

Memeli Reprodüktif Dokuları, Gamet Hücreleri ve Embriyolarında Apoptozis

Alper KOÇY T, Mesut ÇEV K

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı,
55139, Samsun-TÜRK YE

Özet: Apoptozis, embriyo döneminden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda izlenen programlı hücre ölümüdür. Memelilerde foliküler atrezi ve ovulasyon sonrası regresyondaki en temel mekanizmalardan biridir. Ovaryumda apoptozis, ovulasyona ilerleyen birkaç folikül haricinde geriye kalan hepsinin uzakla tırıldı ı hüresel bir mekanizmadır. Aynı zamanda luteolizis sırasında corpus luteumun uzakla tırılması mekanizmasıdır. Olgun erkeklerde normal spermatogenesis sırasında gerçekte en germ hücresi ölümü, sperm üretiminde en önemli rollerden birini oynar. Olgun memelilerin testisindeki potansiyel spermatozoanın % 25-75'i dejenere olur veya ölür. Sperm apoptozisinin hormonal kontrol altında (FSH ve LH) oldu u bilinen bir gerçektir. Bilinmektedir ki, hücre ölümünün seviyesi hem embriyonun kendisi ve hem de maternal reprodüktif kanal tarafından üretilen ya amsal faktörler ile düzenlenir. Stoplazmik fragmentasyon, geli imin durması ve nükleer yo unla ma apoptozise maruz kalan embriyoların en tipik özellikleridir. Bu derlemenin amacı, morfolojisi ve biyokimyası ile birlikte apoptozis sürecine güncel bilgiler ı ında genel bir bakı sa lamak ve reprodüktif doku faaliyetleri ve embriyolojik geli im üzerinde apoptozisin rolüne dikkat çekmektir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, embriyo, ovaryum, spermatozoa, testis

Apoptosis in Mammalian Reproductive Tissues, Gamete Cells, and Embryos

Summary: Apoptosis is a process of programmed cell death that plays a critical role in some normal and pathologic conditions beginning from embryologic development and ends at death. Apoptosis is a fundamental mechanism in follicular atresia and postovulatory regression in mammals. In the ovary, apoptosis is the cellular mechanism removing all but few growing follicles during their way to ovulation. Apoptosis is also the mechanism behind removal of corpus luteum during luteolysis. In adult males, germ cell death during normal spermatogenesis plays an important role in sperm production. Approximately 25-75 % of potential spermatozoa degenerate and die in mammalian (adult) testis. That sperm apoptosis is under hormonal (FSH and LH) control is generally accepted. There is evidence that levels of cell death are regulated by 'survival' factors produced both by the embryo itself and by the maternal reproductive tract. Cytoplasmic fragmentation, developmental arrest, and nuclear condensation were typical characteristics of embryos undergoing apoptosis. In this review, apoptosis were accessed with multiple features. The goal of this review is to provide a general overview of current knowledge on the process of apoptosis including morphology, biochemistry, and the role of apoptosis in reproductive tissue activities and embryo development.

Key Words: Apoptosis, embryo, ovary, sperm, testis

Giri

Bilindi i üzere, hem tek hücreli hemde çok hücreli canlılarda olsun ya amın temel basamakları; do um, büyüme, üreme, ya lanma ve ölümüdür. Fertilizasyondan itibaren çok hücreli bir organizmada mitoz, farklıla ma ve hücre ölümünün düzenlenmesi büyük önem ta imaktadır. Bunun için hücre ço alması ve ölümü arasında sabit bir oran bulunması gerekmektedir. Organizmada sürekli bir denge sözkonusudur. Yeni hücreler sentez edilirken, var olan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır (1, 31, 39).

Canlılı ın temel karakterlerinden birisi olan ölüm, gerek hücre gerekse de organizma bazında sıkça kar ıla ılan bir olaydır. Ökaryotik hücrelerde imdi-

ye kadar morfolojik ve biyokimyasal analizlerle ayırt edilmi iki tip hücre ölümü belirlenmi tir. Bunlar; patolojik ve fizyolojik hücre ölümleridir (11).

Apoptozun tanımı ve temel özellikleri

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler, 1920 yılında ık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin ke fiyle ba lamı ve ilk nekroz tanımlanmı tir. Kerr ve arkadaşları 1972 yılında, nekrozdan farklı olu an bir hücre ölümü göstermi ve buna eski Yunanca'da sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelen "apoptoz" adı verilmi tir. Apoptoz terimi, o zamandan günümüze kullanılagelmekte ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü ifade etmektedir. Apoptoz geli mi organizmalarda hücrelerarası ili kilerin gere i olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümü olarak tanımlanmaktadır (1, 27, 39).

