oositlerindeki kaybının moleküler mekanizmasını araştırmıştır. Sonuç olarak in vitro ortamda yaşlandırılan fare oositlerinde kortikal aktin kepte meydana gelen azalmanın aktin nukleasyonundan sorumlu olan Arp2/3 kompleksinin mRNA ve protein düzeyindeki azalmaya bağlı olduğunu buna bağlı olarak ip ipliğinin korteks ile olan bağlantısının da etkileneceğini bildirmiştir.

Postmature insan oositleri üzerinde yapılan çalışmada oositler 8 – 12 saat IVF ortamında bekletilerek yaşlanma elde edildiğinde yaşlandırılan tüm oositlerin ooplazmasında çok sayıda küçük kortikal mikrotübül odağı olduğu ve ooplazmik mikrotübüllerin aşırı derecede arttığı, kontrol grubunu oluşturan genç oositlerde ise iğ ipliği kutupları dışında kortikal mikrotübül odağına rastlanmadığı ve mikrotübüllerin

minimal düzeyde olduğu bildirilmiştir. Aynı durum insan koryonik gonadotropin (hCG) enjeksiyonundan 19 saat sonra toplanarak in vivo yaşlanma oluşturulan fare oositlerinde de izlenmiştir (Goud ve ark. 2004). George ve ark. (1996) yaptıkları çalışmada taze ve yaşlı insan ve fare oositlerinde alpha ve gama tübülün dağılımını incelemişlerdir. Yaşlanma ile mikrotübül proliferasyonunun gerçekleştiği ve gama-tübülün dağılımının bozulduğu belirtilmiştir (George ve ark. 1996). İn vitro kültür ortamında yaşlandırılan oositler de genç oositlerle kıyaslandığında tübülün işaretlenmesinin tüm sitoplazmaya yayıldığı ve sitoplazmik tübülün kalın filamanlar oluşturduğu belirtilmiştir (Suzuki ve ark. 2002). Çalışmamızda 3 pronukleuslu oositlerde anti - gama tübülün antikoru kullanılarak mikrotübül organize edici merkezler işaretlenmiştir. İki adet pronukleus içeren yani normal bir asimetric bölünme süreci geçirerek ikinci kutup cismini dışarı atabilen oositlerde gama tübülün işaretlenmesi yalnızca merkezde bir araya gelmiş olan pronukleusların çevresinde bir veya iki adet işaretlenme halinde izlenir (Van Blerkom ve ark. 1995). Çalışmamızda incelediğimiz oositlerde kortikal alanda aşırı miktarda gama – tübülün sinyali rastlandı. Bu bulgu daha önce bahsedilen yaşlı oositlerde görülen kortikal alanda aşırı artmış tübülün odakları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan oositler yardımcı üreme teknikleri ile çocuk sahibi olmaya çalışan hastalardan elde edilmiştir. Bu oositler kültür ortamında uzun süre tutulmuş veya preovulator ve postovulator yaşlanma sürecine girmiş olabilir. Sonuç olarak oositler in vivo veya in vitro ortamda yaşlanma sürecine girmiş olabilirler ve gama – tübülün yani mikrotübül organize edici odaklarında izlediğimiz aşırı miktardaki artış oosit yaşlanmasına bağlı olabilir.

Yapılan çalışmalar mikrotübül dinamiğinin de aktin akımına etkisi olduğunu göstermektedir. Mikrotübül polimerizasyonundaki artış kortikal F-aktin agregasyonunu azaltmaktadır. Tübülün dinamiklerinin baskılanmasından çok tübülün polimer seviyesindeki değişimin kortikal akımın değişiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir. (Canman ve Bement 1997). Xenopus oositinde nokodazol kullanılarak mikrotübül depolimerizasyonu meydana getirildiğinde aktin akımı hızının iki katına çıktığı, mikrotübül stabilizasyonuna sebep olan veya polimerizasyonunu sağlayan taxol'ün kullanımının ise kortikal aktin akımını baskıladığı bildirilmiştir (Canman ve Bement 1997, Benink ve ark. 2000).

Çalışmamızda incelenen oositlerin kalitesinin düşük olduğu ve yaşlanma sürecine girmiş olabilecekleri elektron mikroskobu ile yapılan ince yapısal araştırma sonucunda ooplazma içerisinde izlenen lipofuskin granülleri, multilamellar cisimlerin yoğunluğu ve dejenere mitokondrinin varlığı, sitoplazmik halenin ise kısmen veya tamamen yokluğu bulguları ile desteklenmiştir.

Son yıllarda yardımcı üreme uygulamalarından en iyi sonucun alınabilmesi amacıyla canlılık ve gelişim yeterliliği açısından en iyi embriyoların seçilebilmesi için pronuklear evre morfolojisi incelenmektedir. İncelenen zigotlar pronuklear düzen, boyut, sayı, eşitlik, nukleolusların düzeni, sitoplazmik heterojenite ve sitoplazmik halenin varlığı veya yokluğuna göre skorlanırlar (Depa-Martynow ve ark. 2007). Fertilizasyon sonucu oluşan 2 pronukleuslu insan oositinin pronuklear evredeki ince yapısal özellikleri Zamboni ve ark. (1966) tarafından açıklanmıştır. Pronuklear evre oositlerinin sitoplazması kortikal bölge dışında bol miktarda organel içerir. Organelden yoksun olan kortikal bölgeyi Payne ve ark. (1997) subplazmalemmal saydam sitoplazma bölgesi olarak tanımlamışlardır. Kortikal sitoplazmadaki bu odaksal alan genellikle genişler ve tüm sitokorteksi kaplar. Bu bölgeye sitoplazmik hale ismi verilir. Sitoplazmik hale fertilizasyon sonrası meydana gelen oosit aktivasyonu ile mitokondri ve diğer sitoplazmik organellerin mikrotübüller aracılığıyla konum değiştirmesi sonucu meydana gelir (Depa-Martynow ve ark. 2007). Mitokondri ve diğer organellerin hücre iskeleti elemanlarından mikrotübüller aracılığı ile perinuklear alana taşınması ve böylece sitoplazmik halenin varlığı oluşan embriyonun kalitesi ile ilgilidir. Yapılan çalışmalarda ICSI'nin hale oluşumu üzerine olumsuz bir etkisi görülmemiştir. Sitoplazmik haleler konsantrik olabildiği gibi kutuplaşmışta olabilir ama hale tipinin embriyo gelişimi üzerine herhangi bir etkisi bulunmamaktadır, halenin varlığı veya yokluğu gelişim üzerine etkilidir (Ebner ve ark. 2003). Halenin yokluğu gelişimin yavaş ve zayıf olmasına ve fragmentasyonun artmasına sebep olmaktadır. Depa Martynow ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada hale içermeyen zigotlardan elde edilen embriyolarda blastomer sayısının az olduğunu ve fragmentasyonun arttığını bildirmiştir. Bu çalışmayla uyumlu olarak hale içermeyen zigotlardan elde edilen blastokist kalitesinin, blastokist oranının ve gebelik oranının hale içeren zigotlarla kıyaslandığında düşük olduğu bildirilmiştir (Ebner ve ark. 2003, Zollner ve ark. 2002, Stalf ve ark. 2002). Yaptığımız çalışmada transmisyon elektron mikroskobu ile 3 pronukleuslu oositlerin ince yapısını incelediğimizde sitoplazmik haleye kısmen rastlandı veya rastlanmadı.

Elde edilen bu bulgular literatür sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde incelenen oositlerin düşük kaliteye sahip olduklarının göstergesidir. Sitoplazmik halenin oluşumu bu bölgede bulunan organellerin mikrotübüller aracılığı ile subkortikal alana taşınması ile gerçekleşmektedir. Bu oositlerde halenin kısmen görülmesi veya hiç görülmemesi hücre iskeletinde veya organelin sitoplazmik taşıma sürecinde meydana gelmiş olan bir bozukluğun göstergesi olabilir.

