



T.C.

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

KÜMÜLÜS HÜCRE KÜLTÜRÜNDE APOPTOSİS VE
LUTEİNİZASYON SÜRECİNİN IVF HASTALARINDA
EMBRİYO GELİŞİMİ VE GEBELİK AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ

GÖKÇE DÜNDAR ÇİFTLİK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL

2019



T.C.

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

KÜMÜLÜS HÜCRE KÜLTÜRÜNDE APOPTOSİS VE
LUTEİNİZASYON SÜRECİNİN IVF HASTALARINDA
EMBRİYO GELİŞİMİ VE GEBELİK AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ

GÖKÇE DÜNDAR ÇİFTLİK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL

2019

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Program Adı: Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Öğrencinin Adı Soyadı: Gökçe DÜNDAR

Danışman: Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Gökçe DÜNDAR tarafından hazırlanan "Kümüllüs Hücre Kültüründe Apoptosis ve Luteinizasyon Sürecinin IVF Hastalarında Embriyo Gelişimi ve Gebelik Açısından Değerlendirilmesi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:26/07/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Doç. Dr. Mine ERGÜVEN

İstanbul Aydın Üniversitesi

Prof. Dr. Ramazan DANSUK

Biruni Üniversitesi

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Leman ŞENTURAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

I. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı herhangi bir davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, çalışma ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar listesi şeklinde eklediğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gökçe Dündar ÇİFTLİK



II. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından itibaren en büyük katkıyı ve desteği gösteren saygıdeğer hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Tülay İREZ başta olmak üzere, emeğini, sevgisini ve ilgisini benden esirgemeyen saygıdeğer hocam sayın Doçent Dr. MİNE ERGÜVEN'e, tez çalışmama verdiği katkılardan dolayı BAHÇELİEVLER MEDİCALPARK HASTANESİ TÜP BEBEK LABORATUARI'nın değerli ekibine,

Evlatları olmaktan dolayı hep gururla sürdürdüğüm hayatımın en önemli iki insanı olan canım ANNEM ve canım BABAM'a, kat ettiğim her yolda elimden tutup her zaman desteklerini sürdüren sevgili eniştem Op. Dr. İRFAN ÇINAR ve canım ablam BAHAR ÇINAR'a ve tüm aileme,

Ve bu sürecin gizli kahramanı, yol arkadaşım, en büyük destekçim ve yardımcım DENİZ ÇİFTLİK'e, sonsuz teőekkürlerimle...

Gökçe Dündar ÇİFTLİK

III. İÇİNDEKİLER

İçindekiler	Sayfa No
İç Kapak	-
Onay Sayfası	-
I. BEYAN.....	i
II. TEŞEKKÜR	ii
III. İÇİNDEKİLER	iii
IV. SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
V. TABLOLAR LİSTESİ.....	vii
VI. ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
1.ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1.Ovaryumun Yapısı ve Anatomisi.....	7
4.2. Ovaryumun Embriyolojisi	8
4.2.1.Ovulasyon	10
4.2.2. Oosit gelişimi.....	10
4.2.2.1.Maturasyon sürecinin klinik açıdan değerlendirilmesi	13
4.2.2.2.Nükleus maturasyonu.....	15
4.2.2.3.Sitoplazmik maturasyon.....	15
4.3.Kümüls Hücresinin Görevleri ve Etkileri	16
4.4.Kümüls Hücresinin Oosit Maturasyonuna Etkileri.....	18
4.4.1.Yardımla üreme tekniklerinde sağlıklı oosit değerlendirmesi.....	19
4.5.Dişi Üreme Sistemini Kontrol Eden Hormonlar ve Etkileri	20
4.5.1.Folikül stimulan hormon (FSH).....	20

4.5.2.Lüteinizan hormon (LH).....	21
4.5.3. İnsan koryonik gonadotropini (HCG).....	22
4.5.4.Progesteron	22
4.5.4.1.Progesteron hormonunun görevleri.....	23
4.5.4.2. Klinikte progesteron hormonu için normal kabul edilen değerler	24
4.6.Kümüllüs Hücre ve Dişi Üreme Hormonları Arasındaki Koordinasyon	24
4.7: Embriyo Değerlendirmesi	24
4.7.1: Fertilizasyon günü	24
4.7.2: İkinci ve üçüncü gün embriyo değerlendirme	25
4.7.2.1: Erken bölünme	25
4.7.2.2: Bölünme aşamaları.....	26
4.7.3: Dördüncü gün embriyo değerlendirme	26
4.7.4: Blastokist değerlendirme sistemi.....	27
4.8: Apoptozis'in Tanımı ve Özellikleri.....	29
4.8.1: Apoptozis mekanizmaları	31
4.8.2: Apoptozis belirlenmesinde kullanılan yöntemler	32
4.8.2.1: Tunel testi.....	32
5.GEREÇ VE YÖNTEM	34
5.1.Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grupları ve Özellikleri	34
5.2.Çalışmanın Tasarımı.....	34
5.3.Çalışmada Kullanılan Yöntemler	35
5.3.1. Örnek alımı ve hücre kültürü	35
5.4.İstatistiksel İncelemeler	35
6.BULGULAR	36
7. TARTIŞMA	44
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
9. KAYNAKLAR	49

10. EKLER.....	58
11. ÖZGEÇMİŞ	60
İNTİHAL RAPORU	61



IV. SİMGELER VE KISALTMALAR

FSH : Folikül Stümölan Hormon

LH : Luteinize Hormon

Hcg : Human Koryono Gonadotropin

IVM : In Vitro Maturasyon

YÜT : Yardımla Üreme Teknikleri

MDF : Cdc 2- Siklin B Kompleksi

IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu

KOK : Kümüls Hüre Kompleksi

EGF : Epidermal Büyüme Faktörü

ICM : İç Hüre Kitlesi

AHO : Apoptotik Hüre Oranı

PGH : Primordial Germ Hücresi

PF : Primordial Folikül

V. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1 :	Kadın yaşı, erkek yaş, fertilize oosit sayısı, embriyo sayısı, sperm konsantrasyon, motilite ve morfolojisinin gebelik sonuçları açısından karşılaştırılması	36
Tablo 2 :	Progesteron, apoptotik hücre oranları ve blastomer sayılarına ilişkin ortalama, standart sapma ve karşılaştırma.	37
Tablo 3 :	Gebelik pozitif ve negatif gruplarında apoptotik hücre oranı ortalamaları	38
Tablo 4 :	Gebelik pozitif ve negatif gruplarında 3. Gün blastomer sayısı ortalamaları.	38
Tablo 5 :	Progesteron ve apoptotik hücre oranları arasında korelasyon.	39
Tablo 6 :	Progesteron, apoptoz, embriyo kalitesi ve gebelik ilişkisi.	40
Tablo 7 :	Embriyo kalitesi ile ilişkili olarak progesteron ve apoptotik hücre oranına ilişkin ortalama, standart sapma ve karşılaştırma (Kruskal Wallis test).	41
Tablo 8 :	Gebelik gruplarında embriyo kalitesi ve karşılaştırma.	42
Tablo 9 :	Gebelik pozitif ve negatif gruplarında PN oluşumu.	43

VI. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1:	Ovaryum histolojik yapısı.....	8
Şekil 2 :	Oogonium farklılaşma evreleri	9
Şekil 3 :	Antral folikül gelişimi, primordial folikül havuzu.....	12
Şekil 4 :	Oosit maturasyon aşamalarında antral ve graff folikül.....	14
Şekil 5 :	Kümüls Oophorus	18
Şekil 6 :	1. Gün döllenmiş oosit görüntüsü (2PN)	25
Şekil 7 :	Embriyonun günlere göre gelişim aşamaları	27
Şekil 8 :	Grade:1 – 1. kalite ICM ve Trofoektoderm tabakasına sahip embriyo- iyi kalite.....	28
Şekil 9 :	Grade:2- 2. kalite ICM ve Trofoektoderm tabakasına sahip embriyo - orta kalite.....	28
Şekil 10 :	Grade:3- 3.kalite ICM ve Trofoektoderm tabakasına sahip embriyo- kötü kalite.....	29

1.ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER

Ovulasyon öncesi dönemde oosit etrafında kümülüs matriksinin hızla oluşumu yegâne ve dinamik biyolojik bir olaydır. Oositi çevreleyen granuloza hücreleri kümülüs oophorusu oluşturur. Kümülüs hücreleri, üreme hücrelerinin yeterli beslenmesi ve gelişim kapasitesine ulaşmasında önemli bir konuma sahiptir. Oosit çevresindeki kümülüs, granuloza ve teka hücreleri steroid sentezi ile oosit maturasyonuna katkıda bulunurlar. Kümülüs granuloza hücrelerinde apoptoz normal süreçte ortaya çıkmaktadır ve kümülüs apoptozunun oosit olgunlaşması ile ilişkisi bulunmaktadır. Ayrıca erken luteinizasyonun progesteron salgısı ile oosit kalitesini bozduğu ve gebeliği negatif etkilediği konusunda çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar bu hücrelerde yüksek apoptozun gebeliği negatif etkilediğini göstermiştir. Bu çalışmada kültür ortamında bırakılan kümülüs hücrelerinin apoptoza gidiş sürecinin ve luteinizasyon belirtisi olan progesteron sekresyonunun embriyo gelişimi, morfolojisi ve gebelik ile ilişkisinin incelenmesi amaçlandı. Bu araştırma Eylül 2017- Nisan 2018 tarihleri arasında Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Kliniğine başvuran herhangi bir endikasyonu olmayan 40 IVF hastası kadından alınmış olan kümülüs granuloza hücrelerinin kültürü ile gerçekleştirildi. Bu amaçla çalışma 'Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul'una sunuldu ve 2017/5-8 sayı ve 26.04.2017 tarihli etik kurul onayı alındı. Kümülüs granuloza hücre örnekleri hyaluronidaz uygulaması sonrası alındı 2 kez HTF solüsyonunda yıkandı ve 5×10^5 /ml konsantrasyonunda hücreler ekilerek sonrasında 24 saat,48 saat,72 saat,96 saat'lik periyotlarla takip edilerek apoptotik hücre oranları çıkarıldı ve HCG günü serum progesteron ölçümleri yapıldı. Bu çalışmada gebe olan grupta kümülüs hücre apoptozunun gebe olmayanlara kıyasla daha düşük olduğu, ($p=0,023$), HCG günü progesteron değerinin gebe olmayanlarda daha yüksek olduğu gösterildi ($p=0,021$). Kültürde 4. Güne kadar elde edilen verilerden apoptoz oranının gebe olmayanlarda daha yükselen bir eğilim gösterdiği ve bunun da istatistiki olarak anlamlılığı olduğu anlaşıldı ($p=0,009$). Çalışmamızda 4. Güne kadar apoptotik hücre oranının hCG günü progesteron değeri ile pozitif korelasyon gösterdiği bulundu ($p=0,001$). Bu çalışmada kümülüs hücre apoptozunun ve hCG günü progesteron değerinin klinik gebelik ve embriyo kalitesi ile ilişkisi bulunduğu anlaşılmıştır.

Çalışmanın daha geniş gruplarda ayırıcı değerlerinin (cut off) ortaya çıkarılmasında yarar görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: kümülüs hücre kompleksi, apoptozis, progesteron, embriyo gelişim kaliteleri.



2. ABSTRACT

Evaluation Of Embryo Development And Pregnancy In Ivf Patients With Apoptosis And Luteinization Process In Cumulus Cell Culture

The rapid formation of the cumulus matrix around the oocyte in the pre-ovulation period is a unique and dynamic biological event. Granulosa cells surrounding the oocyte form a cumulus oophorus. Cumulus cells play an important role in ensuring adequate nutrition and growth capacity of reproductive cells. Cumulus, granulosa and teka cells around oocytes contribute to oocyte maturation by steroid synthesis. Apoptosis occurs in the normal process of cumulus granulosa cells and cumulus apoptosis is associated with oocyte maturation. There are also studies that early luteinization deteriorates oocyte quality with progesterone secretion and negatively affects pregnancy. Studies have shown that high apoptosis negatively affects pregnancy in these cells. In this study, it was aimed to investigate the progression of cumulus cells left in culture to apoptosis and progesterone secretion, which is a sign of luteinization, the relationship between embryo development, morphology and pregnancy. This study was carried out with the culture of cumulus granulosa cells taken from 40 IVF women without any indication who applied to Bahçelievler Medical Park Hospital IVF Clinic between September 2017 and April 2018. For this purpose, the study was submitted to the uni 'Biruni University Non-Interventional Ethics Committee' ve and approval of the Ethics Committee dated 26.04.2017 and numbered 2017 / 5-8. Cumulus granulosa cell samples were taken after application of hyaluronidase, washed twice in HTF solution and cells were seeded at a concentration of 5×10^5 / ml, followed by 24-hour, 48-hour, 72-hour, 96-hour periods, and apoptotic cell rates were measured and serum progesterone measurements were performed on HCG day. In this study, it was shown that cumulus cell apoptosis was lower in the pregnant group compared to the non-pregnant group ($p = 0.023$), and progesterone value on HCG day was higher in non-pregnant group ($p = 0.021$). From the data obtained until the 4th day of culture, it was understood that apoptosis rate showed a higher tendency in non-pregnant women and this was statistically significant ($p = 0.009$). In our study, it was found that the ratio of apoptotic cells up to the 4th day showed a positive correlation with the progesterone value on hCG day ($p = 0.001$). In this study, it was understood that cumulus cell

apoptosis and hCG day progesterone levels were associated with clinical pregnancy and embryo quality.