Apoptotik hücre ölümü ve yenilenmesinin günde yaklaşık 1×10^{11} hücreyi bulduğunu hesaplanmaktadır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı, yeti kin bir insanın vücut a ırlı nın her 18-24 ayda bir yeniden yapım ve yıkımı anlamına gelmektedir. Bu düzende bazı hücreler yıllarca ya arken bir kısmı sadece birkaç saat ya ar. Örne in ba ır sak hücreleri 3-5 günlük ya am sürelerinin ardından ölümlerini, nöronlar ya am boyu canlı kalır. Nöronlardaki apoptoz ise sinapsların olu madı ı dönemde ekillenmektedir. Bu dönemde, do umda a ırı sayıda olan nöronların sayısı uygun sinaptik a ın sa lanabilmesi için azaltılır. Bahsedilen bu hücre ölümleri apoptozla gerçekleşir (34, 35).

Apoptozun uyarımı

Bir hücrenin ya am, bölünme, farklılaşma ya da ölüm seçeneklerinden hangisine yönelece i konusundaki karar, hücre içi ve dışındaki faktörlerin etkile imlerine ba lıdır. Dış ortamdan gelen sinyaller, hücre yüzeyinde bulunan çe itli reseptörlerle hücre içine iletilir ve iletilen mesajın hangi yanıtı yol açacağı hücrenin iç ortamındaki karma ık bir dizi etken tarafından belirlenir. Hücrenin ölümü yönündeki yol apoptozla sonuçlanır. Hücrenin ya amını bölünmeden sürdürmesi, ço alması ya da ölmesi seçeneklerinden hangisinin gerçekleşece ini belirleyen üç temel etmen vardır. Bunlar; besin maddeleri, büyüme faktörleri ve hücre dışından gelen ve hücredeki reseptörler aracılığıyla hücreye iletilen ölüm sinyallerinin varlığı ya da yoklu udur. Bu etkenler dışı nda, hücrenin hasar görmesi ya da DNA yapısının bozulması da ölüm-ya am kararının verilmesinde belirleyici rol oynar (31, 34).

Mitokondri, hücre içinde ATP üretiminin kayna ı olmasının yanı sıra, hücre içi ya da dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştirilerek bir organeldir. Mitokondride zar potansiyelinin bozulması durumunda normalde ATP zincirinde yer alan *Sitokrom C*, hücre stoplazmasına da ılıp inaktif halde bulunan *Apaf-1* molekülüne ba lanarak Apoptozom adı verilen bir yapının olu masına sebep olur. Apoptozom, kaspaz-9'u, kaspaz-9 da dışı er kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktifle tirerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar. Mitokondride dışı zar potansiyelinin de imesi *Bcl-2* ailesi denilen bir protein grubu tarafından düzenlenir. Farklı türlerde de rol oynamakla beraber apoptozu düzenleyen *Bcl-2* ailesinin memelilerde 19 üyesi olduğu bildirilmektedir. Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklığı bir mekanizma olarak gerçekleşir. İsterse hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla ba lamı olsun, apoptotik süreç

kaspazlar (Caspases) adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir (23, 30, 31, 37).

Kaspazlar, sistein proteazlarıdır ve aspartik asitten sonraki peptid ba nını kırarlar. Hücrede inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifle tirirler. Apoptozda hücreyi parçalayan, yani apoptotik morfolojinin olu umunu sağlayan etkenler olarak bilinirler. Bilinen 14 farklı kaspaz türü bulunmakla beraber farklı dokular için farklı kaspaz türlerinin apoptoz gerçekleşme tiroidi ü ünebilir. Örne in; Periferik T hücreleri apoptoz gitmek için ne kaspaz-3 ne de kaspaz-9'a ihtiyaç duyarken, embriyonik kök hücreler her ikisine de ihtiyaç duyar (12, 16, 34).

nsandan, nematoda kadar tüm canlılar arasında korunmuş bir programlı hücre ölüm mekanizmasından söz etmek mümkündür. Çünkü *ced-3 ile Interleukin Converting Enzyme (ICE)* ve *ced-9 ile Bcl-2* genleri arasında yüksek oranda benzerlik bulunmu tur. Bu genler gerek memelilerde ve gerekse nematodlarda birbirlerinin yerine geçerek apoptoz mekanizmalarını aktive veya inhibe edebilmektedirler. Bu nematod model alınarak yapılan organ gelişimi ve apoptoz çalışmaları 2002 yılında Sydney Brenner, Robert Horwitz ve John Sulston'a Nobel Ödülü kazandırmıştır (11, 27, 34).

Di er bir hücre içi faktör ise üzerinde çokça çalışılan *p53 proteini*'dir. Normalde, esas fonksiyonu DNA bir ekilde hasar gördü ü zaman hücre siklusunu durdurup, hücrenin hasarlı DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmaktır. Bu yüzden *gen koruyucusu/gardiyanı* olarak da tanımlanır. Ancak hasar telafi edilemeyecek kadar büyüğe bu kez p53 zıt etki göstererek hücreyi apoptozla götürür (16, 35). Ayrıca, Tümör Nekroz Faktörü (TNF), Koloni Uyarıcı Faktörler (CSF), Nöron Büyüme Faktörü (NGF), nsülün Benzeri Büyüme Faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalmasının yanı sıra, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, virüsler, çe itli antijenler de apoptozu uyandırabilir (11, 21, 27).