Annulat lameller (AL), omurgasız ve omurgalı hayvanların üreme hücreleri ve neoplastik hücreler gibi hızlı çoğalan hücrelerde tanımlanmış bir organeldir (Gültekin ve Canbilen 2011). İnce yapısal olarak nuklear zara benzeyen çift membranlı birkaç diziden oluşur. AL esas olarak nuklear membran yenilenme dönüşümü hızının yüksek olduğu, döllenmiş pronuklear evredeki yumurtada ve blastomerlerde nukleusun yakınlarında bulunur. AL, nadiren GV ve gelişen pronukleus içerisinde kromatin ile ilişkili olarak bulunur (Sathananthan ve ark. 2006). AL membranları üzerinde nuklear por kompleksleri yer alır ve mitotik hücrelerde nukleusun, embriyoda pronukleusun oluşumu sırasında nuklear membranın por ihtiyacını karşılar (Gültekin ve Canbilen 2011). Sutovsky ve ark. (1998) yaptığı çalışmada oosit aktivasyonu sonucu meydana gelen pronukleusların çevresinde AL birikiminin meydana geldiğini bildirmiştir. Bu alandan nuklear por komplekslerinin oluşan nuklear membrana aktarıldığı gösterilmiştir. Hücre içi Ca^{+2} dengesi ve mikrotübül düzeni bozulduğunda AL normal morfolojide meydana gelse bile peripronuklear alanda konumlanmadığı ve pronukleus gelişiminin bozulduğu bildirilmiştir. 2 pronukleuslu duraksamış zigotlarda AL yapısı incelendiğinde pronukleus çevresinde, kontrol zigotlara göre daha fazla AL birikimi ve pronukleus içerisinde internalize olmuş AL membranları olduğu belirtilmiştir. Duraksamış zigotların nuklear membranlarında nuklear por komplekslerinin olmadığı gösterilmiştir (Rawe ve ark. 2003). Çalışmamızda pronukleuslar çevresinde, üzerinde çok sayıda nuklear por bulunan AL membranlarına raslandı. Ayrıca pronukleusların içinde kromatin materyali ile ilişkili olan AL birikimleri de izlendi. Yaptığımız çalışmada normal fertilizasyon süreci ile oluşan biri anneye diğeri babaya ait olan 2 PN içeren oositler etik olarak kullanılmadığı için bir kontrol grubu oluşturamadık. Bu nedenle incelediğimiz 3 pronukleuslu oositlerde izlediğimiz annulat lamel oluşumlarının nitel ve nicel özellikler açısından normal veya anormal olup olmadıkları hakkında sonuç bildirememekteyiz. Literatürde annulat lamellerin bölünme sürecinde olan ve nuklear membran oluşturan hücrelerin sitoplazmasında görüldüğü

belirtilmektedir (Sutovsky ve ark. 1998). Bizim çalışmamızda da oositler pronuklear evrede ve pronukleuslar oluşmuş ve/veya halen oluşum sürecini sürdürmektedir. Annulat lamelin nukleoplazma içerisinde nuklear membran ve kromatin ile ilişkili görülmesi nuklear membran yapım sürecinin bir parçası olabilir. Bu şekildeki lokalizasyon bazı çalışmalarda duraksamış zigotlarda görülmesine rağmen, literatürde normal bir bulgu olarak değerlendirilmektedir (Rawe ve ark. 2003).

Nuklear membran proliferasyon sürecinde olan hücrelerde invajinasyonlar sergiler. Kondanse kromatinin üzerine sarılıp onu çevreledikten sonra yeni oluşmuş olan nuklear membran küresel bir yapı halinde genişler. Bu genişleme sırasında nuklear membran aşırı invajinasyonlar ve içe katlanmalar oluşturur. Bu bölgelerin lamin – B reseptörü açısından zengin olduğu bildirilmiştir (Ellenberg ve ark. 1997). Çalışmamızda incelenen oositler pronuklear evrede olan bölünme sürecine girmeye hazırlanan hücrelerdir ve nuklear membranlarında invajinasyon görülmesi normaldir.

İnsan pronuklear zigotlarının gelişimi sırasında birçok morfolojik transformasyon meydana gelir. Bunlardan nukleolar prekürsör cisimciklerin (NPC) bir araya toplanması, büyümesi ve füzyonu gibi olayları içeren nukleogenezin erken evreleri insan zigotunun değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bu süreç, pronuklear transkripsiyonel aktiviteye ve oosit olgunlaşması sırasında oluşan ooplazmik faktörlerin varlığına bağlıdır. Tüm bu özellikler, nukleolar prekürsör cisimciklerin gelişimini pronuklear zigot kalitesinin morfolojik işareti haline getirir (Tesarik ve Greco 1999).

Pronukleus içinde görülen nukleolinin küçük ve dağınık olması kromatin kondansasyonunun oluşmadığının göstergesi olabilir. Bu durum nuklear veya sitoplazmik olgunlaşmanın yavaş olması nedeniyle gelişimin geciktiğini işaret eder (Gianaroli ve ark. 2007, Scott ve ark. 2000, Wittemer ve ark. 2000). Eşit olmayan sayıda nukleolus içeren zigotlarda zayıf klinik sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum pronukleuslar arasındaki gelişimsel asenkronizasyonun göstergesi, kromozomal anormalliklerin ve bozulmuş mayotik sürecin belirtici olabilir (Scott ve ark. 2000). Döllenen oositte ortaya çıkan en erken transkripsiyonel aktivite, nukleolar öncül (prekürsör) cisimcikler içindeki pre-rRNA sentezidir. Pronukleus içerisindeki nukleolus, NPC'ler tarafından oluşturulur (Terasik ve Kopecny 1990). NPC'lerin sayı ve pozisyonları, pronuklear evredeki oosit kalitesini belirlemek için kullanılan bir ölçüttür. Buna göre oositler 0-5 olacak şekilde 6 kategoriye ayrılır.

Normal morfoloji 0 olarak kabul edilir ve dört karakteristik özellik sergiler.

- 1- Tüm pronukleuslardaki NPC'lerin sayısı 3'ten fazla farklılık göstermemeli,
- 2- NPC sayısı 7'den az olduğunda her zaman kutuplaşma göstermeli, 7'den fazla olduğunda ise kutuplaşma göstermemeli,
- 3- Pronukleus içindeki NPC sayısı asla 3'ten az olmamalı,
- 4- Tüm pronukleuslarda kutuplaşmış veya kutuplaşmamış olsa da NPC bulunmalı.

Yukarıda sıralanan bu 4 morfolojik düzene uymayan zigotlar anormal kabul edilir ve 5 kategoriye ayrılır.

- 1- Tüm pronukleuslarda NPC sayısı aşırı fazlalık (>3) gösterir.
- 2- En az bir pronukleustaki NPC'ler az sayıda (<7) olmalarına rağmen kutuplaşma sergilemez.
- 3- En az bir pronukleusta 7 den fazla sayıda ve kutuplaşmış NPC bulunur.
- 4- En az bir pronukleusta 3'ten az sayıda NPC bulunur.
- 5- Bir pronukleusta kutuplaşma varken diğerinde kutuplaşma yoktur (Wittmer ve ark. 2000, Tesarik ve Greco 1999).

Çalışmamızda 3 pronukleuslu oositlerden alınan seri kesitlerde pronukleuslar içerisindeki NPC'ler incelendiğinde oluşumlarının ilk aşamasının belirteci olan fibriller ve ileri gelişim aşamasının göstergesi olan granüler formda (Maddox-Hyttel ve ark. 2007, Laurincik ve ark. 2000; 2003) olmak üzere iki farklı formda görüldüler. NPC sayısı her PN için 3'ten fazlaydı. Kutuplaşma gösteren ve göstermeyen NPC'ler bir arada bulunuyordu. Yapılan çalışmalarda kutuplaşmış NPC içeren zigotlarda implantasyon oranının dağınık NPC düzenine sahip olan zigotlara göre yüksek olduğu gösterilmiştir (Salumets ve ark. 2001). Çalışmamızda izlenen NPC'lerde görülen kısmi kutuplaşma düzeni zaten fertilizasyon bozukluğuna sahip olan ve 3 PN içeren oositlerdeki gelişimsel anormalliğin bir başka işareti olabilir.