Key Words: cumulus cell complex, apoptosis, progesterone, embryo development quality.



3. GİRİŞ VE AMAÇ

Ovaryumda 'Folikül Atrezisi' olarak bilinen işlem apoptozisdir. Hücrelerin ölümü genetik olarak belirlenmiştir. İn vitro çalışmalarda, atreziye giden foliküllerden alınan kümülüsleri olan embriyoların blastokist aşamasına ulaşmasının oldukça zayıf olduğu görülmüştür. Aynı zamanda apoptozis, korpus luteumun luteolizisini de sağlayan mekanizmadır (Lossi and Merighi ,2003). LH kendi reseptörleri üzerine etki ederek baskın foliküldeki granüloza hücrelerinin sorumlu olduğu progesteron üretimiyle sonuçlanacak olan luteinizasyon sürecini hızlandırır. Apoptozis, embriyonun implante olmasından sonra blastosöl aşamasını da içeren birçok hücresel fonksiyonu yönetir. Embriyo implantasyondan önce birçoğu farklılaşma aşamasında olan hücrelerini kaybeder (Gaud et al.,1998). Kümülüs hücrelerindeki apoptozis oranı ile oosit kaliteleri arasındaki ilişki konusundaki birçok çalışma birbiriyle tezat sonuçlara ulaşmış olsa bile bilimsel çalışmalar kümülüs hücrelerindeki apoptozis oranının kesin kabul edilmemekle beraber embriyo gelişim potansiyeli için bir işaret oluşturabileceği kanısına varmışlardır. Kümülüs hücreleri, oosit maturasyonu, sinyal salınımı ve düzenlenmesi fonksiyonları ve fertilizasyonunda kritik rol oynar (Koçyiğit ve Çevik, 2011). Oosit kalitesi, kadınların doğurganlığında önemli bir sınırlayıcı faktördür, ancak oosit kalitesini neyin oluşturduğu ya da onu yöneten mekanizmalar hakkında elde edilen bilgiler yetersiz kalmaktadır. Genellikle granüloza hücreleri (GC'ler) ve kümülüs hücreleri (CC'ler) aracılık eden yumurtalık foliküler mikro-ortam ve maternal sinyaller, oosit büyümesini, gelişimini ve oosit gelişimsel yetkinliğin kademeli olarak edinilmesini beslemekten sorumludur. Bununla birlikte, oosit-GC / CC iletişimi, CC'lerin farklılaşmasını ve işlevini yönlendirmek için yerel olarak etki eden oosit salgılayan güçlü büyüme faktörleri ile iki yönlü etki yapmaktadır. İki önemli oosit salgılanan faktör (OSF'ler), CC farklılaşması için ve CC'lerin ayırt edici fenotiplerini sürdürmeleri için gerekli anahtar genleri ve hücresel süreçleri düzenlemek için CC'lerde sinyal yollarını aktive eden büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF 9) ve kemik morfogenetik proteini 15'tir (BMP15) (Gilchrist , 2008). Bu nedenle, oositler, komşu somatik hücrelerini sıkı bir şekilde kontrol eder ve oositin uygun şekilde gelişmesi için gerekli işlevleri yerine getirmelerini sağlamaktadır. Bu oosit-CC düzenleyici döngü ve oositlerin OSF'ler tarafından kendi mikro-ortamlarını

düzenleme kapasiteleri oosit kalitesinin önemli bileşenlerini oluşturabilir. Kyu Sup Lee ve arkadaşlarının 2001 de yaptıkları bir çalışmada IVF hastalarında kümülüs granuloza apoptozu ile oosit ve embriyo kalitesi arasındaki ilişkiyi incelemişler, 40 yaş üzeri kadınlarda yüksek apoptoz bulunduğunu göstermişlerdir (Lee, 2001). Araştırmacılar kadın yaşının kümülüs hücrelerinde apoptozis insidansını etkileyebileceğini gösterdiler ve apoptozis insidansının artması oosit sayısı ile ilişkili olabileceğini ileri sürdüler. IVF-ET'yi takiben alınan döllenme oranı ve hamilelik sonucu kümülüs hücrelerindeki apoptoz oosit kalitesini, doğurganlıktaki yaşa bağlı düşüşü tahmin etmede kullanılabileceğini ileri sürdüler. Bosco L.ve arkadaşları FSH ve LH reseptör polimorfizminde kümülüs hücre apoptozunu incelediler (Bosco, 2017). Bosco ve arkadaşlarının çalışmasında kümülatif verilerin, FSHR ve / veya LHB genlerinin genetik değişikliklerinin, granuloza hücresinin hayatta kalması ve folikül gelişimine programlanmış sinyal ağının bozulmasına yol açabileceğini gösteren önemli korelasyonlar göstermekte olduğu belirtildi. Özellikle, çift heterozigotlar hastaların geri kalanı ile karşılaştırıldığında, kümülüs hücrelerinde hem DNA fragmentasyon indeksi hem de aktif kaspaz-3 miktarı açısından daha yüksek bir apoptoz düzeyi elde edildi. Araştırmacılar kümülüs granuloza apoptoz incelemesinin kişisel IVF tedavi seçeneklerinde önemli bir parametre olabileceğini gösterdiler.

Bu çalışmada amacımız, dişi gonad hücreleri oositlerin, bakıcı (nurse) hücreleri olan ve IVF hastalarından toplanan kümülüs hücreleri ile yapılan hücre kültüründe görülen apoptosis ve luteinizasyon sürecini takip etmek ve bu süreçlerin ICSI işlemi sonrası embriyo gelişimlerini ve gebelik oranlarına etkilerini takip etme sürecine bağlı bir çalışma örneği sunmaktır. Kümüls hücre kültüründe apoptosis ve luteinizasyon sürecinin IVF hastalarında embriyo gelişimi ve gebelik açısından değerlendirmek, gelişim üstündeki pozitif ve negatif etkileri ortaya çıkarmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.Ovaryumun Yapısı ve Anatomisi

Ovaryum, endokrin ve ekzokrin olmak üzere iki tür salgı yapabilen ve histolojik olarak; hafif düz ve oval şekilli yaklaşık 4 cm uzunluk, 2 cm genişlik ve 1 cm kalınlığında olan bir yapı gösterir. Pelvik boşluğun duvarı, uterusun her iki yönünde ve mezoovaryum ile her biri bir kenara tutunmuş olarak görülür (Leeson, 1988).

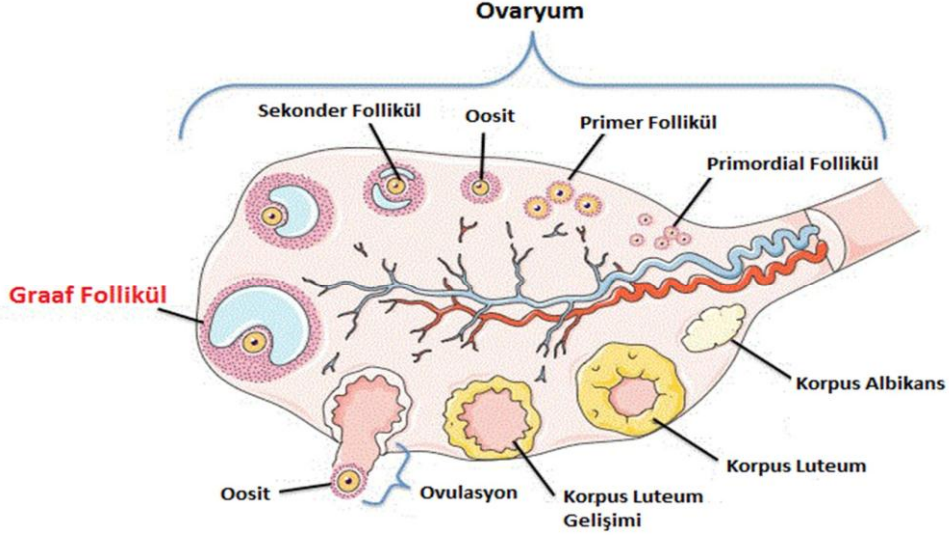
Ovaryum; dışta korteks ve içte bulunan medulla bölümlerinden oluşur, ovaryumu ihtiva eden bu iki bölgenin sınırı tam olarak bilinmemekle birlikte yüzey epitelinde yerleşmiş olan yoğun fibröz yapıdaki tunika albuginea ve ovaryumu tümüyle saran korteksin kalanı sarmal yapıyla düzene oturmuş, hücreden oldukça zengin bağ doku yapısı halindedir (Ovalle, 2009 and Nahirney, 2009).

Dışta yer alan korteks; stroma içine gömülü foliküllerin yer aldığı ve foliküller arası bağ dokunun yani stromanın yer aldığı alandır. Kalınlığı ise puberteden sonra artış gösterir ve bu durum süreklilik gösterir (Kalaycı, 1986).

Maturasyonun ve dejenerasyonun farklı aşamalarında, oositleri içeren farklı boyutlardaki ovaryum follükülleri bu alanda bulunur. Ovaryum korteksinde primordial follüküllerin çok fazla sayıda görüldüğü aşama çocukluk çağlarıdır; ergenlikten sonra menstrual döngülü kadınlarda ovaryum korteksinde follüküllerin yerini korpus luteumlar alır ve sayıca çok fazladır (Ovalle,2009 and Nahirney, 2009).

Ovaryum medullası; içte bulunur, damar yapısından oldukça zengin bağ dokusu yapısında ve Hillus dışında yer alan kısmında korteksle çevrilidir (Kalaycı,1986).

Sınırları belirgin olmayan medulla kısmı yüksek miktarda kan dolaşımı yapan damar yapısı, sinirler ve gevşek bağ dokusu lenfatiklerinden oluşmuştur (Ovalle,2009 and Nahirney, 2009).



Şekil 1: Ovaryum histolojik yapısı

(<https://www.repropeedia.org/sites/repropeedia/files/ovulationfinal.jpg>)

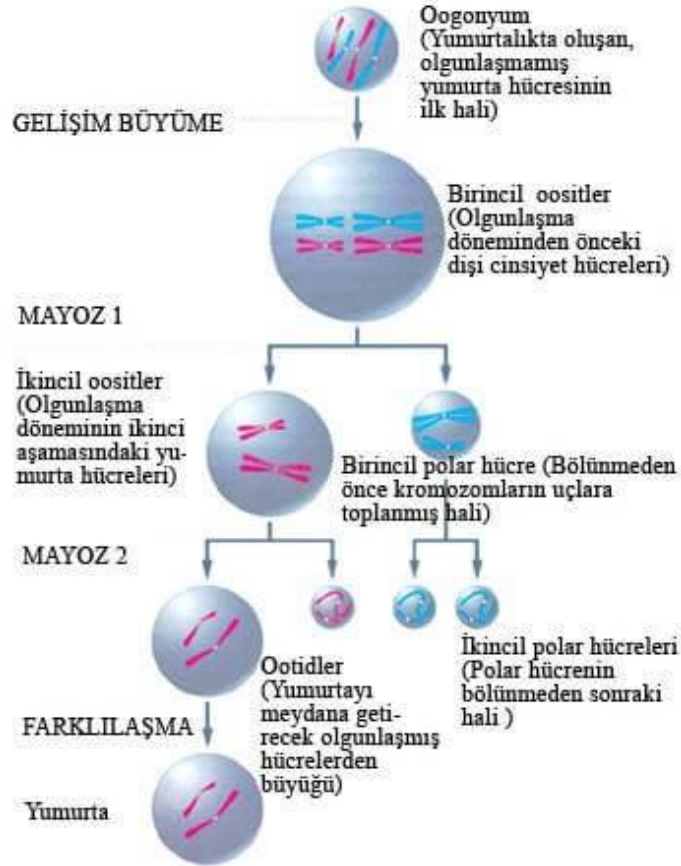
4.2. Ovaryumun Embriyolojisi

Embriyolojik gelişimin başlangıcı karın arka duvarında yer alan mezodermden gelişen ürogenital çıkıntıdan kökenlenir. Primordial germ hücreleri geliştikleri vitellus kesesinin endoderminden hamileliğin 6.haftasında; ürogenital kabartıya doğru göç başlatırlar.