Apoptozun morfolojisi

Eskiden beri apoptoz ile nekrozu birbirinden ayırmak zor olmu tur. Çünkü hücre ölümlerinin hangi mekanizma ile olu tu unu belirlemek her zaman mümkün olamamıştır. Bazı durumlarda ise hücre ölüm nedeninin hem nekroz hem de apoptoz olabilece i belirtilmiştir. Apoptoz hücrede yarattığı bu de i ikliklerle nekrozun bir parçasıymı gibi algılanabilir (11).

Apoptozisin nekrozdan farkları unlardır;

- Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre i erken (*cell swelling*), apoptotik hücre tam tersine küçülmeler (*cell shrinkage*) görülür (11, 27).
- Nekrozda kromatin yapısı hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir, ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (*chromatin aggregation*) ve yoğunlaşma (*chromatin condensation*) ekillenir (27, 31, 35).
- Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı sağlamdır. Üzerinde küçük çepçikler (*membrane blebs*) oluşur (11, 27, 39).
- Nekrotik hücre lizise uğrar, ama apoptotik hücre küçük cisimciklere (*apoptotic bodies*) parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır, belirli miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapıları içerirler (27, 31, 35, 39).
- Nekrozda hücre içeriği dışı ortama salıverildiğinden yangı oluşur, ama apoptozda apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden yangı oluşmaz (11, 31, 39).
- Nekrozda iyon dengesi kaybolur, apoptozda ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur (35, 39).
- Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir olgudur ve +4°C'de bile gerçekleşebilir. Apoptoz ise enerji gerektiren aktif bir olgudur ve +4°C'de gerçekleşemez (11, 39).
- Agaroz jel elektroforezi yapıldığında, nekroz sırasında DNA'nın rastgele sindirimi mevcuttur. Oysa apoptozda rastgele olmayan, mononükleozomal parçalanma mevcuttur. Bu da Agaroz jel elektroforezde apoptoz için karakteristik, "ladder pattern" adı verilen merdiven görünümüne kırımlar meydana getirir (27, 31, 35, 39).
- Nekroz sırasında DNA, hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır. Ayrıca, apoptozda mitokondri tarafından stoplazmaya birçok faktör salınımı mevcuttur (27, 31, 35).

Apoptozun Homeostazis Çindeki Yeri

Apoptoz, çok hücreli bir organizmanın embriyonik dönemdeki gelişiminden başlayarak erişkin bir organizma olarak var olmasına ve yaşlanmasına kadar birçok gelişim aşamasında homeostazisin sürmesini sağlayan önemli bir fizyolojik süreçtir.

Homeostazisin korunmasında apoptozis, embriyonik dönemde ekstremitelerin ve organlarda ventriküllerin oluşumunda, dişi fütüsde Wolf ya da erkek fütüsde Müller kanallarının körelmesi sırasında ve merkezi sinir sistemi gelişiminde nöron sayısının düzenlenmesinde etkin olarak yer alır. Doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçiminde temel bir rol oynatır, ayrıca DNA'sına hasar gören ya da virüsle enfekte hücrelerin ölümünü sağlayarak etkin bir rol oynar. Ayrıca; büyüme faktörlerinin ortamdaki konsantrasyonlarında organlarda gerçekleşen küçülmenin de temel mekanizması, ilgili organlardaki hücrelerin apoptozla ölümüdür (1, 13, 31).

Apoptozisin diğer bir fonksiyonu ise anormal, hatalı, işlevini kaybetmiş ya da tehlikeli potansiyele sahip hücreleri ortadan kaldırarak kalite kontrol mekanizması gibi işlevlerdir. Konuyla ilgili yapılmış çalışmalarla bildirildiğine göre, p53 ve benzer genlerden yoksun bırakılan fare embriyolarının ölümünün aksine anormalilerle doğumla ilgili gösterdiği belirtilmiştir (10, 18, 31, 39).

Reproduktif Doku ve Gamet Hücrelerinde Apoptoz

a- Spermatogenezde apoptozun rolü

Doku canlılığında ve canlılığın devamında, normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptoz, testiküler dokuda da sıklıkla saptanan bir olaydır. Bilindiği üzere spermatogenezis, spermatogonial kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm hücresinin oluşmasıdır. Normal spermatogenezis içerisinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak, germinal hücre ölümü de görülür ve bu durum sperm oluşumunda kritik rol oynar. Apoptoz, spermatogenezisde genellikle spermatogonia ve spermatositler de programlı hücre ölümüne yol açar. Germinal hücrelerdeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir. Yapılan bir çalışmada, testiste devamlı olarak kendiliğinden apoptoz gerçekleştiği ve defektif germinal hücrelerin yok edilmesine yönelik bu süreçte erkek germinal hücrelerinin % 75'inin apoptoza maruz kaldığı bildirilmiştir. Spermatogoniumların erken gelişim evresinde başlayan apoptotik eliminasyon, olgunlaşmakta olan germinal hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamakla ilgili fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (37, 39).

Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik durumlarda, deneysel kriptomidizm olarak turulan hayvanlarda, ısı artırımının olduğu durumlarda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinin

de artı gözlenebilir. Spermatogenezisde, testiküler germinal hücre apoptozunun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir. Seminifer tubul epitelyumunun ısı, radyasyon veya soğuk gibi faktörlere olan hassasiyeti de germinal hücrelerin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür. Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezisde bozulma ve infertilite olabilir (16, 26, 38).

b- Sperm hücrelerinde apoptoz

Yeti kin memelilerde spermatogenezisde, germinal hücre kaybı önemli rol oynar. Testislerde potansiyel spermatozoonların yaklaşık % 25-75'i dejenerer ya da ölür. Ganodotropinlerin (FSH-LH) ve testosteronun eksikliği testislerde germinal hücre kaybına yol açar. Sperm apoptozu ve sperm DNA'sında hasar, erkek infertilitesi için potansiyel ve kullanımlı belirleyiciler olarak kabul edilir. İlk olarak anormal sperm hücrelerinde somatik hücrelerin apoptozu için karakteristik olan DNA zincir kırıklarının ve DNA in-situ denatürasyonunda sensitivite artışını gösterilmiştir. Son çalımlar da apoptozun normal spermatogenezis sırasında germinal hücre ölümü mekanizmasının altında yatan nedenlerden biri olup, pek çok memeli türünde spermatogenezisi düzenleyen önemli mekanizmalardan biri olduğunu göstermektedir (26, 30, 37).

Apoptoz ile ortaya çıkan germinal hücre kaybı, spermatogenezis sırasında oluşan dominant bir süreçtir ve p53, p21, kaspaz, bcl-2 ve Fas düzeylerinde de iki yollarla ayarlanır. Fas ekspresyonlu sperm sayısı, spermiyogram sonuçları normal olan örneklerde düşük, fakat anormal parametrelilerde yüksek bulunmuştur. Yine, fragmente DNA içeren sperm yüzdesinin in Vitro Fertilizasyon (IVF) ve intra-stoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) uygulamalarında fertilizasyon oranı ile negatif ilişki gösterdiği saptanmıştır. Germinal hücreler üzerinde oluşan hafiften orta dereceye kadar olan genotoksik ve sitotoksik etkiler apoptozu indüklemektedir. Apoptozun hasarla mamı DNA'lı hücrelerin seçimini garantileyen bir mekanizma olduğu düşünülse de, apoptozla elenmeyen hasarlı spermatozoanın da bir ovumu fertilize edebildiği bilinmektedir (3, 16, 26, 37, 39).

Sperma dondurma ileminin ise fosfatidilserin translokasyonuna yol açmak suretiyle apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Özellikle, sıvı azot buharı, sperm sulandırma ve ekilibasyon amaçları apoptozis ve benzeri olayların potansiyel başlatıcılarıdır (3, 23). Düşük sperm yoğunluğu ve anormal

malilerin apoptozu indüklediği belirtilmiştir, insanlardaki bir çalımda 35 yaş ve üzeri grubun 25 yaş altı gruba göre yüksek apoptoz gösterdiği belirtilmiştir olsa da herhangi bir ilişkinin bulunmadığı yönünde sonuçlanan çalımlar da mevcuttur. Ancak sperm apoptozu ile fertilizasyon arasında kesin bir orantı mevcuttur (8, 29, 37).

c- Ovaryum ve folikülerde apoptoz

Memeli ovaryumunda foliküllerin ortaya çıkma ilemi, foliküler dalgalanma süreci içerisinde proliferasyon, farklılaşma ve atrezi arasında kompleks bir etkileşim sonucunda meydana gelir. Folikül atrezisi olarak bilinen bu işlem apoptozdur ve folikül hücrelerinin ölümü genetik olarak belirlenmiştir. in vitro çalımlarda, atretik foliküllerden elde edilen kumulus-oosit kompleksleri'nden (COCs) elde edilen embriyolarda blastosist aşamasına erişim durumu oldukça zayıf olduğu görülmüştür (25, 41).

Gonadotropinler, ovaryum foliküllerinin büyümesi ve gelişmesi için gereklidir. Preovulatör gonadotropin artışı bloke edilir veya hipofizektomi sonrası serum gonadotropinleri azalır, foliküller atreziye maruz kalır. Diğer folikül yaşamsal faktörleri olarak; Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor (TGF), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Interleukin-1 (IL-1), Growth Hormone (GH) ve pro-apoptotik faktörler olarak da Tumour Necrosis Factor-alfa (TNF- α), Fas Ligand ve GnRH sayılabilir. Bunlardan IGF-1 folikül apoptozu üzerinde etkiliyken, Aktivin granüloza hücre apoptozu üzerinde inhibe edici etki gösterir. Folikül yaşamsal ve atrezisi üzerinde etkili diğer önemli regülatörler seks steroidleridir. Rat ovaryumunda östrojenler yaşamsal faktör olarak etkiliyken, androjenler apoptozu tetik ederler (21, 33).