Elektron mikroskobu çalışmalarımızda 3PN oositlerin sitoplazmaları içinde dağılmış bir şekilde artık cisimlere raslandı. Artık cisimler insan oosit sitoplazması içinde görülebilecek ana morfolojik anormalliklerden birisidir. Bu artık cisimler lipid damlaları, küçük otofajik vakuoller ve lipofuskin cisimleri içerebilir. Bunlar otofloresansa sahip olabilirler. Yaptığımız immünfloresan çalışmalarda kırmızı renk floresans veren partiküller otofloresansa sahip olan artık cisimler olabilir. Artık cisim içeren oositlerin IVF uygulamaları ile zayıf döllenme oranı sergiledikleri ancak ICSI uygulaması sırasında döllenme üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Serhal ve ark. 1997, De Sutter ve ark. 1996). Artık cisimlerin yapısında bulunan lipofuskin otofloresansa sahiptir ve nöron ve kardiyak miyosit gibi post mitotik hücrelerde zamanla biriken, yaşlanma ile ilgili bir maddedir. Yapılan çalışmalar hücredeki lipofuskin birikiminin oksijen konsantrasyonundaki artış ile ve lizozomal proteaz ve lipaz inhibitörleri ile arttığını göstermektedir. Yani oksidatif stres ve otofagositik materyalin tamamlanamayan dejenerasyonu, perokside lipidlerin ve proteinlerin sekonder lizozomlarda birikmesine sebep olarak lipofuskinogeneze sebep olabilir. Yardımcı üreme teknikleri ile tedavi gören kadınların yaşı, oosit sitoplazmasında lipofuskin birikimi ile ilgili değildir. Bu durumda oositteki yaşlanmanın lipofuskinogeneze sebep olabileceği belirtilmiştir. İnsan oositinde lipofuskin birikimine sebep olacak üç ana faktör vardır. Bunlar; oksidatif stres, anormal lipid metabolizması ve proteolitik dejenerasyondur (Otsuki ve ark. 2007). Çalışmamızda incelediğimiz oositler anormal döllenme süreci sonucu 3 pronukleus içeren oositlerdir ve sitoplazmalarında ince yapısal olarak gözlemlediğimiz ve immünfloresan çalışmalarında otofloresans özellikleri ile belirlediğimiz lipofuskin granülleri bu oositlerin sitoplazmik özellikler açısından düşük kalite sergilediğinin göstermektedir. Bu durum maternal yaş ile alakalı olmayan oosit yaşlanması ve kültür ortamından kaynaklanabilecek oksidatif stres ile alakalı olabilir.

MII evresindeki bir oositin kortikal bölgesinde hemen plazma membranının altında 1-2 sıra kortikal granül yer alır. Kortikal alanda mitokondriyumların yanı sıra DER bulunur. MII evresindeki olgun bir oositte DER, DER tübül kümeleri, büyük DER vesikülleri, küçük DER vesikülleri ve izole DER tübülleri olacak şekilde 4 farklı biçimde düzenlenmiştir. DER tübül kümeleri ve büyük DER vesikülleri her zaman mitokondriler ile ilişkilidir. Küçük DER vesikülleri izole formda veya mitokondri ile ilişkili olabilir. Oosit aktivasyonu sırasında kortikal alanda birçok değişme olur ve bu

değişimler oosit aktivasyonunun düzgün bir şekilde gerçekleştiğinin göstergesidir. Oosit aktivasyonunda kortikal alanda meydana gelen en önemli değişiklik kortikal granüllerin ekzositoz ile atılması, büyük DER vesiküllerinin ve DER tübül kümelerinin tamamen yok olmasıdır. Aktive olmuş bir oositte kortikal alanda sadece küçük DER vesikülleri ve izole olmuş DER tübülleri bulunur (El Shafie ve ark. 2000 pp. 83-93). Çalışmamızda bazı oositlerin kortikal bölgesinde plazma membranının hemen altında konumlanmış az sayıda kortikal granüller izlenmiştir. Kortikal granüllerin çok fazla sayıda olmamak şartı ile döllenmiş oositlerde görülmesi normal bir olay olarak kabul edilebilir. Bunun dışında incelediğimiz oositlerde büyük ve mitokondri ile ilişkili olan DER vesikülleri ve çok seyrekte olsa DER tübül kümeleri görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgular bu oositlerin kısmi aktivasyon geçirdiklerinin göstergesi olabilir.

Anne yaşının ilerlemesi sonucu meydana gelen ovaryum yaşlanmasında da in vitro yaşlanma sürecinde izlenen morfolojik değişimlere rastlanır. Bruin ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmada 38 - 45 yaşları arasındaki orta yaşlı sağlıklı kadınlardan elde ettikleri yumurtalık biyopsileri ve genç bireylerden alınan kontrol biyopsiler taramalı elektron mikroskobu ile karşılaştırılarak incelemiştir. Yaşlı bireylere ait oositlerde mitokondri yıkımında artış ile mitokondri sitoplazmik fraksiyonunda azalma olduğu, ayrıca matriks yoğunluğunda önemli derecede artış olduğu bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca yaşlanma sonucu sitoplazmada vakuolizasyonun arttığı belirtilmiştir. 3PN içeren oositlerde ince yapısal düzeyde yaptığımız çalışmada sitoplazma içindeki mitokondride yoğun matrikse sahip olanların yanısıra matriksinde vakuol oluşumu başlayan ve tamamen vakuolize olmuş çok miktarda dejenere mitokondri görüldü. Ayrıca DER sisternalarında genişleme ve membranlarda yırtılma izlendi. Yaptığımız çalışmada mitokondri ve DER morfolojisine ilişkin elde ettiğimiz bulgular yaşlı bireylerdeki oositler ile yapılan bu çalışmadaki bulgular ile uyumluluk göstermektedir. Bruin ve ark. (2004) yaptığı çalışmada genç (25 - 32 yaş) ve yaşlı kadınlardan (38 - 45 yaş) ovaryum biyopsileri olarak fizyolojik yaşın oosit morfolojisi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmamızda kullandığımız oositler ortalama 32 yaşında olan hastalardan elde edilmiştir. Bu çalışma ile karşılaştırdığımızda elde ettiğimiz oositler fizyolojik olarak yaşlı hastalardan elde edilmemiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda in vitro ortamın genç oositlerde yaşlanma sürecini tetiklediğinin gösterildiği (Takahashi ve ark. 2009, Liu ve ark. 2009) dikkate alındığında, incelediğimiz oositlerde görülen ve Bruin ve arkadaşlarının (2004) çalışmasındaki yaşlı

oositlere özgü morfolojik bozulmaların, in vitro oosit kültür ortamındaki uygunsuz koşullara bağlı olarak gelişen in vitro oosit yaşlanması sonucunda ortaya çıktığı düşünülebilir.

Mitokondri, insan dahil olmak üzere memeli oositinde baskın olarak bulunan organeldir. Zamboni ve ark. (1966) pronuklear insan oositinin ince yapısını açıkladığı çalışmada oosit sitoplazmasında en fazla miktarda bulunan organel olan mitokondrinin özellikle pronukleusların etrafında düzenlendiği bildirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda mitokondri membran potansiyeli yüksek olan mitokondriyumların döllenmiş bir oositin subplazmalemmal bölgesinde lokalize olduğu, merkezde bir araya gelmiş pronukleusların çevresinde konumlanmış olan mitokondrinin ise düşük membrane potansiyeli sergilediği bildirilmiştir (Van Blerkom 2006). Subplazmalemmal yerleşimli yüksek polarize ve perinuklear yerleşimli düşük polarize mitokondri insan ve fare oositinde ve erken preimplantasyon evresindeki embriyolar için karakteristik bir özelliktir. Birbirlerinden farklı membran potansiyeline sahip olan bu mitokondri gruplarının ooplazma içerisindeki dağılım örüntüsü, farklı aktiviteleri ve düzenleyici rolleri işaret ediyor olabilir (Van Blerkom 2006). Örneğin MII evresindeki insan oositlerinde subplazmalemmal alanda yerleşmiş olan yüksek polarize mitokondrinin düz yüzlü endoplazma retikulumu kümeleri ile bir arada bulunması lokal serbest Ca^{2+} seviyesinin dinamik olarak düzenlenmesini sağlar (Van Blerkom ve ark. 2002; 2003). Van Blerkom ve ark. (2003) fare oositi üzerinde yaptıkları çalışmada MII oositlerde perikortikal sitoplazmadaki yüksek membran potansiyelinde meydana gelecek kısa süreli bir kaybın hücre içi serbest Ca^{+2} seviyesini düşürdüğünü bildirmiştir. Yine fare oositleri üzerinde yapılan bir çalışmada subplazmalemmal alandaki yüksek polarize mitokondrinin, spermin ooplazmaya penetrasyonu ve kortikal granül ekzositozunun gerçekleşmesinde rol oynadığı bildirilmiş spermin oolemmaya tutunmasında fonksiyonu olmadığı gösterilmiştir. Yüksek membran potansiyeline sahip mitokondrinin oositin subplazmalemmal bölgesinde düzenlenmeleri oosit olgunlaşma sürecinin ilk aşamalarından birisidir ve bu bölgede meydana gelecek bir bozulma fertilizasyon anormalliklerine sebep olabilir (Van Blerkom ve Davis 2007). Pronuklear embriyolarda yüksek polarize mitokondrinin çoğunluğunun veya tümünün elimine olması bölünmenin durmasına neden olmaktadır (Van Blerkom 2006). Çalışmamızda 3 pronukleuslu oositler JC-1 boyası ile muamele edildiğinde literatür ile uyumlu olarak yüksek membran potansiyeline sahip mitokondrilerin subplazmalemmal alanda yerleşmiş

olduğu görüldü. Pronukleusların çevresinde ise yine literatür ile uyumlu olarak düşük membran potansiyeline sahip mitokondri mevcuttu. Elde edilen bu bulgu subplazmalemmal alanda yerleşmiş olan ve bu bölgede fertilizasyon sürecindeki birçok olayın düzenlenmesinde aktivite gösteren yüksek polarize mitokondri topluluğunun ikinci kutup cisminin atılmasında doğrudan etkin bir rol oynamadığı düşüncesini akla getirmektedir.