Primordial germ hücreleri; barsak endodermi ve vitellüs kesesinden kökenlenir. PGH'lar dişi gonadına ulaşınca oogoniumlara yani öncül oositlere dönüşür ve mitoz bölünmeyle çoğalacak olan oogoniumlar ovaryen farklılaşmayı başlatır ve gebeliğin 16.- 20. haftalarında yaklaşık 6-7 milyon aralığında oogoniaya farklılaşırlar. Bir küme içinde yer alan oogoniumların tümü tek bir üreme hücresinden gelişirken, folikül hücreleri olarak bilinen oogoniumların çevresindeki yassı epitel hücreleri overin yüzey epitelinden köken alırlar (Gougeon,1994 and Sadler, 2000).

Oogoniumlar ovaryumun korteks alanı içinde yer alır ve embriyonik gelişim dönemi boyunca mitoz bölünmeyle hücrel artış 5.ay boyunca devam eder. Bu

süreçte her bir ovaryum yaklaşık 4 milyon oogonium içerir. Fetal dönem 3.ayının başlangıcında bazı oogoniumlar 1. mayoz bölünmenin profazında tutulmaya girerler ve primer oositleri oluştururlar. İnsan fetusunda bu dönüşüm gebelik süresinin 7. ayına kadar tamamlanır. Bu süreçte birçok primer oosit gerilemeye uğrar ve dejenerasyon sonucu foliküller kaybolur (Sadler, 2000).



Şekil 2 : Oogonium farklılaşma evreleri

(<http://www.biyolojidersnotlari.com/mayoz-ve-eseyle-ureme-biyolojidersnotlari.html>)

4.2.1.Ovulasyon

Folikül maturasyon süreci tamamlanınca, foliküldeki genişlemeden dolayı önceki durumdan daha fazla sıvı salgısı artar ve bu durum etrafı kümülüs hücreleriyle çevrili fertilizasyon yeteneğine sahip oositin overden atılmasını işaret eder (Cihangir, 2009).

Ovulasyonda uyarıyı, büyüyen foliküllerin tetiklediği kandaki yüksek östrojen düzeyine cevap olarak oluşturulan beyinde bulunan hipofiz ön lobundan salgılanan lüteinizan hormon (LH) ani bir artışla zirve yapar (Voss and Fortune, 1991).

Fetal dönemde mayoz 1'in profazında tutulmuş olan oositler ovulasyondan hemen önce mayoz 1'i tamamlar. Bu aşamada kromozomlar eşittir ve sekonder oositlerden bir tanesi 1. kutup cismini oluşturur. Atılan 1. kutup cismi nükleus ve az miktarda sitoplazma içeren küçük bir hücredir. İlk kutup cismi atıldıktan sonra oositin nükleusu 2. mayoz bölünmeye başlar ve bölünme metafaz aşamasında duraksar. Ovulasyon sonucunda genelde bir ovum atılır. Bazı durumlarda iki ya da çok nadir olarak daha çok ovum ovulasyona uğrayabilmektedir. Serbest hale gelen ovum genellikle fallop tüplerinde döllemenin görüldüğü bölgeye doğru gider ve fertilizasyon potansiyeli 12 saat sürer, her insanda ovulasyon süreci ortalama 28-29 günde bir tekrar eder (Leeson, 1988).

4.2.2. Oosit gelişimi

Primer oosit etrafındaki yassı epitel hücreleriyle beraber primordial folikül olarak anılır ve "PF" ler immatür ovumu oluşturur. İrice bir nükleolus ve oldukça geniş veziküler bir nükleusa sahip oosit sferoid yapıda bir hücredir. Sitoplazması opak ve granüler ve etrafını saran foliküler hücrelerin tek tabakası bazal bir lamina ile ovaryum'un stroma kısmından ayrılır (Leeson, 1988).

Yassı foliküler hücreler ilk önce kübik ve sonrada kolumnar şekline gelir. Bu hücreler granüloza hücrelerinden meydana gelen stratum granülozumdur. Ovumun çevresinde aktif bir bölünmeyle genişleyerek çok katlı bir tabaka halini alırlar. Böylece tek tabakalı "PF" çok tabakalı "PF" ye dönüşmüş olur. Oositler kalın ve

düzensiz bir örtü görevini üstlenen zona pellusida ile çevrili olup bu katman üç farklı glikoprotein ihtiva eder. Folikül hücrelerin uzantıları ve oosit mikrovillusları, zona pellusida içinde uzanır ve birbirleriyle olan bağlantıları aracılığı ile iletişim kurma eğilimindedirler.

Foliküller granüloza hücrelerinin artışıyla büyüyüp kortikal bölgenin daha alt bölümlerinde yerleşim göstermek amacıyla göç ederler (Junqueira, 1998).

Stratum granülozum yaklaşık 12 tabakaya ulaştığı zaman, foliküler tabakanın iç tarafında “antrum” adı verilen boşluk dahil olmak üzere foliküler sıvı ile düzensiz küçük boşluklar doldurulmaya başlar. Foliküllere de antral folikül ya da sekonder folikül adı verilir.

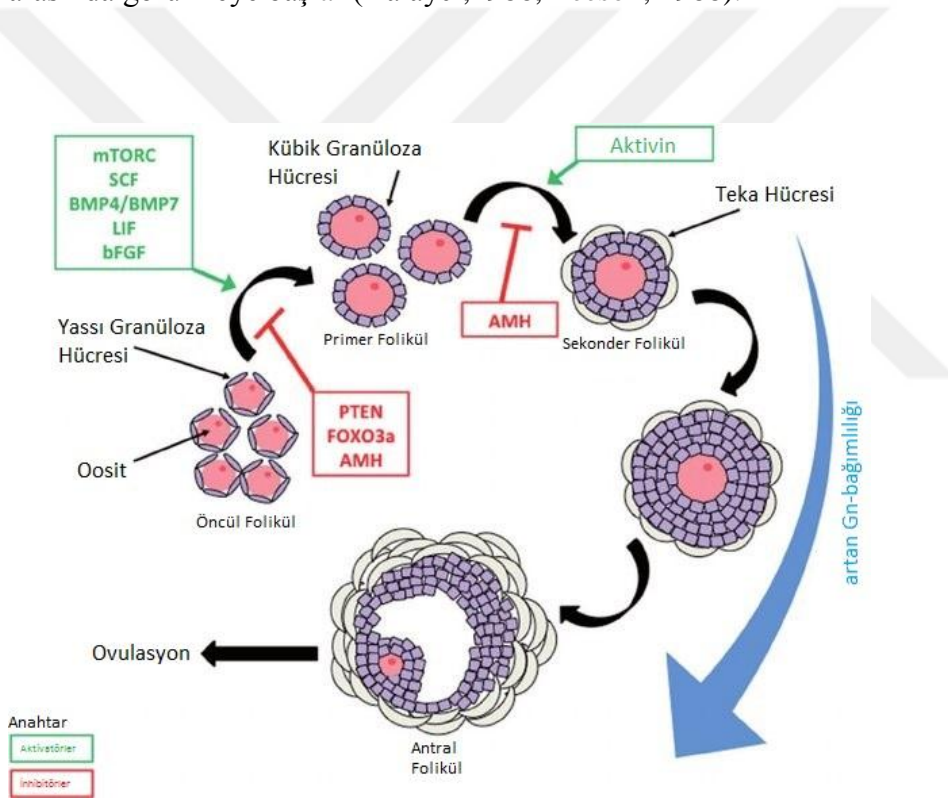
Folikül sıvısını; glikozaminglikanlar, steroid – bağlayıcı proteinlerle birlikte yüksek konsantrasyondaki hormonlar (progesteron, andojen, östrojen) oluşturur. Etrafı granüloza hücresi ile çevrelenmiş ovum, antral boşluğun bir kenarında ovulasyona hazır olacak şekilde bekletilir. Bu yapı ise kümülüs ooforus olarak tanımlanır. Oosit ve kümülüs ooforus birlikte kümülüs oosit kompleksi (KOK) diye tanımlanır (Leeson, 1988).

Bir grup granüloza hücresi oositin çevresinde yoğunlaşır ve korona radiata oluşturur. Bu granüloza hücreleri ovaryumdan ayrılan oosite eşlik eder. Korona radiata hücreleri ovumun hücre membranı ile temas halindedir ve zona pellusida boyunca uzanır. Ayrıca ovumun mikrovillusları zona pellusida içine doğru uzanır. Granüloza hücrelerinin oluşturduğu epitel hücreleri antrum boşluğunun çevresinde düzensiz tabakalar halinde uzanır. Granüloza hücreleri arasında yoğun boyanan küçük yığınlar görülür (Leeson et al., 1988, Junqueira et al., 1998).

Folikülün hemen yanındaki stromada yer alan epitel hücrelerinin, aralarında glikoprotein yapısındaki ara maddenin yer aldığı, fibroblast hücreleri teka folikülünü oluşturmak üzere farklılaşma gösterirler. Bu katmandan oluşan yapılar sonraki aşamalarda teka interna ve teka eksterna olarak farklılaşır. Teka interna; hücre ve damar yapısından zengin sekonder folikülü dıştan saran ve bağ dokusundan köken aldığı halde epitel hücre karakteri gösteren hücresel yapıdır. Genelde poligonal şekilli, steroid yapısındaki hormonları sentezleyen hücrelere ait organel yapısını kazanarak östrojen hormonu sentezler. Zengin damar yapısında oluşu endokrin organ olma özelliğine uygun bir durumdur (Kalaycı,1986, Junqueira, 1998).

Teka eksterna ise kollojen fibrillerden ve şekilsiz hücrelerden oluşmuş bir bağ dokusu yapısındadır ve hormon salgılama özelliğine sahip değildir. Teka eksterna perifer hattında ovaryum stroması ile buluşur (Leeson, 1988).

Her menstrual siklusta bir folikül diğerlerinden daha fazla büyüme gösterir yani 10-14 gün içerisinde olgunlaşmasını sonlandırır. Olgun folikül ya da graaf folikül olarak isimlendirilen folikül son derece büyük olup, ovaryum yüzeyinden dışarıya doğru bir çentik yapıp folikül sıvısı ile genişleme gösteren antrum, stratum granulozuma bağlıdır. Ovum boyut olarak maksimuma ulaşır ve dıştan kalın bir zona pellusida ve korona radiata ile sarılmış hale gelir. Folikül maturasyonu sağlandığı zaman düzensiz küçük boşluklar folikül sıvısı ile dolar ve korona radiata hücreleri arasında görülmeye başlar (Kalaycı,1986, Leeson, 1988).



Şekil 3 : Antral folikül gelişimi, primordial folikül havuzu

Gonadotropinlerden bağımsız olarak primer ve sekonder foliküllerde gelişir, ancak aktive edici (yeşil kutu) ve inhibe edici (kırmızı kutu) faktörlerle işlem yakından düzenlenir. Sekonder bir folikülden antral foliküle doğru büyüme giderek artan gonadotropine bağımlıdır, yumurtlama tamamen gonadotropine bağımlı olarak gerçekleşir (Dunlop,2014).

4.2.2.1.Maturasyon sürecinin klinik açıdan değerlendirilmesi

Değerlendirmede human chorionic gonadotropin (hCG) hormonunun verildiği zaman oosit maturasyonunu belirleyen foliküllerin çapı ve aspire edilen sıvı miktarı önem kazanır.

Ovulasyon öncesinde oositler folikül içinde çevreleri kümülüs ve granüloza hücreleriyle sarılı olarak korunur. Bu aşamada; kümülüs oosit kompleksi (KOK) adıyla anılan bu yapıyla, oosit arasında minimal bir hücresele ilişki bahsedilir. En iç tabakada korona radiata hücreleri, zona pellusida üstünden sitoplazmaya penetre halde ve gap junctionların yardımıyla oosit membranı ile ilişki kurarak kümülüs hücreleri oosit içine metabolitlerini göndererek inhibisyon ve aktivasyonun düzen akışından sorumludur (Sirard and Blondin, 1996, Soom and Kruif, 1996).

Ovulasyondan tahmini 4 gün önce (doğal siklusta LH piki; stimüle edilen siklularda hCG hormonu enjeksiyonu öncesinde) E2 seviyesi yükselerek kümülüs hücrelerinde miktar olarak artış görülür. Bu aşamada belirgin bir çekirdekçiğe sahip hücresele çekirdek germinal vezikül halinde merkezde görülür. Doğal siklularda ya da stimüle edilen siklularda hCG enjeksiyonundan sonra germinal vezikül periferde doğru hareket eder ve 22–25 gün içinde germinal vezikül oluşumu tamamlanır. Metafaz I (M I) den yaklaşık 4 saat sonra kromozomlar metafaz plağı boyunca dizilerek sonrasında kutuplara doğru hareket eder. 34 saat geçtiğinde birçok oosit M II' safhasına ulaşır. Bu esnada I. Kutup hücresi atılarak kromozom sayısı yarıya iner. Sonrasında II. Mayoz iğ ipliğinin oluşumu gözlenir. Kümülüs ve korona radiata hücrelerindeki genişleme ise çekirdek maturasyonunun arkasından gerçekleşir (Gaud et al., 1998).