Apoptoz, ovaryumda oositler adına patolojik bir durumun oluşmasına sebep olan ve normal olmayan foliküler gelişim sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Atrezinin hücresel mekanizmasının ardındaki asıl neden olarak yer alır. Adı geçen mekanizma, daha çok mRNA ve protein sentezi ile ilgilidir. Biyokimyasal olarak, foliküler atrezi apoptotik hücre ölümlerine atfedilir. Bu da, belirli bir düzen içerisinde hücrelerin sahip olduğu DNA materyalinin kaybı ve nükleer genomik havuzun daralması ile sonuçlanır. Apoptoz, aynı zamanda corpus luteumun (CL) luteolizisini de sağlayan mekanizmadır. Granüloza hücreleri, folikülogenezde apoptozdan ilk etkilenen hücrelerdir. Antral foliküllerdeki granüloza hücrelerinde apoptozun başlatılması hormonal kontrol ile birlikte parakrin ve/

veya otokrin intraovarian sinyallere bağlıdır. Geçmiş çalışmalar gösteriyor ki, gonadotropinlerin azalması ovaryumda kuvvetli atreziye yol açmaktadır. Bunun yanı sıra, büyüme faktörleri de ovaryum gelişiminde önemli rol oynar. İnsuline-like Growth Factor, apoptozun düzenlenmesi olayında hücre proliferasyonu, aromataz aktivasyonu ve progesteron sentezi gibi kilit roller üstlenir. Granüloza hücrelerinde GnRH, androjenler, IL-6, ROS ve TNF- α apoptozu uyarır (28, 32, 38).

Teka hücrelerinde ise apoptoz geciktirilmiş görünmekle beraber, ovaryumdaki bu hücre de apoptoza uğramaktadır. Teka hücrelerindeki apoptozun mekanizması halen araştırılmakta beraber Bcl-2 ve kaspaz-1'in sürece dâhil olduğu bilinmektedir. Foliküler gelişimin primordial ve preantral safhalarında ise apoptozdan ilk etkilenen hücre oositlerdir. Parakrin faktörlerin, oosit apoptozunu uyardığı düşünülmektedir. Bu faktörlerin varlığı, foliküler matürasyonu engelleyen bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Sürecin anahtar molekülleri ise EGF/TGF- β , FGF, Inhibin/Activin ve c-kit/KL' dir (32).

d- Embriyolojik gelişimde apoptozis ve önemi

Apoptoz, embriyonun implantasyonundan sonra blastosöllerin oluşumunu da içeren birçok fonksiyonu yerine getirir. Implantasyondan önce ise embriyo çoğalması erken bölünme safhasında olmak üzere hücre kaybeder. Bu süreç fare, sırt ve insan embriyolarında çeşitli metodolojik çalışmalarla, apoptoz olarak tanımlanmıştır. Bu türlerde,

COCs formasyonu güvenilir bir parametre olarak kabul edilir. COCs'deki apoptoz frekansı ile oosit kalitesi arasındaki ilişki konusundaki çalışmalar çelişkili sonuçlara ulaşmıştır. Yine de, kumulus hücrelerindeki apoptoz frekansı kesin olmamakla beraber, embriyo gelişim potansiyeli için bir ölçüt olarak kabul edilir (22, 40).

Implantasyondan önce embriyoda hücre ölümü ve apoptozun artması olabilecek morfolojik belirtiler saptanmıştır. Son yıllarda kaydedilen çeşitli değişimler şunlardır; normal gelişimde apoptoz ilk olarak blastosist evreinde baskın olarak da Inner Cell Mass (ICM) hücrelerinde görülür. Fare blastosistlerinde in vivo ya da in vitro gelişimde apoptoz görülme sıklığı ICM' de % 5-10, Trophoctoderm (TE)'de ise <1%'dir. In vitro fertilizasyon ile elde edilmiş embriyolarda ise TE hücrelerinde apoptoz sıklığı artar (% 7-8). Erken bölünme aşamasında türe spesifik zamanlarda apoptoz dalgası etkilenir (6).

İlk büyük apoptoz dalgası, blastosistlerde ve özellikle ICM hücrelerinde görülür. Apoptozun ICM üzerindeki bu seçici etkisi canlı oluşum aşamasında genetik yapının korunmasını sağlamaya yöneliktir. Çünkü fötustaki organ oluşumu bu hücreleri köken olarak meydana gelir. Apoptoz hasarlı, fonksiyonunu yitirmiş ya da bozuk fenotipteki hücreleri de elemine eder. Deoksiribonükleik asit zincirindeki kırılmalar uyarım yolu ile 2 saat içerisinde ICM apoptozuna yol açar. Embriyoda apoptoz sıklıkla meydana gelmesine rağmen çok sınırlı kesimlerde oluşur ve ancak birkaç hücre ölürken gözlemlenebilir. Bu sebeple en verimli yöntem in situ tespittir (6, 7, 14, 15, 21).