Oksidatif stres in vitro ortamda yaşlanma sürecini tetikleyen önemli etmenlerden birisidir. Yapılan çalışmalarda reaktif oksijen türevlerinin genç oositlerde mikrotübül dinamiklerini arttırdığı ve kortikal granül kaybına sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yaşlı oositlerin antioksidan kapasitelerindeki azalma nedeni ile ROT'un yaşlanma sürecini tetikleyen etkilerine karşı daha duyarlı oldukları belirtilmiştir (Goud ve ark. 2008). Çalışmamızda incelediğimiz oositlerdeki ROT yoğunluğu üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Oksidatif stresin mitokondri matriks yoğunluğunda azalmaya sebep olduğu (Cole ve ark. 2010) ve mitokondri membran potansiyelini düşürdüğü (Vayssler Taussat ve ark. 2002) daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Çalışmamızda incelenen 3 pronukleuslu oositlerdeki mitokondri membran potansiyeli seviyesi, literatürde belirtilen 2 pronukleuslu normal oositlerdeki mitokondri membran potansiyeli seviyesi ile kıyaslandığında aralarında herhangi bir fark görülmedi. Ayrıca ince yapı çalışmasında mitokondri matriks yoğunluğu halen yüksek olan mitokondrinin mevcut olduğu saptandı. Pronuklear evrede görülen yoğun matrikse sahip olan mitokondriyumlar bu hücrelerin oksidatif stresin zararlı etkilerinden korunabilmeleri için oksidatif fosforilasyonun minimal seviyede tutulduğunun göstergesidir. Gelişimin bu evresindeki embriyo düşük seviyeli oksijen tüketimi sergiler. Glikoz tüketimi sınırlıdır ve esas enerji kaynağı pirüvattır (İrez ve ark. 2010 pp. 212-213). Bu bulgular incelediğimiz 3 pronukleuslu oositlerde yaşlanmayı oksidatif stresin tetiklemediği fikrini doğrurabilir. Yaşlanma süreci sadece in vitro koşullara veya annenin fizyolojik yaşına bağlı değildir. Ovulasyon öncesi ve sonrası hormonal koşullar ve folikül gelişim sürecinin ve optimal fertilizasyon süresinin de oosit morfolojisi ve kalitesi üzerine etkisi vardır ve bu koşullardaki anormalliklerde yaşlanma sürecini tetikleyebilir.

Elde ettiğimiz elektron mikroskopik bulgular incelediğimiz 3 pronukleuslu oositlerin yaşlanma sürecine girmiş olduklarını göstermektedir. Üç pronukleuslu bu oositler ortalama 32 yaşında olan hastalardan temin edilmiştir bu nedenle oositlerde

izlenen yaşlanma sürecinin ileri anne yaşına bağlı olmadığı kesindir. Ovulasyonun veya fertilizasyonun gecikmesi sonucu oluşan preovulatör ve postovulatör yaşlanma her yaştaki fertil bireyde meydana gelebilir (Bittner ve ark. 2011). İn vivo veya in vitro ortamda fertilizasyonun gecikmesi postovulatör yaşlanmayı tetikler. IVF laboratuvarlarında ICSI uygulamaları sırasında elde edilen çok sayıda oosit ICSI manipulasyonun yapılacağı ana kadar in vitro ortamda bekletilebilmektedir. Oositler taze elde edilmiş olmalarına rağmen ICSI uygulaması için bekleme sırasında optimal fertilizasyon süresinin aşılması oositlerde ince yapısal anormalliklerin meydana gelmesine neden olmuş ve yaşlanmayı tetiklemiş olabilir.

Preovulatör yaşlanma ovulasyonun olması gereken zamandan sonra gerçekleşmesi ile tetiklenir. Yardımla üreme tedavisinde bazal gonadotropin değerleri normal olanlar da dahil olmak üzere tüm IVF sikluslarında Gonadotropin releasing hormon agonistleri kullanılmaktadır. Bu ajanlar LH salgılanmasını baskılayarak ovulasyonun laboratuvar koşullarına uygun bir zamanda gerçekleşmesini mümkün kılar (Serdaroğlu 2008 pp. 47-48). Bu şekilde baskılanan ovulasyon ile foliküler evrenin uzaması folikül içi oositlerde preovulatör yaşlanma sürecini tetikleyebilir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda intrafoliküler oosit yaşlanmasının kromozomal anormalliklere, RNA ve protein sentezinde değişikliklere neden olduğu ve bu oositlerden gelişen embriyolarda gelişim defektleri ve ölümlerin arttığı bildirilmiştir (Butcher ve Fugo 1967, Peluso ve Butcher 1974). İnsanda da süresi uzayan foliküler fazın doğmalık malformasyon riskini artırdığı rapor edilmiştir (Spira ve ark. 1985). Dişi fareler üzerinde ovulasyonun GnRH agonisti olan Cetorelix ile baskılanması ile embriyo gelişiminin olumsuz etkilendiği gösterilmiştir (Bittner ve ark. 2011). Çalışmamızda elde ettiğimiz yaşlanmaya sürecine ait bulgular yardımla üreme tekniklerinde uygulanan stimülasyon protokollerine bağlı olarak ta meydana gelmiş olabilir.

Çalışmamızda uyguladığımız immünfloresan ve elektron mikroskopik incelemeler, üç pronukleuslu oositlerde yaşlı oositlerde rastlanan morfolojik değişikliklerin bulunduğunu göstermiştir. Yardımcı üreme tekniklerinin uygulanması sırasında oositin in vitro yaşlanma sürecine girip morfolojik ve dinamik değişiklikler sergilediği çeşitli çalışmalarla belirtilmiştir (Petrova ve ark. 2004, Hao ve ark. 2009). Çalışmamızda ince yapısal düzeyde elde ettiğimiz bulgular ile araştırdığımız 3

pronukleuslu oositlerin kalitesinde zayıflık olduğunu ve yaşlı oosit kategorisinde değerlendirilebileceğini gördük. İn vitro koşullar da dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle oositlerde tetiklenebilen yaşlanma süreci, hücre içi iskelet elemanlarından mikrotübül ve mikrofilaman düzeninde bozulmalara sebep olmuş olabilir. Aşırı mikrotübül ağı olgun oositlerde görülen ve mitotik iğ ipliğinin ekzantrik konumunu korumasını sağlayan kortikal aktin akımını baskılamaktadır (Benink ve ark. 2000). Ayrıca oositte yaşlanmanın aktin nukleasyonundan ve aktin akımından sorumlu olan Arp2/3 kompleksinin seviyesinde azalmaya sebep olduğu bilinmektedir (Sun ve ark. 2012). Elde ettiğimiz bulgular ve literatür ışığında incelediğimiz oositlerdeki aktin filaman düzenindeki bozulma doğrudan yaşlanma sürecinin Arp2/3 kompleksi üzerindeki baskılayıcı etkisi ile veya kortikal alanda bulunan aşırı gama – tübülün odaklarının aşırı mikrotübül ağı oluşumuna sebep olması sonucu dolaylı olarak kortikal aktin filaman düzenini ve aktin akımını olumsuz yönde etkilemiş olabilir. Sonuç olarak ekzantrik konumlu mitotik iğ ipliği yerinden ayrılarak oositin merkezine gelmiş ve 2. PB dışarıya atılamadığı için oositin içinde kalarak 3. pronukleusu oluşturmuş olabilir.