IVM uygulamalarında; kümülüs hücreleri Hyaluronidase işlemi görmeden hücre kültüründe bekletilen oositlerdeki nükleer maturasyonunun, enzim işlemi görmüş oositlere göre daha yüksek oranda geliştiği gözlenmiştir (Yuta, 2014).

Kümülüs hücreleri, sitoplazmadan türevlenen çıkıntılarıyla zona pellusidayı aşarak oosite ulaşırlar ve oosit maturasyonu için gerekli olacak ortam şartının bir bölümünü destekler. Kümülüs hücreleri; endokrin ve parakrin olmak üzere çift yönlü özellik gösterirler (Russel,2006 and Salustri, 2006).

Oositlerin maturasyon aşamaları polar cisim ve germinal vezikül taşıma durumuna göre değerlendirilir.

Maturasyonunu Tamamlamış (Matur) Oosit (MII): 1. polar cisimciğin mevcut olduğu germinal vezikülün kaybolduğu aşamadır. Olgun oosit çevresindeki kümülüs ve korona radiata hücreleri ışık demeti oluşturarak, zona pellusidanın kesin olarak görülmesine imkân verir.

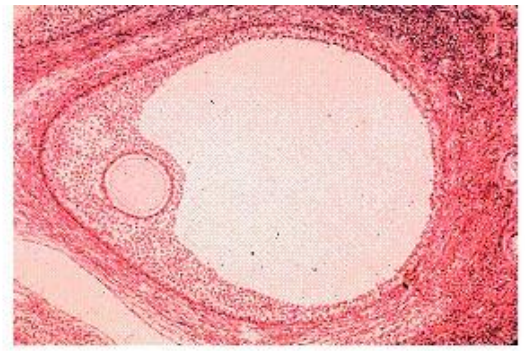
Ara Fazda Seyreden (Intermediate) Oosit (MI): 1. polar cisimcik ve germinal vezikülün yani her ikisinin de gözlenmediği aşamadır. Kümülüs hücrelerinin dağınık ve korona radiata hücrelerinin de parsiyel dağılma gösterdiği, immatur oositlere göre ise tüm bu hücresel yapıların biraz daha açılmış görüldüğü aşamadır.

Olgunlaşmasını Tamamlamamış (Immatur) Oosit (Profaz I): Germinal vezikülün olduğu ama 1. polar cisimciğin görülmediği aşamadır. İmmatur oositlerde etrafını saran kümülüs hücreleri açılmamış halde görülür. Ortalama 7s'lik inkübasyon sonrasında tekrar değerlendirmeye alınırlar.

İleri Olgunlaşma Gösteren (Postmatur) Oosit: 1. polar cisimciği içeren fakat kümülüs hücrelerinin dağınık ve seyrek görüldüğü, korona radiata hücrelerinin ise yaygın ve az görüldüğü aşamadır. Bu gruba dahil oositlerin inkübe edilip gözlenmelerine gerek yoktur (Lindner et al., 1988).



Antral Folikül



Graff Folikülü

Şekil 4 : Oosit maturasyon aşamalarında antral ve graff folikül

([http://tipeu.cumhuriyet.edu.tr/Donem2/V.Komite\(EndokrinKomitesi\)/Histoloji/preparatlarek/Graff.gif](http://tipeu.cumhuriyet.edu.tr/Donem2/V.Komite(EndokrinKomitesi)/Histoloji/preparatlarek/Graff.gif))

IVM uygulamalarında MI oositlerin maturasyonları yaklaşık 1-24 saat zaman alabilir. Immatur ve MI oositlerinin fertilizasyon yeteneklerinin olmaması gebelik oranlarının düşmesine sebep olduğundan bunların IVM' leri daha pozitif hale getirilirse YÜT'ün başarısını artırması aşikardır. İnsemine oositin maturasyonu ile gebelik oranlarının artışı arasında doğru bir orantı vardır. Günümüzde in vitro fertilizasyon (IVF) tedavilerinde kullanılan oositler ise MII yani matur oositlerdir (Lopata,1988).

4.2.2.2.Nükleus maturasyonu

Nükleus maturasyonun tetikleyicisi LH hormonudur ancak maturasyonun devamını sağlayan östrojen başta olmak üzere diğer steroid hormonlardır. Profaz I'de görülen germinal vezikül (GV) aşamasındaki oositlerden başlayan maturasyonda ki ilk aşama hücre çekirdek zarının parçalanmasıdır. Bu olay, LH uyarısı ile başlar ve takiben de iğ iplikçiklerinin oluşumu, kromozomların yoğunlaşması, homolog kromozomların metafaz plağı üzerine yerleşimi izler. Birbirini izleyen I. mayotik süreç sonunda asimetrik sitokinezis başlar ve sekonder oosit ve 1. polar cisimcik gelişir. II. Mayotik süreç İnterfaz evresinin başında başlar. Ovulasyon, II. mayoz bölünme metafaz-II evresinde görülen duraksama sırasında gerçekleşir. II. mayoz bölünme spermatozoon penetrasyonu ile tamamlanmış olur (Anwar and Moussa, 2002, Ross and Pawlina, 2006). Sonuç olarak, oluşan iki hücreden biri sitoplazma açısından daha zengin olan gerçek oosit, ikinci hücre ise; mitokondri, ribozom ve kortikal granüllere sahip fakat sitoplazma yönünden daha zayıf olan ve 2. polar cisim adıyla tanımlanan hücredir (Akyol, 2007, Galiani et al., 2006).

4.2.2.3.Sitoplazmik maturasyon

Perivitellin aralık, birinci kutup cismin oluşmasıyla birlikte genişler ve şekillenir. Mitokondrilerin sayısında artış olur ve yapısal değişimleri gerçekleşir.

Kortikal granül golgi komplekslerinden salınmaya başlar ve ooplazma granüllü bir hal alır. Periferik konumlarından dolayı mitokondriler sitoplazmik maturasyon sürecinde önemli bir role sahiptirler. Mitokondriler, hücre içi metabolik olaylarda, hücre proliferasyonunda hücre farklılaşmasında etkilidirler (Anwar and Moussa, 2002). Başarılı bir fertilizasyon olması için gereken ana etmenler; oosit ve foliküllerdeki büyüme, kromozom düzenlenmesi ve ovulasyon sürecinin eşzamanlı ve senkronize bir biçimde gerçekleşmesidir. Metafaz destekleyici faktör (MPF) bu noktada önemli bir rol oynamaktadır. MPF, oosit olgunlaşmasını tetikleyen bir faktördür. Germinal veziküllerdeki genişleme, kromozomlarda ki yoğunlaşma ve iğ iplikçiklerinin oluşması gibi bir dizi olayın sorunsuz başlamasında önemli bir role sahiptir (Sadler, 2005). Zona pellusida ile çevrelenmiş primer oositin mayoz profazını erken tamamlamasını engellemek için bir mekanizma gerçekleşir. Bu mekanizmada OMI (oosit maturasyon inhibitörü) folikül hücrelerinden oosite geçer. OMI, bir foliküler hücre proteinidir. Foliküler hücrelerin ince sitoplazmik bağlantıları zona pellusidayı geçerek oositin plazma membranı ile gap junctionlar aracılığı ile bağlantı kurar. Oositin spontan mayoz olgunlaşmasına girmesini engeller. Ovulasyondan hemen önce, mayotik profazın tamamlanmasını uyarmak için, oosit kendisini maturasyonu başlatan faktör ile aktive eder. MPF (cdc2-siklinB kompleksi), (maturasyon başlatan faktör) 1.metafaz evresinden önce çekirdek zarının yıkımını uyarır. MPF etkisi ile birinci kutup cismi oluşur (Kierszenbaum, 2006).

4.3.Kümüllüs Hücrelerinin Görevleri ve Etkileri

Ovulasyon öncesinde; gonadotropinlerin (sperm ve yumurta üretmek için testis ve ovaryumu uyarma kapasitesine sahip büyüücü hormonlardır) kandaki seviyelerin de görülen yükselmeye cevaben, kümülüs hücreleri “Hyaluronik Asit” üretimine başlayarak oosit mayoz bölünmesine devam eder. Ovulasyon öncesinde kümülüs hücreleri koordinasyon ve zamanlamayı sağlar, ovulasyondan sonra sperm ile oosit buluşmasını sağlar ve ovulasyon öncesi dönemde oositlerdeki maturasyonu destekler (Cihangir, 2009).

Kümüllüs hücrelerine ait yüzey alanı artırıcı mikrovillus ve sitoplazmik uzantılar zona pellusida üzerinde oosit sitoplazmasının zarına ait mikrovillusları ile

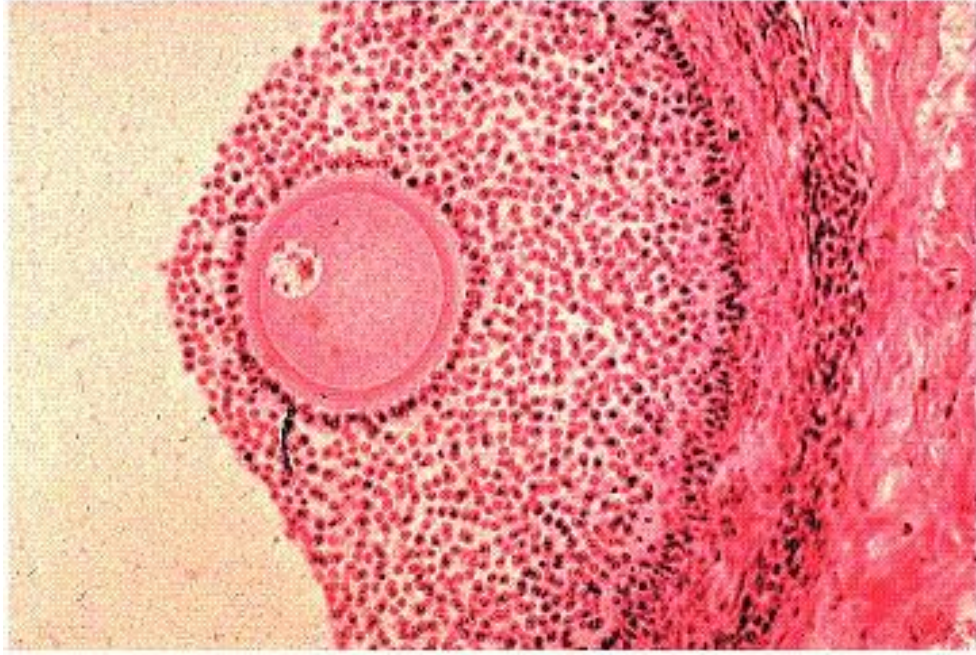
geçit bağlantı (gap-junction) ve desmozom tipi bağlantı yollarıyla oosit içine en küçük moleküllerin (proteoglikanların) ve kendi salgıları olan eser miktardaki gonadotropinlerin taşınmasını sağlar. Bunun yanında reseptör artışını tetiklemek amacıyla östrojen, progesteron ve az miktarda androjen salgısında artışa yol açarak, bunun yanında insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) salgırlar.

Kümüls hücreleri, kültür mediumlarının pH'ını stabil tutarlar, istenmeyen maddeleri (oksidatif ajanlar, hypoksantin vb. gibi) uzaklaştırırlar. Bununla birlikte embriyo gelişimini destekleyen gerekli maddeleri ortama vermekle birlikte, ürettikleri steroid ve proteinlerin erken dönem embriyoları üzerinde olumlu etkisi olduğu düşünölmektedir (Fabbri et al., 2000).

Ovulasyon ve fertilizasyon süreçlerinin başarısı kümüls hücre matriksiyle doğrudan ilişkilidir. Ayrıca gelişimin, oositin büyüme kapasitesi ile bağlantılı olduğu, genlerin oosit ve kümüls hücreleri arasındaki etkileşimi koordine ettiği anlaşılmıştır (Russel,2007 and Robker, 2007).

Kümüls ooforus ve granüloza hücrelerinin IVM' de yapılan oosit maturasyonu üzerinde pozitif etkilerinin olduğu ve KOK hücre kompleksinin oosit maturasyonunda direkt, matriksinde hücreler arası sinyal yolları üzerinde önemli rolleri olduğu yapılan çalışmalarla vurgulanmıştır. Salgıladıkları büyüme hormonlarıyla kümüls hücreleri, oositin gelişimine reseptörler aracılığı ile etki etmektedirler (Hampl and Eppig, 1995).

Kümüls hücreleri oosit gelişimini farklı aktivatör ve inhibitörlerin devreye girmesiyle birçok açıdan etkiler. Bu sebepten kümüls hücre kompleksinin yapı identifikasyonu önem kazanır (Hernandez-Gonzalez et al., 2006).