Tablo 1. Farklı türlerde apoptoz ve embriyonik genom aktivasyonunun zamansal karışması (6)

Tür	Embriyonik Genom Aktivasyonu	Apoptozis
Fare	1-2 hücre	1 hücre
İnsan	4 hücre	2 hücre
Sırtır	9-16 hücre	9-16 hücre
Kara Kurbağası	Blastula ortası	Blastula ortası

apoptozun ortaya çıkması ile ilk embriyonik genom aktivitesi aynı döneme denk gelir (Tablo-1). Embriyoların çoğalması apoptoza maruz kalmadan blastosist evreye kadar normal gelişimini sürdürmektedir (6, 19, 21).

Kumulus hücreleri, sinyal salınımı ve düzenlenmesi fonksiyonları ile oosit matürasyonu ve fertilizasyonunda kritik rol oynar. Oosit gelişimi için

Bununla birlikte, insan blastosistlerinin mikroskopik incelemesinde ölü hücrelerin sıklıkla komşu hücrelerle yutulduğu görülmektedir. Kromatin yoğunlaşması, nükleus parçalanması ve fagositoz blastosistte apoptozun karakteristiğidir. Apoptotik nükleustaki DNA kırılmaları, merdiven görünümü ile elektroforez (Agaroz Jel Elektroforezi) yönteminde tespit edilebilir. Fakat memeli embriyoları

çok az hücre içerdi inden bu mümkün de ildir (19, 24).

Günümüzde kullanılan IVF prosedürlerinde fertilize oositlerin (insan-sı ır) yarısından daha az oranı blastosist a amasına ula ırken, elde edilen bu blastosistlerin de % 50'den fazlasında düzgün bir implantasyon ekillenmez. Bu kayıplar, embriyonun geli imi süresince devam eder ve genellikle morula a amasında ekillenir (2, 5, 20, 24).

Aneuploidi ve polyoploidi gibi kromozom anormallikleri, embriyonun in vivo ve in vitro geli iminde önemli rol oynar. Bununla birlikte yetersiz metabolit salınımı ve yüksek miktardaki serbest radikaller (ROS) gibi medyum ko ulları da embriyo geli imini etkiler. Ölü hücrelerin büyük ço unlu u blastosist evrede fagositozla temizlenirken bazı hücreler buna direnir. Bu hücreler blastosöl bo -lukta ya da TE ile Zona pellucida (ZP) arasında izole edilmis olup, büyük ço unlu unda hücrelerarası sinyaller kaybolmu , mitokondrieleri farklıla mı ve endoplazmik retikulumları kıvrımlarını yitirmi tir. Hücrelerdeki bu durum bize erken geli im döneminde olu tuklarını gösterir ve bunların apoptoz ile temizlenmemi olmas ı ilginçtir. Bu bilgilere göre, ya blastomerlerin fagositoz yetene inden ya da preimplantasyon a amasında ölen hücrelerin fagositozu mümkün kılacak yüzey moleküllerinden yoksun oldu u varsayılmaktadır (24).

Apoptoz, embriyo için in vitro bir bozukluk de ildir. Ancak, bu durum apoptozun in vitro ortam artlarından etkilenmeyece i anlamına gelmez. Brison ve ark. (1997), farelerde in vitro apoptoz oranının in vivo artlarda olu um oranına göre daha yüksek oldu unu, bu oranın da kültürdeki embriyo yo unlu una ba lı oldu unu belirtmi tir (Tablo-2). Tekli embriyo kültürleri, hücreler arasındaki etkile im ve sinyal iletiminden yoksun oldu u için grup kültürlerle oranla daha yüksek apoptoz göstermektedir. Embriyo kültürlerinde kullanılan medyumların kompozisyonu da önemlidir. Örne in; farelerde daha az glutamin içeren iki medyum kar ıla tırılması ve azaltılan glutaminin apoptozu azalttı ı görülmü tür. Yine rat embriyosu kültürlerinde artan glukoz oranı apoptozu da arttırmı tır (15, 20).

Çe itli türlerde embriyolar growth faktör reseptörleri ta ır ve implantasyon öncesi geli im a amasında hem kendi, hem çevresindeki embriyolardan ya da maternal kanaldan kaynaklanan parakrin etki ile beslenir. nsanlarda implantasyon öncesi 4. günde embriyoların % 60'ından fazlası bir ya da daha çok nükleus anomalisi, % 20'si ise kromozomal anomalili gösterir. Bunun kontrolü apoptoz ile mümkündür (15, 20).