Çalışmamız 3 pronukleus oluşumunda hücre iskeleti dinamiğini ilgilendiren bir aksaklığın rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu süreci araştırmaya dönük daha kapsamlı çalışmaların konusunu aktin polimerizasyonundan sorumlu moleküllerin (Arp 2/3, Formin-2, Cdc-42) proteomiği ve sentezi oluşturacaktır. Kapsamlı genetik ve moleküler biyolojik çalışmaların embriyo prognozunu göstermeye yönelik yeni araştırma alanları açması ve embriyo kalite parametrelerini geliştirmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abbott, A.L., Fissore, R.A., Ducibella, T. (1999). Incompetence of preovulatory mouse oocytes to undergo cortical granule exocytosis following induced calcium oscillations. *Developmental Biology*, **207**, 38-48.
- Abbott, A.L., Fissore, R.A., Ducibella, T. (2001). Identification of a translocation deficiency in cortical granule secretion in preovulatory mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, **65**, 1640-1647.
- Acton, B.M., Jurisicova, A., Jurisica, I., Casper, R.F. (2004). Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Molecular Human Reproduction*, **10**(1), 23-32.
- Ai, J., Li, M., Schatten, H., Sun, Q. (2009). Regulatory mechanism of spindle movements during oocyte meiotic division. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **22**(11), 1477-1486.
- Benink, H.A., Mandato, C.A., Bement, W.M. (2000). Analysis of cortical flow models in vivo. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 2553-2563.
- Bittner, A.K., Horsthemke, B., Winterhager, E., Grümmer, R. (2011). Hormone-induced delayed ovulation affects early embryonic development. *Fertility and Sterility*, **95**, 2390-2394.
- Branzini, C., Lavalpe, M., Nodar, F., Rawe, V.Y. (2007). Visualization of cytoskeleton components during fertilization in mammals. *Fertility and Sterility*, **88**, 1435-1436.
- Bruin, J.P., Dorland, M., Spek, E.R., Posthuma, G., Haaften, M., Looman, C.W.N. ve ark. (2004). Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biology of Reproduction*, **70**, 419-424.
- Brunet, S., Maro, B. (2005). Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction*, **130**, 801-811.
- Brunet, S., Verlhac, M.H. (2011). Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Human Reproduction*, **17**, 68-75.
- Butcher, R.L., Fugo, N.W. (1967). Overripeness and the mammalian ova. II. Delayed ovulation and chromosome anomalies. *Fertility and Sterility*, **18**, 297-302.
- Canman, J.C. ve Bement, W.M. (1997). Microtubules suppress actomyosin-based cortical flow in *Xenopus* oocytes. *Journal of Cell Science*, **110**, 1907-1917.
- Cole, N.B., Daniels, M.P., Levine, R.L., Kim, G. (2010) Oxidative stress causes reversible changes in mitochondrial permeability and structure. *Experimental Gerontology*, **45**(7-8), 596-602.

Combelles, C.M.H., Albertini, D.F. (2001). Microtubule patterning during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle-specific sorting and redistribution of γ -tubulin. *Developmental Biology*, **239**, 281-294.

Dalo, D.T., Mccaffery, M., Evans, J.P. (2008). Ultrastructural analysis of egg membrane abnormalities in post-ovulatory aged eggs. *International Journal of Developmental Biology*, **52**, 535-544.

De Sutter, P., Dozortsev, D., Qian, C., Dhont, M. (1996). Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, **11**, 595-597.

Depa-Martynow, M., Jedrzejczak, P., Pawelczyk, L. (2007). Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, **45(1)**, 87-91.

De Vos, A. (2000). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Human Reproduction*, **15(4)**, 59-64.

Diaz, H., Esponda, P. (2004). Ageing-induced changes in the cortical granules of mouse eggs. *Zygote*, **12**, 95-103.

Dumollard, R., Duchen, M., Sardet, C. (2006). Calcium signals and mitochondria at fertilization. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **17**, 314-323.

Dumollard, R., Hammar, K., Porterfield, M., Smith, P.J., Cibert, C., Rouviere, C. ve ark. (2003). Mitochondrial respiration and Ca^{2+} waves are linked during fertilization and meiosis completion. *Development*, **130**, 683-692.

Dumollard, R., Marangos, P., Fitzharris, G., Swann, K., Duchen, M., Carroll, J. (2004). Sperm-triggered (Ca) oscillations and Ca homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development*, **131**, 3057-3067.

Dumont, J., Million, K., Sunderland, K., Rassinier, P., Lim, H., Leader, B. ve ark. (2007). Formin-2 is required for spindle migration and for the late steps of cytokinesis in mouse oocytes. *Developmental Biology*, **301**, 254-265.

Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Wiesinger, R., Puchner, M. ve ark. (2003). Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Human Reproduction*, **18(11)**, 2406-2412.

El Shafie, M., Sousa, M., Windt, M.L. ve Kruger, T.F. (2000). *An Atlas Of The Ultrastructure Of Human Oocytes*. New York: The Parthenon Publishing Group.

Ellenberg, J., Siggia, E.D., Moreira, J.E., Smith, C.L., Presley, J.F., Worman, H.J. ve ark. (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *Journal of Cell Biology*, **138(6)**, 1193-1206.

Eppig, J.J., Schultz, R.M., O'Brien, M., Chesnel, F. (1994). Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*, **164**, 1-9.

Feenan, K. ve Herbert, M. (2006). Can 'abnormally' fertilized zygotes give rise to viable embryos? *Human Fertility*, **9:3**, 157-169.

Fishkind, D.J., Silverman, J.D., Wang, Y.L. (1996). Function of spindle microtubules in directing cortical movements and actin filament organization in dividing cultured cells. *Journal of Cell Science*, **109**, 2041-2051.

George, M.A., Pickering, S.J., Braude, P.R., Johnson, M.H. (1996). The distribution of α - and γ -tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryoprotectant. *Molecular Human Reproduction*, **2(6)**, 445-456.

Gerhart, J., Wu, M., Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *The Journal of Cell Biology*, **98**, 1247-1255.

Gianaroli, L., Magli, M.C., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Borghi, E., Ermini, B. (2007). Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Human Reproduction*, **22(1)**, 241-249.

Goud, A.P., Goud, P.T., Diamond, M.P., Gonik, B., Abu-Soud, H.M. (2008). Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Free Radical Biology & Medicine*, **44**, 1295-1304.

Goud, A.P., Goud, P.T., Oostveldt, P.V., Diamond, M.P., Dhont, M., (2004). Dynamic changes in microtubular cytoskeleton of human postmature oocytes revert after ooplasm transfer. *Fertility and Sterility*, **81(2)**, 323-331.

Gültekin, B. ve Canbilen, A. (2011). Annulate Lamella: Yapısı ve fonksiyonları. *Selçuk Üniversitesi Tıp Dergisi*, **27(3)**, 182-187.

Hao, Z., Liu, S., Wu, Y., Wan, P., Cui, M., Chen, H. ve ark. (2009). Abnormal changes in mitochondria, lipid droplets, ATP and glutathione content, and Ca^{2+} release after electro-activation contribute to poor developmental competence of porcine oocyte during in vitro ageing. *Reproduction, Fertility and Development*, **21**, 323-332.

Herbert, M., Gillespie, J.I., Murdoch, A.P. (1997). Development of calcium signalling mechanisms during maturation of human oocytes. *Molecular Human Reproduction*, **3(11)**, 965-973.

İrez, T., (Ed.), Arda, O., (Ed.). ve Kaleli, S. (Ed.). (2010). *Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Kitabı Laboratuvar ve Klinik Görüşler*. İstanbul: Nobel Matbaacılık.

Jin, Y., Cui, X., Yu, X., Han, Y., Kong, I., Kim, N. (2010). Alterations of spindle and microfilament assembly in aged cat oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, **45**, 865-871.

Jones, A., Van Blerkom, J., Davis, P., Toledo, A.A. (2004). Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Human Reproduction*, **19(8)**, 1861-1866.