Şekil 5 : Kümülüs Oophorus

([http://tipeu.cumhuriyet.edu.tr/Donem2/V.Komite\(EndokrinKomitesi\)/Histoloji/preparatlar/preparatlar_ek.htm](http://tipeu.cumhuriyet.edu.tr/Donem2/V.Komite(EndokrinKomitesi)/Histoloji/preparatlar/preparatlar_ek.htm))

4.4.Kümülüs Hücrelerinin Oosit Maturasyonuna Etkileri

Yapılan çalışmalarda kümülüs hücrelerindeki maturasyon etkisi araştırıldığında Hyaluronidaz işlemi görmüş oositlerde ya maturasyon gerçekleşmemiştir ya da düşük düzeyde olduğu görülmüş, Hyaluronidaz işlemi görmemiş oositlerde ise IVM oranlarının çok daha yüksek olduğu anlaşılmıştır (Younis, 1989).

Oositle çevre arasındaki ilişkiyi sağlayan temel hücresel alan kümülüs hücreleridir, maturasyon için kilit bir rol üstlenen LH, düzenleme görevini kümülüs hücrelerini etki altında tutarak yapmaktadır. Aynı şekilde mayotik maturasyon süreci ve kümülüs hücre indüklenmesinde görev alan epidermal büyüme faktörlerinin (EGF) pozitif etkisi kümülüs hücrelerinin varlığıyla açıklanmaktadır (Soom ve Kruif, 1996).

Sığır oositleriyle yapılan çalışmalarda sitoplazmik ve nükleer maturasyonun, kümülüs / granüloza hücreleri tarafından uyarıldığı ve yine bu hücrelerin varlığının döllenme oranlarını ve ilerleyen günlerdeki embriyo gelişim potansiyelini artırdığı saptanmıştır (Buccione, 1990, Greve, 1993).

4.4.1.Yardımla üreme tekniklerinde sağlıklı oosit değerlendirmesi

YÜT'ün genel anlamda başarısı; yeterli sayıda olgun oosit varlığı ve gelişen sağlıklı embriyoların elde edilmesine bağlıdır. Ovulasyondan önce toplanan oositlerin mayotik bölünme aşamalarının MII yani "matür (olgun)" olması, normal döllenme ve embriyonik gelişim başarı şansını belirleyen en can alıcı noktası olduğu kabul edilmiştir.

Oositin gelişme yeteneğine sahip olması, mayotik gelişim programını yeniden başlatması ve tamamlaması, döllenmeyi başarabilmesi ve embriyonik gelişimi sağlayabilmesi in vitro gelişimini etkileyen en önemli faktörlerdir.

Bu tür gelişim yeteneğinde; kümülüse ait morfoloji, foliküllerin büyüklüğü ve kalitesi, ovaryum stimülasyonu ve kültürden önce yürütülen protokoller olmak üzere etkili 5 temel faktör sayılabilir.

Granüloza hücreleriyle alakalı bilinen en temel gerçek; salgıladıkları gonadotropin reseptörler aracılığıyla oositlerin IVM'inde pozitif etkilerinin olduğunun bilinmesidir (Sirard and Blondin, 1996).

Çekirdek maturasyonu ile eş zamanlı yürüyen süreçler; sitoplazma maturasyonu ve oosit aktivasyonudur. IVM için kültür sistemlerinin başarısı birbirinden farklı parametrelere bağlıdır. Oositlerin IVM'i kümülüs-korona-oosit bütünlüğünün tüm elemanlarının birlikte yürüttüğü morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal etkileşimlerin bir sonucu olma özelliğindedir (Cihangir, 2009).

Kümülüs hücrelerinin en önemli etkisi şüphesiz ki nükleus maturasyonu ve ileri dönem gelişim kapasitesi üzerindedir. Çünkü hyaluronidaz işlemi gören oositlerde saptanan IVM' nun zayıf olması, hücre için gerekli besin maddelerinin oosite ulaşmakta zorlandığı sonucunu akla getirmektedir.

Oositlerdeki kümülüs hücreleri tarafından tetiklenen protein senteziyle, özellikle steroid salınımında artış görülür. Spermle karşılaşan MI oositin sitoplazma maturasyonu daha hızlıca tamamlanır. Tüm bu seri olaylar “oosit aktivasyonu” olarak tanımlanan bir dizi süreçtir (Leeson et al., 1988).

4.5.Dişi Üreme Sistemini Kontrol Eden Hormonlar ve Etkileri

Ovaryum, östrojen ve progesteron hormonu salgılarıyla, dişi genital sisteminin tüm organları üzerine etkisi olan, menstrual döngüyü düzenleyen üreme sistemi elemanıdır.

Erginlik döneminden başlayarak, ovaryumlarda bir kısım PF’de foliküler büyüme olarak bilinen dönem başlar. Bu dönem süreci oositleri, granüloza hücrelerini ve foliküllerin etrafını saran stroma hücrelerinde ki değişimleri de içine alır. Bu konuyla alakalı yapılan bilimsel çalışmalar ışığında büyüme sürecinde ki foliküllerin, çok sayıda PF arasından seçilimine dair kesin bilgiler halen ortaya konmamıştır (Lindner et al.,1988, Koyabashi et al., 1991).

Genital dönüşüm süreciyle başlayan ovaryuma ait değişiklikler, tümüyle hipofizin ön lobundan salgılanan gonadotropin hormonlardan, folikül stimüle hormon (FSH) ve LH’in salınımına bağlıdır. Ovaryumların inaktif olmasının nedeni gonadotropin hormonlarıyla uyarılmamasından kaynaklanır. (Kayaalp, 2000).

Dişilerde en önemli 2 gonadotropinden; FSH ve LH’in salınmaya başladığı yaş aralığı 9-10’dur, 11–16 yaşlarında ovaryum döngüsü başlar ve bu iki hormon en yüksek düzeyine ulaşır. Dönemsel olan bu farklanmanın adı "puberte” olarak bilinir (Carson et al., 1986).

4.5.1.Folikül stimulan hormon (FSH)

Gonadotropinlere bağımlı olarak gelişen oosit ile artış gösteren östrojen yapımı birbirlerine uyum gösterir. Öncül antral foliküllere ait granüloza hücreleri, steroid hormonları sentezler fakat östrojeni çok daha fazla yapabilmektedir. FSH

hem granüloza hücrelerinden indüklenen östrojen yapımını başlatır aynı zamanda büyümelerinde stimulan görevi görür (Young et al., 1992).

FSH; granüloza hücrelerinin büyümesinde hem de farklılaşmasında etkili olan hormondur. Primer, sekonder, antral foliküllerde var olan granüloza hücrelerinde ve PF' lerde ki oositlerde FSH reseptörlerinin ve FSH reseptörlerinin sentezinden sorumlu genin var olduğu ve minimal foliküllerin gelişimi için yeterli seviyede FSH'nın ve E2'nin gerekli olduğu çalışmalarla desteklenmiştir (Hurk et al., 1997).

Ovaryumlardan salgılanan E2 ve progesteron miktarlarının kendileri üzerine de etkin oldukları bilinmektedir. Ovaryumda bulunan E2 ve progesteron reseptörlerinin dağılımlarını ve düzenlerini belirtmek için immünohistokimyasal analiz yöntemlerinden yararlanır. Yapılan bilimsel çalışmalar da E2 ve progesteron reseptörlerinin içinde buldukları foliküle ait granüloza hücrelerinde işaretlendiği bilinmektedir (Iwai et al., 1990).

FSH reseptörlerinin varlığıyla, preantral granüloza hücrelerinde foliküller kendi östrojenik mikroçevresini inşa eder (McNatty et al., 1979). Bu nedenden dolayı östrojen üretimi FSH reseptörlerinin içeriğiyle sınırlandırılır. FSH ve östrojen oluşturduğu koordinasyonlu çalışma sırasında granüloza hücreleri sinerjik mitotik etki yaparak büyümeyi uyarır.

Kümüls hücreleri ovulasyon öncesi gonadotropin salınımı sonrasında kendilerine has değişiklikler gösterir. Bu esnada FSH; kümülüs hücre kompleksinde hiyalüronik asit üretimini arttırarak kümülüs ooforus'un maturasyonunda önemli rol oynadığı varsayılmaktadır.

Ovulasyon öncesi dönemde granüloza hücrelerinde ki FSH ve LH hormonlarının reseptör sayısı artar ve folikül poliferasyonu uyarılır (Beck, 1989).

4.5.2.Lüteinizan hormon (LH)

Olgulaşan folikülün çatlamasını ve ovumun dışarı atımını sağlayan hormon LH'tir. Ayrıca LH hormonu corpus luteumdan salınan progesteron sürecini stimüle eder hem de plazma ve antral sıvı içinde LH'ın erkenden yükselmesi durumunda granüloza hücrelerindeki mitotik etkinlik azalırken, dejeneratif değişiklikler

başlamakta ve folikül içinden salınan androjen düzeyleri artmaktadır (Atabekoğlu, 1998).

LH hormonu birebir kendi reseptörleri üzerine etki ederek dominant foliküldeki granüloza hücrelerinden progesteron salınımı ile sonuçlandığı luteinizasyon sürecini hızlandırmaktadır. LH'nin ani artışı, oosite ait mayoz bölünmenin yeniden başlamasını, granüloza hücrelerinin luteinizasyon sürecini, kümülüs hücrelerindeki poliferasyonu ve folikül rüptürü için ihtiyaç duyulan prostaglandinlerin sentezini yönetir. Foliküldeki progesteron düzeyi LH'nin ani artışıyla ovulasyon zamanına kadar artmaya devam etmekte, LH zirve yaptığı esnada E2 seviyeleri düşüş gösterir.

Teka hücrelerinden LH salınımının etkisi ile salgılanan androjenler (testosteron ve androstenedion) granüloza hücrelerine taşınarak ve FSH hormonunun aromataz enzimlere etkisi ile burada östrojenlere dönüşür (Dujikers et al., 1997).

4.5.3. İnsan koryonik gonadotropini (HCG)

IVF döngülerinde LH artışını taklit etmek için hastaya HCG verilir. Bu tedavide amaç LH'ı taklit ederek son follüküler maturasyonu tamamlamasıdır (Enien et al., 1995).

Maturasyon süreci içerisinde; Östrojen hormonu granüloza hücrelerinin FSH ve LH'ya olan hassasiyetlerini artırır. Sonuç olarak granüloza hücrelerinde bazı farklılaşmalar baş gösterir (Enien et al., 1995).

4.5.4. Progesteron

Yumurtlama hormonu olarak ta bilinir, hamile kalmada ve adet sürecinde önemli rol oynayan hormonlardan bir tanesidir. Yumurtlama dönemi sonrasında yani adet döneminin ikinci yarısında salgılanan, kadınlık hormonudur. Yumurtlamadan önce, progesteron seviyeleri çok düşüktür, hemen sonrasında yükselir. Yumurtanın

döllenmesi sağlanınca progesteron hormonu, rahmin astarındaki (endometriyum) kan damarlarının büyümesini uyarır ve erken evre embiryoyu besleyen dokuları aktive eder. Progesteron, döllenmiş yumurtanın büyümesine katkı için rahim dokusunun kaplanmasını sağlar ve gebelik boyunca rahmin korunmasına yardımcı olur.

Progesteron, korpus luteumdan salgılanır, kanda büyük oranda proteinlere bağlanarak taşınır, böbrek üstü bez ve plasentadan da salgılanır; yumurtlamadan önce, progesteron 10ng / ml'nin çok altındadır ve yumurtlamadan sonra 10ng / ml'nin çok üzerine çıkar.

Yumurtlama işleminin sonrasında bir sonraki adet dönemine kadar süre 'luteal faz' olarak adlandırılır ve bu dönemde dölenen yumurta rahim içine gider. Normal luteal faz ortalama 14 gün sürer. Progesteron, muhtemel bir gebelik için rahim içi zarını (endometriyum) ve astarını (uterus) hazırlar, oluşabilecek sakıncalı durumları önler (komplikasyon) ve doğuma kadar gebeliğin güvenli geçmesine katkıda bulunur (Dujikers et al.,1997).

4.5.4.1. Progesteron hormonunun görevleri

- Hamilelik sürecinde östrojen hormonunun yardımı ile kalınlaşan endometrium (dölyatağının iç tabakası) döllenmiş yumurta ve dölütün ilk hücrelerinin barındırılmasına yardımcı olur.
- Dölyatağı kaslarının, oksitosin hormonuna karşı oluşabilecek duyarlılığını azaltarak bu kasların kasılmasını önleyerek, düşük oluşmasına engeller.
- Hamileliğin sürekliliğini sağlar.
- Gebelik sonrası annenin göğüslerinden süt salgılanmasını sağlar.
- Kolajen üretimine katkı sağlayarak derinin esnekleşmesine yardımcı olur.