Oksidanların, gonadal hücreleri de kapsayan birçok hücre türünde in vitro apoptotik sürecin bir kısmından sorumlu oldukları bilinmektedir. Bu nok-

Tablo 2. Farklı türlerde in vivo ve in vitro erken blastosistlerde apoptozun zamanlaması ve insidensi (36)

Tür	Embriyonik Orijin	Apoptozis ilk	Blastosistteki
		Olu um Safhası	Apoptozis Oranı (%)
SI İR	In vivo	21 hücreli	4.2-6.1
	In vitro	8-16 hücreli	4.0-10.3
	Partenogenetik	-	8.5
	Nükleer transfer	6 hücreli	10.2
SIÇANG LLER	In vivo	32 hücre	2.0-4.5
	In vitro	4-32 hücre	4.0-10.5
DOMUZ	In vivo	blastosist a aması	0.4-1.2
	In vitro	8 hücre	7.3
	Nükleer transfer	Blastosist a aması	5.3-6.7
TAV AN	In vivo	5. gün	5.2
	In vivo	-	0.18
	In vitro	16 hücreli	0.52

tada östrojen, progesteron ve IGF salınımları da hücre yo unlu una göre de i im göstermektedir. Farklı türlerde in vitro embriyo geli iminde Insuline-like Growth Factor (IGF-I), Transforming Growth Factor- (TGF-), Fibroblast Growth Factor (FGF), Trombosit Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth Factor (EGF) ve Growth Hormone (GH) gibi büyüme faktörlerinin yaralı etkileri bildirilmektedir (4, 9, 17, 33).

Embriyonik geli imde apoptozun do ru düzenlemesi de çok önemlidir. Hasarlı hücrelerin elenmesindeki eksiklik, kanser gibi hastalıkların oluşmasına neden olabilirken, apoptozun artırılması normal hücrelerin ölmesine, nörodejeneratif hastalıklara yol açabilmektedir. Kritik e i in altına gerileyen ICM sayısı, embriyonik geli imi durdurabilir. Aynı e ikilde toplam blastosist hücre sayısı da implantasyon potansiyeli ile orantılıdır (7).

Sonuç

Dondurma i lemi fosfatidilserin translokasyonu yoluyla spermada apoptoza yol açmaktadır. Spermanın dondurularak saklanması çalı malarında sulandırma, dondurma, çözündürme gibi çe itli safhalarda ve saklanırken de belirli aralıklarla apoptotik marker'ler (belirteç) kullanılarak apoptoz kontrolü yapılması yararlı olabilir. Embriyo için apoptoz ise in vitro bir bozukluk olarak kabul edilmedi i, fizyolojik bir seçim süreci oldu u için müdahale edilmemeli ancak normal düzeyinden saptırarak kültür ve manipülasyon artları olu turulmasına dikkat edilmelidir.

Hayvanlarda fertilite, yeti tirme sürecini etkileyen önemli kriterlerden biridir. Gamet geli imi, fertilizasyon ve implantasyon sürecinde apoptoz mekanizması oldukça önemli rol oynamaktadır. Son zamanlarda, in vitro fertilizasyon ve klonlama teknolojileri ile üretilen memeli embriyolarının transferlerinde yüksek oranda (% 55-60) kayıplar oldu u sıklıkla ifade edilmektedir. Bu sürecin ve onu etkileyen faktörlerin aydınlatılması yönündeki çalı maların reproduktif biyoteknolojik faaliyetler alanında önemli katkılar sa layaca ı tartışılmaz bir gerçektir.

Kaynaklar

- Altunkaynak ZB, Özbek E, 2008. Programlanmı hücre ölümü; apoptoz nedir? *Tip Ara Derg*, 6 (2): 93-104.
- Antunes G, Chaveiro A, Santos P, Marquez A, Jin HS, Silva MF, 2010. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. *Reprod Domest Anim*, 45 (1): 26-32.
- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch GT, Pauls PK, 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod*, 66 (2): 354-360.
- Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B, 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*, 126 (1): 91-99.
- Brad MA, Hendricks MEK, Hansen JP, 2007. The block to apoptosis in bovine two-cell embryos involves inhibition of caspase-9 activation and caspase-mediated DNA damage. *Reproduction*, 134 (6): 789-797.
- Brison RD, 2000. Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors. *Hum Fert*, 3 (1): 36-47.
- Brison RD, Metcalfe DA, Bloor JD, Hunter RH, Brady G, Kimber JS, 2004. Analysis of apoptosis in the preimplantation embryo. In: *A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo*, Oxford University Press, 279-297.
- Chen Z, Hauser R, Trbovich MA, Shifren LJ, Dorer JD, Bailey GL, Singh PN, 2006. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis. *J Androl*, 27 (1): 112-120.
- Choi J, Park S, Lee E, Kim HJ, Jeong IY, Lee YJ, Park WS, Kim SH, Hossein SM, Jeong WY, Kim S, Hyun HS, Hwang SW, 2008. Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. *Mol Reprod Dev*, 75 (7): 1127-1135.
- Conradt B., (2009). Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet*, 43 : 493-523.
- Çalı kan M, 2000. Apoptosis: Programlanmı hücre ölümleri. *Turk J Zool*, 24 (Ek): 31-35.
- Domingos MP, Steller H, 2007. Pathways regulating apoptosis during patterning and development. *Cur Opin Genet Dev*, 17 (4): 294-299.
- Eijnde MS, Luijsterburg MJA, Boshart L, Zeeuw DIJ, Dierendonck HJ, Reutelingsperger MPC, Keers VC, 1997. In situ detection of apoptosis during embryogenesis with Annexin V: From whole mount to ultrastructure. *Cytometry*, 29 (4): 313-320.
- Erhardt P, Toth A, 2009. *Apoptosis methods and protocols*. Second Edition. Humana press,