- Jones, K.T., Carroll, J., Whittingham, D.G. (1995). Ionomycin, thapsigargin, ryanodine and sperm induced Ca^{2+} release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 6671-6677.
- Katayama, M., Zhong, Z., Lai, L., Sutovsky, P., Prather, R.S., Schatten, H. (2006). Mitochondrial distribution and microtubule organization in fertilized and cloned porcine embryos: Implications for developmental potential. *Developmental Biology*, **299(1)**, 206-220.
- Kidd, T., Abu-Shumay R., Katzen, A., Sisson, J.C., Jimenez, G., Pinchin, S., Sullivan, W., Ish-Horowicz, D. (2005). The ϵ -subunit of mitochondrial ATP synthase is required for normal spindle orientation during the *Drosophila* embryonic divisions. *Genetics*, **170**, 697-708.
- Kim, H., Chung H.M., Cha, K., Chung, K.S. (1998). Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Human Reproduction*, **13(8)**, 2217-2222.
- Kim, N., Funahashi, H., Prather, R.S., Schatten, G., Day, B.N. (1996). Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Molecular Reproduction and Development*, **43**, 248-255.
- Kim, N., Moon, S.J., Prather R.S., Day, B.N. (1996). Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, **43**, 513-518.
- Kim, N.H., Cho, S.K., Choi, S.H, Kim, E.Y., Park S.P., Lim, J.H. (2000). The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. *Zygote*, **8**, 25-32.
- Kim, N.H., Chung, K.S., Day, B.N. (1997). The distribution and requirements of microtubules and microfilaments during fertilization and parthenogenesis in pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, **111**, 143-149.
- Krisher, R.L., (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, **82**, 14-23.
- Laurincik, J., Schmoll, F., Mahabir, E., Schneider, H., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V. ve ark. (2003). Nucleolar proteins and ultrastructure in bovine in vivo developed, in vitro produced, and parthenogenetic cleavage-stage embryos. *Molecular Reproduction and Development*, **65**, 73-85.
- Laurincik, J., Thomsen, P.D., Hay-Schmidt, A., Avery, B., Greve, T., Ochs, R.L. ve ark. (2000). Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. *Biology of Reproduction*, **62**, 1024-1032.
- Lee, J., Miyano, T., Moor, R.M. (2000). Spindle formation and dynamics of γ -tubulin and nuclear mitotic apparatus protein distribution during meiosis in pig and mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, **62**, 1184-1192.
- Levi, M., Kaplan-Kraicer, R., Shalgi, R. (2011). Regulation of division in mammalian oocytes: implications for polar body formation. *Molecular Human Reproduction*, **17**, 328-334.
- Liu, N., Wu, Y., Lan, G., Sui, H., Ge, L., Wang, J. ve ark. (2009). Pyruvate prevents aging of mouse oocytes. *Reproduction*, **138**, 223-234.

- Longo, F.J. ve Chen, D.Y. (1985). Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. *Developmental Biology*, **107**, 382-394.
- Loutradis, D., Kiapekou, E., Zapanti, E., Antsaklis, A. (2006). Oocyte maturation in assisted reproductive techniques. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1092**, 235-246.
- Maddox-Hyttel, P., Svarcova, O., Laurincik, J. (2007). Ribosomal RNA and nucleolar proteins from the oocyte are to some degree used for embryonic nucleolar formation in cattle and pig. *Theriogenology*, **68**, 63-70.
- Manandhar, G., Schatten, H., Sutovsky, P. (2005). Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biology of Reproduction*, **72**, 2-13.
- Mann, J.S., Lowther, K.M., Mehlmann, L.M. (2010). Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca^{2+} release mechanisms during meiotic maturation of human oocytes. *Biology of Reproduction*, **83**, 578-583.
- Marteil, G., Richard-Parpaillon, L., Kubiak, J.Z. (2009). Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reproductive Biology*, **9(3)**, 203-224.
- Masui, Y. ve Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *The Journal of Experimental Zoology*, **177**, 129-145.
- Meng, X., Fan, H., Zhong, Z., Zhang, G., Li, Y., Chen, D., Sun, Q. (2004). Localization of γ -tubulin in mouse eggs during meiotic maturation, fertilization, and early embryonic development. *Journal of Reproduction and Development*, **50**, 97-105.
- Miao, Y., Ma, S., Liu, X., Miao, D., Chang, Z., Luo, M. ve ark. (2004). Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, **69**, 66-76.
- Miao, Y., Kikuchi, K., Sun, Q., Schatten, H. (2009). Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*, **15**, 573-585.
- Moon, J.H., Jee, B.C., Ku, S.Y., Suh, C.S., Kim, S.H., Choi, Y.M. ve ark. (2005). Spindle positions and their distributions in in vivo and in vitro matured mouse oocytes. *Human Reproduction*, **20(8)**, 2207-2210.
- Motta, P.M., Nottola, S.A., Makabe, S., Heyn, R. (2000). Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Human Reproduction*, **15(2)**, 129-147.
- Nogues, C., Ponsa, M., Vidal, F., Boada, M., Egozcue, J. (1988). Effects of aging on the zona pellusida surface of mouse oocytes. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, **5**, 225-229.
- Otsuki, J., Nagai, Y., Chiba, K. (2007). Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **24**, 263-270.
- Payne D., Flaherty S.P., Barry, M.F., Matthews, C.D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reproduction*, **12(3)**, 532-541.

- Payne, C., Rawe, V., Ramalho-Santos, J., Simerly, C., Schattan, G. (2003). Preferentially localized dynein and perinuclear dynactin associate with nuclear pore complex proteins to mediate genomic union during mammalian fertilization. *Journal of Cell Science*, **116**, 4727-4738.
- Peluso, J.J., Butcher, R.L. (1974). RNA and protein synthesis in control and follicularly-aged rat oocytes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **147**, 350-353.
- Petrova, I., Sedmikova, M., Chmelikova, E., Svestkova, D., Rajmon, R. (2004). In vitro aging of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Sciences*, **49**, 93-98.
- Plachot, M. (2000). Fertilization. *Human Reproduction*, **15**(4), 19-30.
- Porter, R., Han, T., Tucker, M.J., Graham, J., Liebermann, J., Sills, E.S. (2003). Estimation of second polar body retention rate after conventional insemination and intracytoplasmic sperm injection: In vitro observations from more than 500 human oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **20**(9), 371-376.
- Rawe, V.Y., Olmedo, S.B., Nodar, F.N., Ponzio, R., Sutovsky, P. (2003). Abnormal assembly of annulate lamellae and nuclear pore complexes coincides with fertilization arrest at the pronuclear stage of human zygotic development. *Human Reproduction*, **18**(3), 576-582.
- Reers, M., Smiley, S., Mottola-Hartshorn, C., Chen, A., Lin, M., Chen, L.B. (1995). Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods in Enzymology*, **260**, 406-417.
- Reers, M., Smith, T., Chen, L. (1991). J-aggregate formation of carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, **30**, 4480-4486.
- Rienzi, L., Ubaldi, F., Martinez, F., Iacobelli, M., Minasi, M.G., Ferrero, S. ve ark. (2003). Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Human Reproduction*, **18**(6), 1289-1293.
- Rosenbusch, B.E. (2008). Mechanisms giving rise to triploid zygotes during assisted reproduction. *Fertility and Sterility*, **90**, 49-55.
- Salumets, A., Hyden-Granskog, C., Suikkari, A., Tiitinen, A., Tuuri, T. (2001). The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Human Reproduction*, **16**(10), 2177-2181.
- Sathananthan, A.H. ve Trounson, A.O. (2000). Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Human Reproduction*, **15**(2), 148-159.
- Sathananthan, A.H., Selvaraj, K., Girijashankar, M.L., Ganesh, V., Selvaraj, P., Trounson, A.O. (2006). From oögonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Research and Technique*, **69**, 396-407.
- Schatten, H. ve Sun, Q. (2009). The functional significance of centrosome in mammalian meiosis, fertilization, development, nuclear transfer and stem cell differentiation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **50**, 620-636.

Schatten, H. ve Sun, Q. (2010). The role of centrosomes in fertilization, cell division and establishment of asymmetry during embryo development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **21**, 174-184.

Schwartz, M. ve Vissing, J. (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *The New England Journal of Medicine*, **347**, 576-580.

Schwartz, M. ve Vissing, J. (2003). New patterns of inheritance in mitochondrial disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **310**, 247-251.

Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., Miller, B. (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human Reproduction*, **15(11)**, 2394-2403.

Serdaroğlu, H. (Çev. Ed.). (2008). *In Vitro Fertilization Pratik Yaklaşım*. İstanbul: Hayat Tıp Kitapçılık.

Serhal, P.F., Ranieri, D.M., Kinis, A., Marchant, S., Davies, M., Khadum, I.M. (1997). Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, **12**, 1267-1270.

Shelton, C.A., Carter, J.C., Ellis, G.C., Bowerman, B. (1999). The nonmuscle myosin regulatory light chain gene *mlc-4* is required for cytokinesis, anterior-posterior polarity and body morphology during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Journal of Cell Biology*, **146**, 439-451.

Solakoğlu, S. (Ed) ve Aytekin, Y. (Ed). (2009). *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Matbaacılık.

Spira, A., Spira, N., Papiernik-Berkauer, E., Schwarz, D. (1985). Pattern of menstrual cycles and incidence of congenital malformations. *Early Human Development*, **11**, 317-324.

St. John, J.C. (Ed.). (2007). *The Mitochondrion In The Germline And Early Development*. San Diego, California: Elsevier Academic Press.

Saessen, C. ve Van Steirteghem, A.C. (1997). The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, **12(2)**, 321-327.

Stalf, T., Herrero, J., Mehnert, C., Manolopoulos, K., Lenhard, A., Gips, H. (2002). Influence of polarization effects and pronuclei on embryo quality and implantation in an IVF program. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **19**, 355-362.