4.5.4.2. Klinikte progesteron hormonu için normal kabul edilen değerler

- Erkeklerde: 1 ng/mL'nin altındadır,
- Kadınlarda ovulasyon öncesinde: <1 ng/mL,
- Menstral siklusun ortasında: 5 – 20 ng/mL,
- Menapoz sonrası dönem: <1 ng/mL
- Hamilelik-ilk trimester: 11,2 – 90 ng/mL,
- Hamilelik-ikinci trimester: 25,6 – 89,4 ng/mL,
- Hamilelik-üçüncü trimester: > 48 – 300 ng/mL.

4.6.Kümüls Hüre ve Dişi Üreme Hormonları Arasındaki Koordinasyon

Tüm memelilerde LH artışı oosit maturasyonu ve ovulasyonu başlatan temel etkidir. Bu etki sonrasında oositler kümüls hücrelerini maturasyonları için uyarır. Maturasyon için fertilizasyon ve blastosist aşamasına gelebilen oositin çevresi çok katlı sıkı paketli kümüls hücreleriyle kaplanmış, sitoplazmasının birbirine eşit kumlu görünümlü olması gerektiği ispatlanmıştır. Oositin çevresinde bulunan sağlıklı somatik hücre popülasyonunun ise besin aktarımının kolaylaşması ve oosite gelen uyarıların iletilmesinde zorunlu olduğu belirlenmiştir (Greve et al., 1991, Greve et al., 1993, Sirard ve Blondin, 1996).

4.7: Embriyo Değerlendirmesi

4.7.1: Fertilizasyon günü

Fertilize bir oosit 2 pronukleus (PN) ve 2 polar cisim içermelidir. İcisi işleminden 16-18 saat sonra kontrol edilebilir. Pronükleer aşamasına gelmiş oositlerin morfolojik olarak güne uygun olarak değerlendirilebilmeleri için her iki

PN' nin sitoplazmanın merkezinde, büyüklük olarak eşit ve birbirine yakın gerekmektedir. Çekirdekçikler, küçük, çoklu ve dağılmış durumda bulunur. Zamanla kaynaşır, sayıları azalarak büyüme gösterirler ve sımsıkı birbirlerine yapışarak yan yana sıralanırlar. Çalışmalar, çekirdekçikler eşit sayı ve eşit konumda olmasının daha kaliteli embriyo geliştirme kapasitesine sahip olmalarını göstermektedir (Gardner et al., 1998).



Şekil 6 : 1. Gün döllenmiş oosit görüntüsü (2PN)

(Fotoğraf Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Laboratuvarı'ndan alınmıştır.)

4.7.2: İkinci ve üçüncü gün embriyo değerlendirmesi

Embriyo puanlamada, implantasyon açısından güçlü potansiyele sahip embriyoları belirleyebilmek adına, bölünme evreleri değerlendirilmelidir. Bölünme aşamasında; fragmentasyon oranı, blastomer boyutu, bölünme hızı, perivitellin alan, sitoplazmik görüntü, blastomerlerin nükleer durumu ve zona pellusida özellikleri değerlendirilmektedir (Gardner et al., 1998).

4.7.2.1: Erken bölünme

Yaklaşık yirmi saat sonra, fertilize olan yumurta bölünmeye başlar ve 2-hücreli embriyoyu oluşturur. Yaklaşık 25.saat'te, fertilize yumurtaların %20'si 2 hücre aşamasında bulunmaktadır.

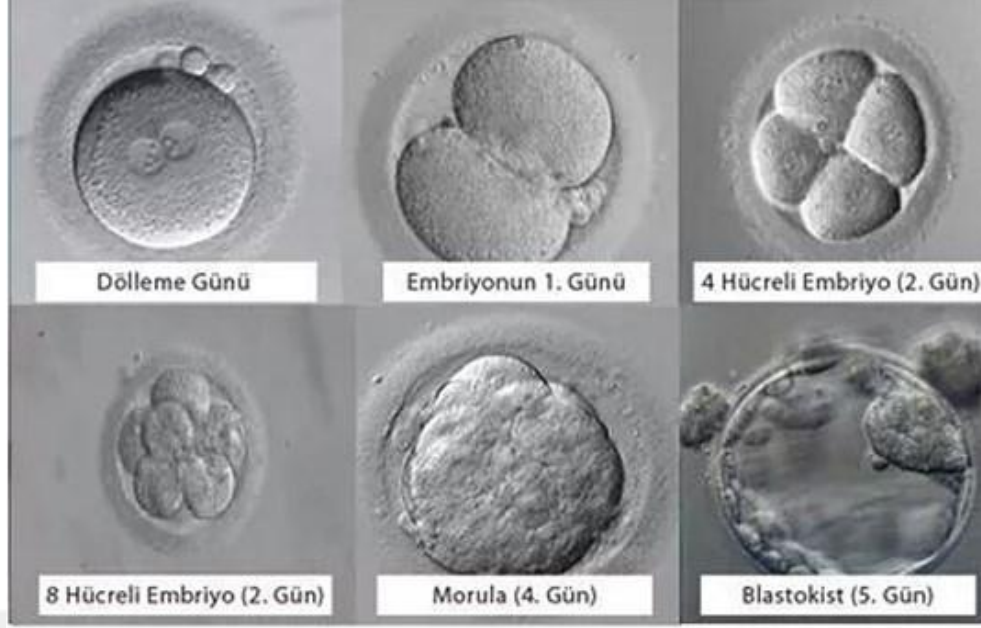
Erken bölünme durumu (ICSI işleminden yaklaşık 26 saat sonra) embriyoların yüksek tutunma ve gebelik kapasitesine sahip olduklarına dair bir kriter olarak göz önüne alınır (Gardner et al., 1998).

4.7.2.2: Bölünme aşamaları

İyi kalite olduğu kabul edilen bir embriyonun, 2. günde (42-44. saat) 4-5 blastomer ve 3. günde (66-68. saat) en az 7 hücrede olması gerekir. Embriyo implantasyon oranlarında, gününün gereğinden yavaş ya da hızlı embriyo gelişiminin gebelik oranları üzerinde olumsuz yönde etkisi olduğu açık bir kanıttır.

4.7.3: Dördüncü gün embriyo değerlendirilmesi

Bu evredeki bir embriyo ICSI işleminden sonra 92 ± 2 saattedir. Kompakt şekle geçmektedir ve klivajın dördüncü kısmına girmektedir. Dördüncü gün embriyo morfolojisindeki çeşitlilik görünüşe göre dışlanacak hücreleri içerir, etkisi açık değildir. Bunun istisnası yarıdan fazla embriyonun dışlanmış olmasıdır ki böyle bir durum zayıf bir tedavi sürecine işaret eder.



Şekil 7 : Embriyonun günlere göre gelişim aşamaları

(Fotoğraf Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Laboratuvarı'ndan alınmıştır.)

4.7.4: Blastokist değerlendirme sistemi

Erken blastokist: Erken 5. Gün embriyosu olarak kabul edilir. Blastosöl embriyo hacmine oranla yarısından daha az alan kaplar.

Blastokist: Blastosöl embriyo hacmine oranla yarısından daha fazla alan kaplar.

Tam blastokist: Blastosölün hacmi embriyoyu tümüyle kaplar.

Genişlemiş blastokist: Zona incelmeye başlamıştır, blastosölün hacmi erken dönemdeki embriyodan çok daha büyüktür.

Çatlamaya başlamış blastokist (Hatching): Blastokist zonanın dışına çıkmaya başlamıştır.

Çatlamış blastokist: Hatching sonlanmış, trofoektoderm zonanın dışına çıkmıştır.

Blastokist puanlama sistemi sonucunda 3 farklı kalite varsayımı elde edilir; grade-1, grade-2, grade-3.

Tüm bu embriyo değerlendirme aşamaları ışığında 4. Günden 5. Güne uzanan zaman aralığında embriyolar 3 farklı kalitede ele alınır bunlar:



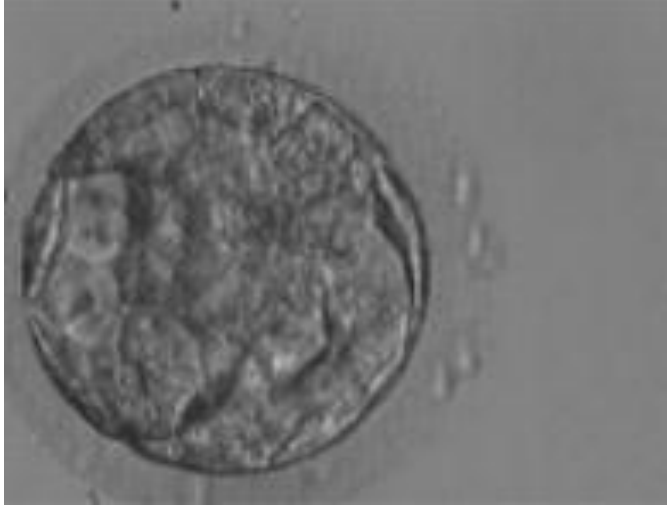
Şekil 8 : Grade:1 – 1. kalite ICM ve Trofoektoderm tabakasına sahip embriyo- iyi kalite

(Fotoğraf Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Laboratuvarı'ndan alınmıştır.)



Şekil 9 : Grade:2- 2. kalite ICM ve Trofoektoderm tabakasına sahip embriyo- orta kalite

(Fotoğraf Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Laboratuvarı'ndan alınmıştır.)



Şekil 10 : Grade:3- 3.kalite ICM ve Trofoektoderm tabakasına sahip embriyo- kötü kalite

(Fotoğraf Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Laboratuvarı 'ndan alınmıştır.)

4.8: Apoptozis'in Tanımı ve Özellikleri

Apoptozis, genetik olarak düzenlenen bir hücre ölüm programıyla hücrenin kendini öldürmesidir (Kierszenbaum, 2006). Gelişmiş organizmalarda, fonksiyonlarını kaybeden hücrelerin çevreye zarar vermeden programlı ölümü olarak tanımlanmaktadır (Altunkaynak ve Ozbek , 2008). Bir hücrenin farklılaşma, bölünme, yaşam ya da ölüm konusundaki karar, hücre içi ve dışındaki faktörlerin etkileşimlerine göre değişir. Ölüme giden hücrenin yolu apoptozisle sonuçlanır. Hücrelerin çoğalması, ölmesi ya da yaşamını bölünmeden sürdürmesini belirleyen üç ana etken vardır. Bu olgular temelde, besin maddelerinin, ekstrasellüler sinyallerin ve büyüme faktörlerinin varlığı ya da yokluğuna bağlıdır. Ayrıca, dış etkenler nedeniyle DNA yapısının hızlıca değişmesi hücrenin ölümü veya yaşamına karar verilmesinde etkin rol oynar (Solakoğlu , 2009).

Hücre içinden ya da dışından gelen ölüm sinyallerinin üzerinde bulunduğu organel mitokondridir. Zar yapısının bozulması ile ATP zincirinin temel elementi Sitokrom C, sitoplazma içine geçerek inaktif halde ki Apaf-1 molekülüne bağlanarak aktif hale gelir ve Apoptozom denilen yapının oluşmasına sebep olur. Apoptozom,

kaspaz-9'u, kaspaz-9 ise diğer kaspaz enzimlerini proteolitik bir zincir halinde aktive ederek apoptozisin gerçekleşmesine neden olur. Mitokondrielerde dış zarın potansiyelini; Bcl-2 grubu olarak bilinen bir tür protein grubunun katkısıyla düzenlenir. Apoptotik süreç kaspazlar da denilen proteolitik enzimler tarafından ister hücre dışı isterse hücre içi mekanizmalar tarafından aktive edilerek gerçekleştirilir (Ulukaya, 2003, Sakkas et al., 2007).