- Watertown, MA, USA.
15. Hardy K, 1997. Cell death in the mammalian blastocysts. *Mol Hum Reprod*, 3 (10): 919-925.
 16. Hikim SPA, Swerdloff SR, 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*, 4 (1): 38-47.
 17. Gordon, 2003. Laboratory Production of Cattle Embryos. Second Edition, CABI Publishing, British Library, London, UK.
 18. Jacobson DM, Weil M, Raff CM, 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88 (3): 347-354.
 19. Jakob OG, Hiemke MK, Steph JD, Birthe A, Lars-Inge L, Poul M-H, 2003. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod*, 69 (4): 1193-1200.
 20. Knijn MH, Gjorret OJ, Vos MAL, Hendriksen MJP, Weijden CB, Hyttel MP, Dieleman JS, 2003. Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number and blastocyst formation in bovine embryos. *Biol Reprod*, 69 (4):1371-1378.
 21. Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F, 2002. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 61 (2): 180-186.
 22. Li JH, Liu JD, Cang M, Wang ML, Jin ZM, Ma ZY, Shorgan B, 2008. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim Reprod Sci*, 114 (1): 89-98.
 23. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R, 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*, 71 (1): 28-37.
 24. Matwee C, Betts HD, King AW, 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, 8 (1): 57-68.
 25. Mayes M, 2002. The meiotic arrest of bovine oocytes. *Doctora Thesis, Laval University, Quebec, Canada*.
 26. Ok E, Öz ZS, 2007. Sperm hücrelerinde apoptoz. *Androloji Bülteni*, cilt 30: 215-218.
 27. Öktem S, Özhan HM, Özol D, 2001. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2 (1): 91-95.
 28. Palumbo A, Yeh J, 1994. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol Reprod*, 51 (5): 888-895.
 29. Perticarari S, Ricci G, Granzotto M, Boscolo R, Pozzobon C, Guarnieri S, Sartore A, Presani G, 2007. A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Hum Reprod*, 22 (2): 485-494.
 30. Sakkas D, Bizzaro D, Manicardi CG, 2007. Chromatin damage and male infertility. In: *The genetics of male infertility*. Humana press, Totowa New Jersey, 304-306.
 31. Solako lu Z, 2009. Apoptoz varlı ı ya da yoklu u bir hastalık nedeni. *Klinik Geli im*, 22 (3): 20-25.
 32. Svanberg B, 1999. Apoptosis the cellular mechanism of rat ovarian follicular atresia. *Doctora Thesis*, Göteborg University, Sweden.
 33. Svensson E, 2001. Regulation of apoptosis and stereoidogenesis in ovarian preovulatory granulosa cells. *Doctora thesis*, Department of Physiology and Pharmacology, Göteborg University, Sweden.
 34. Ulukaya E, 2003. Apoptozis ders notları, http://biyokimya.uludag.edu.tr/Lecture_Apopto_2002.
 35. Ulukaya E, 2010. Hücre siklusu ve apoptozis n: *Akci er Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İkeler ve Uygulamalar*, <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis>.
 36. Vandaele L, 2008. Intrinsic factors affecting apoptosis in bovine in vitro produced embryos. *Doctora Thesis*, Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health University, Gent, Belgium.
 37. Weng LS, Taylor LS, Morshedi M, Schuffner A, Duran HE, Beebe S, Oehninger S, 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*, 8 (10): 984-991.
 38. Yang YM, Rajamahendran R, 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-1 on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod*, 62 (5): 1209-1217.
 39. Yılmaz , 2005. Eri kin ratlarda deneysel varikosel olu turulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi; ve yükselmi olan apoptozisin

varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile de erlendirilmesi.
Uzmanlık Tezi, stanbul.

40. Yuan QY, Soom VA, Leroy LMRJ, Dewulf J, Zeveren VA, Kruif A, Peelman JL, 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 63 (8): 2147-2163.
41. Zeuner A, Müller K, Reguszynski K, Jewgenow K, 2003. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology*, 59 (5-6): 1421-1433.

Yazı ma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Mesut ÇEV K
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
55139 Kurupelit / SAMSUN
Tel: 0 362 312 19 19-1225