Sun, Q.Y., Lai, L., Park, K.W., Kuhholzer, B., Prather, R.S., Schatten, H. (2001). Dynamic events are differentially mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, **64**, 879-889.

Sun, Q. ve Schatten, H. (2006). Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*, **131**, 193-205.

Sun, S., Wang, Z., Xu, Y., Lee, S., Cui, X., Kim, N. (2011). Arp2/3 complex regulates asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. *Public Library of Science One*, **6(4)**, 1-10.

- Sun, S., Gao, W., Xu, Y., Jin, Y., Wang, Q., Yin, X. ve ark. (2012). Degradation of actin nucleators affects cortical polarity of aged mouse oocytes. *Fertility and Sterility*, **97**(4), 984-990.
- Sutovsky, P., Simerly, C., Hewitson, L., Schatten, G. (1998). Assembly of nuclear pore complexes and annulate lamellae promotes normal pronuclear development in fertilized mammalian oocytes. *Journal of Cell Sciences*, **111**, 2841-2854.
- Suzuki, H., Takashima, Y., Toyokawa, K. (2002). Cytoskeletal organization of porcine oocytes aged and activated electrically or by sperm. *Journal of Reproduction and Development*, **48**(3), 293-301.
- Swain, J.E. ve Pool, T.B. (2008). ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Human Reproduction*, **14**(5), 431-446.
- Takahashi, T., Igarashi, H., Kawagoe, J., Amita, M., Hara, S., Kurachi, H. (2009). Poor embryo development in mouse oocytes aged in vitro is associated with impaired calcium homeostasis. *Biology of Reproduction*, **80**, 493-502.
- Tarin, J.J., Trounson, A.O., Sathananthan H. (1999). Origin and ploidy of multipronuclear zygotes. *Reproduction, Fertility and Development*, **11**, 273-279.
- Terada, Y., Fukaya, T., Yajima, A. (1995). Localization of microfilaments during oocyte maturation of golden hamster. *Molecular Reproduction and Development*, **41**, 486-492.
- Terada, Y., Simerly, C., Schatten, G. (2000). Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice. *Molecular Reproduction and Development*, **56**, 89-98.
- Tesarik, J. ve Greco, E. (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reproduction*, **14**(5), 1318-1323.
- Tesarik, J. Ve Kopečný, V. (1990). Assembly of the nuclear precursors bodies in human male pronuclei is correlated with an early RNA synthetic activity. *Experimental Cell Research*, **191**, 153-156.
- Thouas, G.A., Trounson, A.O., Wolvetang, E.J., Jones, G.M. (2004). Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biology of Reproduction*, **71**, 1936-1942.
- Torner, H., Brüssaw, K.P., Alm, H., Ratky, J., Pöhland, R., Tuchscherer, A. ve ark. (2004). Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology*, **61**, 1675-1689.
- Tremoleda, J.L., Van Haeften, T., Stout, T.A.E., Colenbrander, B., Bevers, M.M. (2003). Cytoskeleton and chromatin reorganization in horse oocytes following intracytoplasmic sperm injection: Patterns associated with normal and defective fertilization. *Biology of Reproduction*, **69**, 186-194.

Van Blerkom, J. (1991). Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 5031-5035.

Van Blerkom, J. (2004). Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*, **128**, 269-280.

Van Blerkom, J. (2006). High-polarized ($\Delta\Psi_{m_{high}}$) mitochondria are spatially polarized in human oocytes and early embryos in stable subplasmalemmal domains: developmental significance and the concept of vanguard mitochondria. *Reproductive BioMedicine Online*, **13**(2), 246-254.

Van Blerkom, J. (2009). Mitochondria in early mammalian development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **20**, 354-364.

Van Blerkom, J. ve Davis, P. (2007). Mitochondrial signaling and fertilization. *Molecular Human Reproduction*, **13**(11), 759-770.

Van Blerkom, J., Davis, P., Alexander, S. (2000). Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Human Reproduction*, **15**, 2621-2633.

Van Blerkom, J., Davis, P., Alexander, S. (2003). Inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocytes. *Human Reproduction*, **18**(11), 2429-2440.

Van Blerkom, J., Davis, P., Mathwig, V., Alexander, S. (2002). Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Human Reproduction*, **17**(2), 393-406.

Van Blerkom, J., Davis, P., Merriam, J., Sinclair, J. (1995). Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Human Reproduction Update*, **1**(5), 429-461.

Vayssier-Taussat, M., Kreps, S.E., Adrie, C., Dall'Ava, J., Christiani, D., Polla, B.S. (2002). Mitochondria membrane potential: a novel biomarker of oxidative environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, **110**, 301-305.

Velilla, E., Rodriguez-Gonzalez, E., Vidal, F., Paramio, M. (2005). Microtubule and microfilament organization in immature, in vitro matured and in vitro fertilized prepubertal goat oocytes. *Zygote*, **13**, 155-165.

Verlhac, M. (2011). Spindle positioning: Going against the actin flow. *Nature Cell Biology*, **13**(10), 1183-1185.

Verlhac, M.H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassinier, P., Maro, B. (2000). Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Current Biology*, **10**, 1303-1306.

- Veselska, R., Janisch, R. (2001). Cortical actin cytoskeleton in human oocytes: A comparison with mouse oocytes. *Scripta Medica (BRNO)*, **74(4)**, 265-274.
- Wang, L., Wang, D., Zou, X., Xu, C. (2009). Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *Journal of Zhejiang University Science B*, **10(7)**, 483-492.
- Wang, W., Abeydeera L.R., Prather, R.S., Day, B.N. (2000). Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development. *Biology of Reproduction*, **62**, 1177-1183.
- Webb, M., Howkett, S., Maro, B. (1986). Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **95**, 131-145.
- Wilding, M., Dale, B., Marino, M., di Matteo, L., Alviggi, C., Pisaturo, M.L. ve ark. (2001). Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*, **16**, 909-917.
- Wilding, M., De Placido, G., De Matteo, L., Marino, M., Alviggi, C., Dale, B. (2003). Chaotic mosaicism in human preimplantation embryos is correlated with a low mitochondrial membrane potential. *Fertility and Sterility*, **79**, 340-346.
- Wilding, M., Fiorentino, A., De Simone, M.L., Infante, V., De Matteo, L., Marino, M. ve ark. (2002). Energy substrates, mitochondrial membrane potential and human preimplantation embryo division. *Reproductive BioMedicine Online*, **5**, 39-42.
- Wittermer, C., Bettahar-Lebugle, K., Ohl, J., Rongieres, C., Nisand, I., Gerlinger, P. (2000). Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Human Reproduction*, **15(12)**, 2591-2597.
- Wu, J., Carrell, D.T., Wilcox, A.L. (2001). Development of in vitro-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction*, **65**, 1579-1585.
- Yaffe, M.P., Harata, D., Verde, F., Edison, M., Toda, T., Nurse, P. (1996). Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 11664-11668.
- Yi, K., Unruh, J.R., Deng, M., Slaughter, B.D., Rubinstein, B., Li, R. (2011). Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nature Cell Biology*, **13**, 1252-1258.
- Zamboni, L., Mishell, D.R., Bell, J.H., Baca, M. (1966). Fine structure of the human ovum in the pronuclear stage. *The Journal of Cell Biology*, **30**, 579-600.
- Zhu, Z., Chen, D., Li, J., Lian, L., Lei, L., Han, Z., Sun, Q. (2003). Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, **68**, 943-946.
- Zollner, U., Zollner, K.P., Hartl, G., Dietl, J., Steck, T. (2002). The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Human Reproduction*, **17**, 1327-1333.

FORMLAR**BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU**

..... Hastanesi,

Yardımla Üreme Teknikleri Merkezindetarihinde yapılan OPU ve ICSI işlemi sonrasında anormal döllenmiş ve kullanılamayacak olan adet 3PN embriyonun İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU ve Araş. Gör. Tuğba KOTİL'in araştırmasında kullanılmak üzere verilmesini kabul ediyorum.