Apoptozis'e giden hücreler, hücreler arası bağlantılarını kaybederek büzüşür, kromatin parçalanır ve hücre küçük apoptotik cisimler oluşturmak üzere yıkılır. Bu cisimler makrofajlar sayesinde fagosite edilir ve bu nedenle inflamasyon görülmez. Ek olarak, Bax proteini, mitokondriyodan sitoplazma içine sitokrom c çıkışını tetikler ve apoptotik süreçte etkin proteazları aktive eder. Bcl-2 proteininin Bax'a bağlanmasıyla etkisini önlemekteki temel mekanizmadır (Kierszenbaum, 2006). Diğer bir hücre içi faktör ise p53 proteindir. Asıl fonksiyonu, çeşitli şekillerde gelen DNA hasarına bağlı olarak hücre siklusunu durdurup, hücrenin hasar görmüş DNA'sını onarmasıdır. Bu yüzden gen tamircisi yani koruyucusu olarak da tanımlanır. Ancak zarar büyükse bu kez p53 ters etki göstererek hücreyi apoptozise götürür. Ayrıca, IL-2, Koloni Uyarıcı Faktörler (CSF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF), Nöron Büyüme Faktörü (NGF), Tümör Nekroz Faktörü (TNF) gibi maddelerin ortamda azalmasının yanı sıra, ilaçlar glukokortikoidler, virüsler, radyasyon, çeşitli antijenler de apoptozisi uyarabilir. Ovaryumda folikül atrezisi olarak bilinen işlemin sistemide apoptozisdir. Hücrelerin ölümü genetik olarak belirlenmiş ve çeşitli aktivasyonlarla bu etki ortaya çıkar. IVM'de, atreziye giden foliküllerden alınan kümülüsleri olan embriyolarda blastokist aşamasına ulaşmasının oldukça zayıf olduğu görülmüştür. Apoptozis, ovaryumda normal seyretmeyen foliküler gelişim zamanının önemli bir parçasıdır. Atrezinin hücresel mekanizması, doğrudan mRNA ve de protein sentezi ile ilişkilidir. Buda, belirli bir seyir içerisinde hücrelerin sahip olduğu DNA materyallerinin kaybolması ve nükleer genomik havuzun dağılması ile sonuçlanır. Aynı zamanda apoptozis, korpus luteumun gördüğü luteolizis sürecini de sağlayan mekanizmadır. Granüloza hücreleri, apoptozisten etkilenen ilk hücrelerdir. Antral foliküllerdeki granüloza hücrelerinde başlayan apoptozis hormonal kontrolün dışında aynı zamanda parakrin / otokrin sinyallere bağlıdır. Geçmiş çalışmalara göre, gonadotropin seviyelerindeki düşüklüğün ovaryum atrezisine yol açtığını bildirmektedir. Ayrıca, ovaryum

gelişiminin üzerindeki büyüme faktörlerinin varlığı da göz ardı edilmemelidir. IGF, apoptozisin düzenlenmesi olayında önemli roller üstlenir. Granüloza hücrelerinde, androjenler apoptozisi uyarır. Teka hücrelerinde ise apoptozisin mekanizması halen araştırılmakla beraber kaspaz-1 ve Bcl-2'in bu olaylar dizisine dahil olduğu bilinmektedir. Foliküler gelişimin primordial safhalarında ise apoptozisten ilk etkilenen hücre oositir. Oosit apoptozisini, parakrin faktörlerin uyardığı düşünülmekle birlikte, faktörlerin varlığı, foliküler aşamada gelişim yetersizliği olan oositlerin maturasyonunu engelleyen bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Apoptozis, embriyonun implantasyonundan blastosöl oluşumuna kadar geçen zaman diliminde birçok fonksiyonu yerine getirir. Embriyo implantasyondan önce çoğu erken bölünme safhasında olmak üzere birçok hücrelerini kaybeder. Kümüls hücrelerindeki apoptozis frekansı ile oosit kalitesi arasındaki ilişki konusundaki çalışmalar net olmayan çelişkili sonuçlara ulaşmıştır ama yine de kümülüs hücrelerindeki apoptozis kesin olmamakla beraber, kaliteli embriyo gelişim potansiyeli için bir işaret arz edebilir. Kümüls hücreleri, oosit maturasyonu, sinyal salınımı ve düzenlenmesi fonksiyonları ve fertilizasyonunda kritik rol oynar (Lossi and Merighi, 2003).

4.8.1: Apoptozis mekanizmaları

Apoptozis programlı hücre ölümü demektir ve apoptoz sürecinde meydana gelen farklılıkların çoğu, kaspazların aktivasyonu ile gerçekleşir. Apoptozisin tetiklenmesinde, 3 temel yol vardır. Bunlar;

- 1.Mitokondriyal Sinyal Yolu ile Apoptozis (Derici, 2007)
- 2.Dış sinyaller Yolu ile Apoptozis (Keane et al., 2001, Lou et al., 1998)
- 3- Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis (Rao et al., 2001, Jin et al., 2007).

Kümüls hücre apoptozu oosit kalitesi için bir indikatör, embriyo gelişimini etkileyen bir faktör olduğu gösterilmiştir (Lee, 2001, Yuan, 2005). Raman ve arkadaşları kümülüs apoptozunun ICSI sonrası fertilizasyonu etkilediğini, Moffatt ve arkadaşları hasta yaşı ile ilişkisi bulunduğunu, Ikeda ve arkadaşları ise oosit in vitro

maturasyonunda etkili olduğunu göstermişlerdir (Raman, 2001, Moffatt, 2002, Ikeda, 2003).

4.8.2: Apoptozis belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Apoptozisi belirlemek için birden fazla yöntem kullanılmaktadır. Yaptığımız deneysel çalışmada; apoptozisin saptanmasında açık ara en sık kullanılan histokimyasal yöntemlerden biri olan ve temeli apoptotik hücre işaretlemesine dayalı bir tür prensiple çalışan “TUNEL” yöntemini kullandık. Hüresel apoptozisi belirleme yöntemlerini ise şu şekilde sınıflandırabiliriz;

1. Morfolojik görüntüleme tekniğine dayalı yöntemler: Işık mikroskopuyla kullanılan; Hüresel Giemsa ve Hematoksilen boyama – Floresan ve Lazer mikroskopu ile kullanılan; Hüresel Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür boyama- Elektron mikroskopu ile kullanılan- Faz kontrast mikroskopu ile kullanılan teknikler,

2. İmmünohistokimyasal tekniklere dayalı yöntemler: Anneksin V Yöntemi- TUNEL Yöntemi- Kaspaz- M30 Yöntemi,

3. Biyokimyasal tekniklere dayalı yöntemler: Agaroz “Jel Elektrofrezisi”- Akım “Flow Sitometre”- “Western” Blotting,

4. İmmünolojik tekniklere dayalı yöntemler: ELIZA- Florimetrik Yöntem

5. Moleküler biyoloji tekniklerine dayalı yöntemler sayılabilir (Rao et al., 2001).

4.8.2.1: Tunel testi

TUNEL Testi Fiksasyon Solüsyonunun içeriğini; %2 Paraformaldehit, Permeabilizasyon Solüsyonu, %0.25 Glutaraldehit, %1 Triton X-100, %0,1 Sodyum Sitrat oluşturur. Apoptozis ve nekroz; hücre ölümünün iki farklı halidir, bu iki olguyu kayıp hücrelerin moleküler, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerine

dayanarak birbirlerinden ayırmak mümkündür. Apoptozis yani programlanmış hücre ölümü tüm ökaryotik canlılarda ki hücreölümünün en sık rastlanan halidir. Bu, hücreölümüne dengeli tutarak koruyan bir tür fizyolojik intihar mekanizmasıdır. Hücre ölümü; hücreölümüne dengeli içindeki normal doku ölüm koordinasyonunda gerçekleşir. Genelde, apoptozise uğrayan hücrelerde, hücreölümüne plazma zarının hızlı bozulması ve nükleusun parçalanması da dahil olmak üzere, çekirdek ve sitoplazmada çok net örnekler oluşturacak şekilde çok hızlı ve geri dönüşsüz yapısal değişiklikler söz konusudur. Nükleusun yapısındaki bozulma, kromatin ağının ağır hasarı ve kalsiyuma bağlı hücreölümüne kökenli nükleazların aktif hale gelmesiyle birlikte DNA'nın parçalara ayrılması yakından ilişkilidir. Nükleus DNA'sının oligonükleozom boyutuna inerek parçalanması ile sonlanan endonükleolizis de apoptozisin en önemli biyokimyasal olayı olarak kabul edilir. Böylece bu olay genellikle, elektroforez sırasında agaroz jeller üzerinde görülen tipik "DNA merdiveni" değerlendirmesi için kullanılır. Ancak bu yöntem tek tek hücrelerdeki apoptozisi veya apoptozisin histolojik değişimlerinin yerleşimini veya hücrede ki farklılaşma ilişkisi ile ilintili bilgi sağlamaz. Bu, apoptozis tarafından uyarılmış DNA dizi kırılmasının enzimatik bir sistem olan in situ işaretlenmesi ile mümkün olur. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) apoptozise uğrayan hücreleri tespit etmek için yapılan hücreölümüne işaretleme sistemine dayalı en anlamlı testtir. TUNEL ile apoptozisin ileriki evrelerinde belirleyici olarak rol alan apoptotik hücreölümüne ait nükleer kromatin fragmentasyonu saptanmaktadır. TUNEL testi çalışma metodu olarak DNA fragmentasyonlarının sonuna eklenen polimeraz terminal deoksinükleotidil transferaz enzim işaretlemesi prensibine dayanan ve özünde apoptotik hücreölümüne DNA sarmal kırıklarını, serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon dizisi ile tespit etmeye dayanan bir tekniktir. Apoptozise uğrayan hücreölümüne görüntülenmesini sağlayan son zamanların en yaygın kullanılan TUNEL boyama yöntemi ile hücreölümüne boyanarak apoptozise uğrayıp uğramadıkları bu yöntemle net olarak belirlenebilmektedir. Çalışmamda her bir hasta için 4 tekrarlı yapılan bu test için TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) testi kullanılmıştır.

5.GEREÇ VE YÖNTEM

5.1.Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grupları ve Özellikleri

Bu çalışma Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Kliniğine Eylül 2017- Nisan 2018 arasında başvuran herhangi bir klinik endikasyonu olmayan toplam 40 olgunun kümülüs hücreleri ile prospektif olarak yapılmıştır. Çalışmaya katılan olguların yaşları 27 ile 38 arasında değişmekte olup, ortalama yaş olarak $28,2 \pm 34,4$ saptanmıştır. Çalışma hasta verilerinin ve embriyo değerlendirilmesi açısından retrospektif bir değerlendirme de içermektedir, uygulanacak protokollerin bütün hastalar için belirli bir standartizasyonda olmasına dikkat edilmiştir. Çalışmada normal yanıt veren hastalar dahil edilmiş, polikistik overi, ileri yaş, endometriosis’li ve zayıf yanıtlı hastalar dışlanmıştır. Çalışmamızın Biruni Üniversitesi Girişimsel olmayan araştırmalar etik kurulunun 26/04/2017 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

5.2.Çalışmanın Tasarımı

Bu çalışma kliniğe başvuran herhangi bir endikasyonu bulunmayan 40 farklı infertil hastaya ait kümülüs hücreleriyle yapılmıştır. Aynı zamanda her hasta için opu öncesi B HCG günü (takribi işlem öncesi 36 saatte) progesteron değerleri saptanmış luteinizasyon süreci ile kümülüs hücreleri ve embriyo gelişim kaliteleri arasındaki koordinasyon incelenmiştir. Bu aşama da her bir hasta için kendisine ait kümülüs hücreleriyle yapılan hücre kültürüyle 24 saat, 48 saat,72 saat ve 96 saat’ te ayrı ayrı kümülüs hücrelerindeki apoptotik hücre oranını saptamak amacıyla Tunel testi yapılmış ve aynı zamanda eş zamanlı her bir hasta için embriyo gelişim süreçleri takip edilmiş ve gebelik sonuçları incelenmiştir.

5.3.Çalışmada Kullanılan Yöntemler

5.3.1. Örnek alımı ve hücre kültürü

Her bir hasta için yapılan yumurta toplama (OPU) işlemiyle hastalara ait oositler alınmış, yaklaşık olarak 2-2,5 saate varan inkübasyon sonrası Hyaluronidase işlemi ile oositler kümülüs hücre komplekslerinden ayıklanmış, daha sonra oosit hücreleri ICSI işlemi görmüş ve takip için inkübasyona alınmıştır. Öte yandan Hyaluronidase işlemi görmüş kümülüs hücreleri ortamlarından toplanıp 15 dk 1500 devirde HTF (human tubular fluid media) içinde iki kez santrifüj edilerek enzim giderilme işlemine bırakılıp her bir hasta örneği için DMEM F12 mediumunda %10 Fetal calf serum ilavesi ile 1ml'lik kümülüs süspansiyonu hazırlandı,yuvarlak lameler %70'lik alkolle yıkanıp 24 lük kültür kaplarına her bir hasta için 4 kanal olacak şekilde yerleştirilip çoklu kültür kabı kapağı bek ocağından geçirilip kapatıldı ve inkübatöre kaldırıldı. Her lamele 50.000 hücre gelecek şekilde kümülüs süspansiyonundan eklendi ve 40 dk sonra invert altında yapışıp yapışmadıkları kontrol edildi ve hazırlanan kültür mediumu ile birleştirilip üzeri yağ ile kapatıldı ve inkübatöre kaldırıldı. Günlük ölçümler için her güne ait kanaldan hücreler alındı pbs ile yıkanıp paraformaldehit (%4 lük) ile fikse edildi ve apoptoz tayini, Tunel ölçümü için hazır hale getirildi. Supernatanları 2000 rpm de 15 dakika santrifujlenerek progesteron tayinleri için -20 de donduruldu.

Eş zamanlı olarak günlük ölçümler yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Tüm hastalar için embriyo takiplerine ait sonuçlar da kaydedildi.