Tarih

Hastanın Adı, Soyadı, İmzası

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 2753

Tarih : 27/10/2008

Konu : Prof.Dr.Seyhun SOLAKOĞLU hk,

Sayın, Prof.Dr.Seyhun SOLAKOĞLU
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi
İlgi : 24.09.2008 tarihli, 329 sayılı yazınız,

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Doktora Öğrencisi Araş. Gör. MSc.Tuğba KOTİL'in yürüteceği 2008/2694 dosya numaralı "İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonrası 3 pronukleuslu oositlerde mitokondri aktivitesi ve hücre iskeleti organizasyonunun incelenmesi" başlıklı Morfolojik Tez çalışması kurulumuzun 22.10.2008 tarihli, 10 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Zafer ARI
İstanbul Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak



**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

Toplantı Tarihi : 22/10/2008

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 10

Sorumlu araştırıcılığını Fakültemiz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'nun üstlendiği, Doktora Öğrencisi Araştırma Gör. MSc. Tuğba KOTİL'in yürüteceği 2008/2694 protokol numaralı "Intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonrası 3 pronukleuslu oositlerde mitokondri aktivitesi ve hücre iskeleti organizasyonunun incelenmesi" başlıklı Morfolojik Tez çalışma dosyası kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKÖĞLU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR

Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D.

Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)

Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK (Katılmadı)

İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast.B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER

Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK

Hukukçu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuğba	Soyadı	Kotil
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	13.03.1981
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	10595944276
Email	tubakotil@msn.com	Tel	05544766342

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. İstanbul tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	
Yük.Lis.	İ.Ü. İstanbul tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2006
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2003
Lise	Özel İstanbul Ar-El Lisesi	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma görevlisi	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2004-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	73	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows Word	Çok iyi
Excell	İyi
Powerpoint	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

A- Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

1- Tuğba Kotil, Leyla Tapul: Retinoik Asit Uygulanan Sıçanların Plasentalarında MMP-2 ve MMP-13 İmmünreaktivitesinin İncelenmesi. İst Tıp Fak Derg 2010; 73:2

B- Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

- 1- **Kotil T.**, Aytekin Y., Karabulut E. (2005). The influence of Aloe Vera on wound healing: Histological and Ultrastructural Findings. 4th Asian – Pacific International Congress of Anatomists: Abstract Book, p.194, PP-337, Kuşadası - Turkey, 7-10 Eylül 2005
- 2- Gültomruk M, **Kotil T**, Aktar F, Karabulut E, Solakoğlu S, Canberk Y. Evaluating The Effects Of Intermittent Hypoxia On Collagen Synthesis And Other Constituents In Skin. XIII International Congress of Histochemistry and Cytochemistry: Abstract book: P3.43, Medical University of Gdansk – Polonya, 23-27 Ağustos 2008 -
- 3- **T. Kotil**, M. Gültomruk, Y. Canberk, S. Solakoğlu. Immunohistochemical evaluation of MMP and VEGF expression during treatment of estrogen and progesterone in uterus. 17th International Microscopy Congress: CD, L7.14, Rio de Janeiro- BREZİLYA, 19-24 Eylül 2010,
- 4- **T. Kotil**, L. Tapul, C. Gazi, T. Sarıoğlu. The effects of retinoic acid on MMP-2 production. 17th International Microscopy Congress: CD, L7.18 Rio de Janeiro- BREZİLYA, 19-24 Eylül 2010

C- Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. **T. Kotil**, N.D. Koç, E. Yenilmez, Y. Aytekin. (2006). Permetrin'in sıçan ovaryumu üzerine etkileri. VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Özet Kitabı p.223, İnönü Üniversitesi – MALATYA, 27-30 Haziran 2006
2. **T.Kotil**, L. Tapul, Y. Aytekin. (2006). 13,cis retinoik asit uygulanan gebe sıçanların plasentalarında MMP-13 immünreaktivitesinin araştırılması. VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Özet Kitabı p.203, İnönü Üniversitesi – MALATYA, 27-30 Haziran 2006
3. **T. Kotil**, N.D. Koç, Y. Aytekin. (2007). Permetrin'in sıçan ovaryum ince yapısı üzerine etkileri.18. Ulusal elektron Mikroskobu Kongresi Özet Kitabı, p.208, P-030B, Anadolu Üniversitesi – ESKİŞEHİR, 26-29 Ağustos 2007
4. **T. Kotil**, L. Tapul. (2008). Retinoik asit verilen sıçanların plasentalarında MMP-2 ve MMP-13 immünreaktiviteleri. Uluslararası katılımlı IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Özet Kitabı p.144, P-190, Çukurova Üniversitesi – ADANA, 20-23 Mayıs 2008
5. M. Gültomruk, **T. Kotil**, E. Karabulut, S. Solakoğlu, Y. Yurdağül Canberk. (2009). Oral Kontraseptiflerin Böbreküstü Bezi Üzerine Etkilerinin

Ultrastrüktürel Olarak İncelenmesi. 19. Ulusal Elektron Mikroskobu Kongresi Özet Kitabı, p.114, Karadeniz Teknik Üniversitesi – TRABZON, 22-25 Haziran 2009

6. Başak Doğu, Veysel Levent Karabaş, Mehmet Cengiz Erçin, **Tuğba Kotil**, Yusuf Çağlar. Sıçanlarda intraperitoneal medikal ozon ile yapılan ön koşullama tedavisinin retinal iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede etkisi. TOD 44. Ulusal Kongresi 29Eylül - 3 Ekim 2010, ANTALYA (**En iyi araştırma üçüncülük ödülü almıştır.**)
7. **Tuğba Kotil**, Şengül, Özkasap, Leyla Tapul. Retinoik asitin uterus ince yapısı ve üzerine etkileri 20. Ulusal Elektron mikroskobu kongresi özet kitabı: p.334, PBIII-25 ANTALYA, 25-28.Ekim 2011
8. Fadime Aktar, **Tuğba Kotil**, Seyhun Solakoğlu. Asetil sisteinin sıçan böbrek yapısında radyasyona bağlı olarak ortaya çıkan hücre hasarındaki etkilerinin ince yapı düzeyinde araştırılması. 20. Ulusal Elektron mikroskobu kongresi: p. 357, PBIII-37, ANTALYA, 25-28.Ekim 2011

D- Ulusal Kongre Katılımı:

- 1- 1. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi, İstanbul, 16-19 Nisan 2005
- 2- 18. Ulusal Elektron Mikroskobu Kongresi, Eskişehir, 26-29 Ağustos 2007
- 3- Uluslar arası katılımlı IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Adana, 20-23 Mayıs 2008
- 4- 19. Ulusal Elektron Mikroskobu Kongresi, Trabzon, 22-25 Haziran 2009
- 5- X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir, 17-20. Mayıs 2010
- 6- 20. Ulusal Elektron mikroskobu kongresi, Antalya, 25-28.Ekim 2011

E- Uluslararası Kongre Katılımı:

1. 17th International Microscopy Congress, Rio de Janeiro – Brezilya, 19-24 Eylül 2010

F- Yardımcı araştırmacı olarak katıldığı projeler:

1- Tübitak destekli proje: “Vaccinium Arctostaphylos Infusyonunun Streptozotocin ile Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda İn Vivo Antidiabetik Etkisi” Dr. Cenk Sesal, Prof.Dr. İsmail Peker, Uzman patolog Dr. Seza Tetikkurt, Med.Dr. Figen çiloğlu, Yrd. Doç. Dr. Kübra Elcioglu, M.Sc. Tuğba Kotil, Phd. Nazan Deniz Yön, Nezih Muşlu, Mustafa Keskin. Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Nisan 2009

G- Verdiği Seminerler:

- 1- Kan-Testis Engeli – 5 Ocak 2006
- 2- Sperm anomalileri ve infertilite – 28 Aralık 2006
- 3- Sperm hücresi ve Spermatid arası bağlantı yapıları – 29 Mart 2007
- 4- Oviduct – sperm ilişkisi ve sperm rezervuarı – 15 Kasım 2007
- 5- Oosit – Granulosa hücresi etkileşimi ve oosit olgunlaşması – 20 Mart 2008

- 6- Embriyo ve Mitokondri – 27 Kasım 2008
- 7- Oosit mayotik arresti ile hücre iskeleti arasındaki ilişki – 12 Mart 2009
- 8- Oksidatif stresin oosit olgunlaşması üzerine etkileri – 17 Aralık 2009
- 9- Deride erken yaşlanma: metodoloji ve morfolojik inceleme yöntemleri – 30 Aralık 2010
- 10- Oksidatif stres ve erkek infertilitesindeki rolü – 5 Mayıs 2011
- 11- Oositte Yaşlanma – 2 Ocak 2012

H- Katıldığı Kurslar:

- 1- Uygulamalı Deney Hayvanları Kursu – 25 Mart 2005
- 2- II. Kök Hücre Biyolojisinde Güncel Kavramlar ve Klinik Uygulamalar Sempozyumu – 7. Eylül 2006
- 3- Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kursu – 7 – 8. Aralık 2006
- 4- 10. Ulusal Stereoloji Kursu – 25-29 Haziran 2007
- 5- Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu – 9 Nisan 2008

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Öykü yazmak