5.4.İstatistiksel İncelemeler

SPSS 24 istatistik programı kullanılarak istatistiksel veri tablosu hazırlandı ve inceleme sonuçlandı, $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Nitel değişkenler frekans ve oranla, nicel değişkenler ortalama ve standart sapma ile tanımlanmıştır. Gebelik grupları Mann-Whitney Test, Kolmogorov-Smirnov Test ve Fisher's Exact Test ile karşılaştırılmış; değişkenler arasındaki ilişki Pearson Korelasyon Analizi ile incelenmiştir.

6.BULGULAR

Gebelik pozitif ve negatif olan gruplarda kadın ve erkek yaşı, oosit sayısı, fertilize oosit sayısı, embriyo sayısı, sperm konsantrasyonu ve sperm motilitesi açısından farklılık bulunmamıştır (tablo 1). Sperm morfolojisi gebe olan grupta daha yüksek bulunmuştur (p=0,000).

Tablo 1 : Kadın yaşı, erkek yaş, fertilize oosit sayısı, embriyo sayısı, sperm konsantrasyon, motilite ve morfolojisinin gebelik sonuçları açısından karşılaştırılması

	Gebelik (+) ort±SD	Gebelik (-) ort±SD	p
Kadın yaşı	30,25±3,37	32,37±6,00	,207
Erkek yaşı	33,81±4,72	35,41±6,48	,401
Oosit sayısı	13,75±7,80	11,01±9,29	,360
Fertilize oosit sayısı	8,66±5,97	7,13±6,16	,458
Embriyo sayısı	7,00±4,86	5,13±3,99	,211
Sperm konsantrasyonu	48,81±18,99	49,79±20,71	,880
Sperm motilitesi	11,03±24,99	5,50±11,87	,386
Sperm morfolojisi	2,87±0,88	1,33±1,20	,000

Pearson korelasyon test, *p<0,05

Tablo 2 :Progesteron, apoptotik hücre oranları ve blastomer sayılarına ilişkin ortalama, standart sapma ve karşılaştırma.

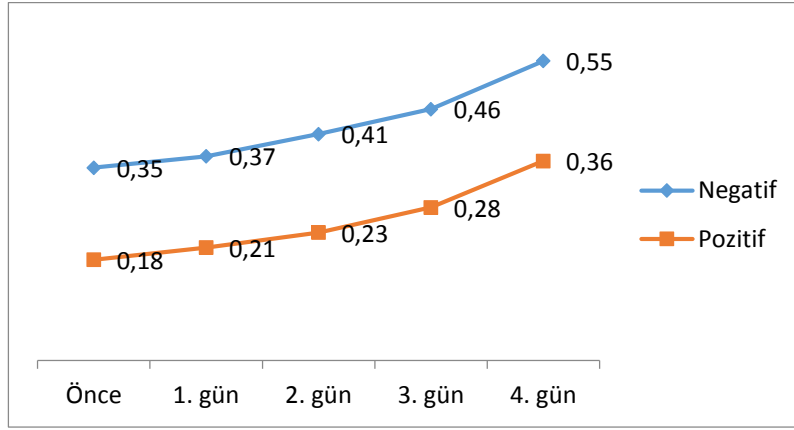
	Gebelik				p*
	Negatif (n=24)		Pozitif (n=16)		
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
Progesteron	1,07	0,21	0,91	0,15	0,021
Apoptotik hücre oranı (önce)	0,35	0,23	0,18	0,13	0,023
Apoptotik hücre oranı (1. gün)	0,37	0,23	0,21	0,13	0,026
Apoptotik hücre oranı (2. gün)	0,41	0,23	0,23	0,13	0,013
Apoptotik hücre oranı (3. gün)	0,46	0,23	0,28	0,14	0,016
Apoptotik hücre oranı (4. gün)	0,55	0,22	0,36	0,19	0,009
Embriyo blastomer sayısı (2. gün)	3,88	0,99	3,88	0,50	0,988
Embriyo blastomer sayısı (3. gün)	7,38	1,56	8,06	0,85	0,031

*: Mann-Whitney Test

Ortalamalar olgu sayısı az olduğu için nonparametrik yöntem olan Mann-Whitney Test ile karşılaştırılmıştır.

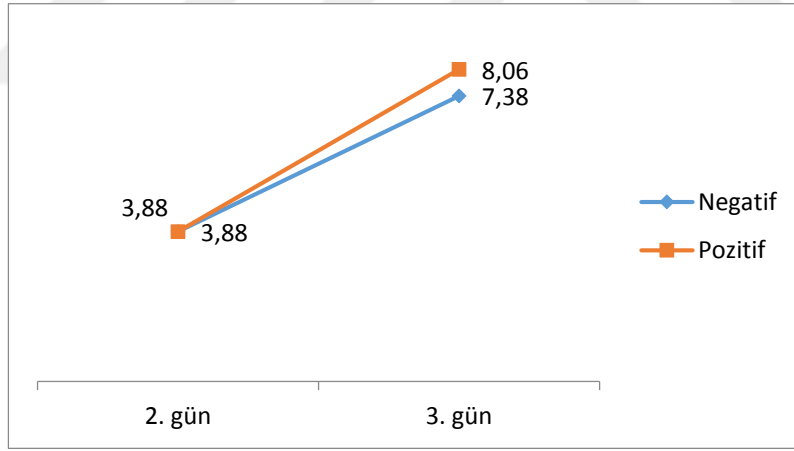
Progesteron ve apoptotik hücre oranları ortalamaları gebeliği negatif olan grupta daha yüksektir. 3. günde canlı hücre sayısı gebeliğin pozitif olduğu grupta daha yüksektir. Ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır (tablo 2).

Tablo 3 : Gebelik pozitif ve negatif gruplarında apoptotik hücre oranı ortalamaları



Gebeliğin pozitif olduğu grupta apoptotik hücre sayısı daha düşük bulundu. Gebeliğin negatif olduğu grupta ise daha yüksek bulundu. Her iki grupta apoptotik hücre oranlarının kültür gününe bağlı olarak yükseldiği gözlemlendi (tablo 3).

Tablo 4 : Gebelik pozitif ve negatif gruplarında 3. Gün blastomer sayısı ortalamaları.



3. gün embriyolarında blastomer sayısı gebe olan grupta daha yüksek bulunmuştur (tablo 4).

Tablo 5 : Progesteron ve apoptotik hücre oranları arasında korelasyon.

	Apoptotik hücre oranı (Önce)	Apoptotik hücre oranı (1. gün)	Apoptotik hücre oranı (2. gün)	Apoptotik hücre oranı (3. gün)	Apoptotik hücre oranı (4. gün)
Progesteron	0,761(**)	0,761(**)	0,752(**)	0,726(**)	0,757(**)
	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001
	40	40	40	40	40
Apoptotik hücre oranı (önce)		0,997(**)	0,985(**)	0,970(**)	0,928(**)
		0,001	0,001	0,001	0,001
		40	40	40	40
Apoptotik hücre oranı (1. gün)			0,989(**)	0,971(**)	0,931(**)
			0,001	0,001	0,001
			40	40	40
Apoptotik hücre oranı (2. gün)				0,987(**)	0,946(**)
				0,001	0,001
				40	40
Apoptotik hücre oranı (3. gün)					0,957(**)
					0,001
					40

*: Pearson Korelasyon Analizi.

**p<0,001

Tablo 5'te HCG günü Progesteron değeri ile ve apoptotik hücre oranları arasında pozitif yönde ilişki saptanmıştır. Progesteron arttıkça apoptotik hücre oranları da artmaktadır.

Tablo 6 : Progesteron, apoptoz, embriyo kalitesi ve gebelik ilişkisi.

		HCG Günü Progesteron	Kültür Öncesi Apoptoz	Dördüncü Gün Embriyo Kalitesi	Gebelik
HCG Günü Progesteron	R sig (2-tailed) N	1 40	,761** ,000 40	,481** ,002 40	-,396* ,011 40
Kültür Öncesi Kümüls Apoptozu	R Sig n	,761** ,000 40	1 40	,464** ,003 40	-,391* ,013 40
Dördüncü Gün Embriyo Kalitesi	R Sig n	,481** ,002 40	,464** ,003 40	1 40	-,597** ,000 40
Gebelik	r Sig n	-,396* ,011 40	-,391* ,013 40	-,597** ,000 40	1 40

Pearson korelasyon testi

**korelasyon 0,01 seviyesinde anlamlı

*korelasyon 0,05 seviyesinde anlamlı

Tablo 6 da HCG günü progesteron değeri ile kültür öncesi kümülüs apoptozu 4. Gün embriyo kalitesi ve gebelik arasında ilişki bulunmuştur. Progesteron düzeyinin kümülüs apoptozu ile pozitif korelasyonu bulunmaktadır. 4. Gün embriyo kalitesi azaldıkça apoptozun arttığı görülmüştür.HCG günü progesteron değerinin yükselmesi, kültür öncesi apoptoz değeri ve 4. Gün embriyo skorunun kötüleşmesi ise gebeliği negatif olarak etkilemektedir.

Tablo 7 : Embriyo kalitesi ile ilişkili olarak progesteron ve apoptotik hücre oranına ilişkin ortalama, standart sapma ve karşılaştırma (Kruskal Wallis test).

Embriyo Kalitesi (4. gün)		Progesteron	Apoptotik hücre % oranı (önce)
Grade 1	Ortalama	0,91	0,20
	Std. Sapma	0,16	0,16
	n	23	23
Grade 2	Ortalama	1,19	0,39
	Std. Sapma	0,21	0,23
	n	6	6
Grade 3	Ortalama	1,11	0,41
	Std. Sapma	0,19	0,23
	n	11	11
p*		0,002	0,012

*: Kruskal Wallis Test

P<0,05 istatistiki anlamlılık

Tablo 7 de embriyo kalitesi ile progesteron ve apoptotik hücre oranları gösterilmiştir.1. kalite embriyolarda en düşük progesteron ve apoptoz değeri elde edilmiştir. Bu da istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 8 : Gebelik gruplarında embriyo kalitesi ve karşılaştırma.

		GEBELİK		Toplam
		Negatif (n=24)	Pozitif (n=16)	
Grade 1	n	8	15	23
	%	33,3%	93,8%	57,5%
Grade 2	n	5	1	6
	%	20,8%	6,2%	15,0%
Grade 3	n	11	0	11
	%	45,8%	0,0%	27,5%
Toplam	n	24	16	40
	%	100,0%	100,0%	100,0%

p=0,002 (Kolmogorov-Smirnov Test)

Gebeliğin saptandığı grupta embriyo kalitesi grade 1 oranı daha yüksektir (p=0,002). Gebeliğin olmadığı grupta ise grade 1 embriyo oranı %33, grade 2 embriyo oranı %20,8 ve grade 3 embriyo oranı %45,8 olarak bulunmuştur.

Tablo 9 : Gebelik pozitif ve negatif gruplarında PN oluşumu.

		GEBELİK		Toplam
		Negatif (n=24)	Pozitif (n=16)	
PN yok	N	6	0	6
	%	25,0%	0,0%	15,0%
PN var	N	18	16	34
	%	75,0%	100,0%	85,0%
Toplam	N	24	16	40
	%	100,0%	100,0%	100,0%

p=0,035 (Fisher's Exact Test)

Tablo 9 da 1. gün embriyo değerlendirmesinde pronukleus varlığı ile gebelik ilişkisi incelenmiş PN görülmeyen olgularda gelişen embriyo transferi sonrası gebelik elde edilememiştir.

7. TARTIŞMA

Oosit gelişiminin; çeşitli evrelerinde oosit morfolojisinde, fizyolojisinde ve onu çevreleyen kümülüs hücrelerinde dizi halinde çeşitli değişiklikler olmaktadır. Granüloza hücrelerinin özellikle de kümülüs hücrelerinin fonksiyonu ile, oosit matürasyonu arasında çok sıkı bir ilişki olduğu, kümülüs ekspansiyonu'nun oosit maturasyonu ve foliküler atrezi arasındaki bağlantılar çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Hinrichs,1997).

Yardımcı üremedeki ana konulardan biri, oosit kalitesinin doğru bir şekilde tahmin edilmesindeki yetersizlik ve dolayısıyla başarılı bir gebeliğe katkıda bulunma potansiyelidir. Oositi doğrudan izleme klinikte olası görülmediğinden kümülüs hücrelerinin incelenmesi uygun bir alternatif gibi görünmektedir. Bununla birlikte, elde edilen sonuçlar kümülüs hücrelerini değerlendirmek için önerilen tekniklerin oosit kalitesini tam olarak yansıtması açısından hızlı ve güvenilir olması ve klinikte yaygın olarak uygulanabilir olması gerektirir. Bu çalışmada, klinik bir ortamda kümülüs hücreleri kullanılarak oosit kalitesini belirlemede ve gebelik tahmininde çok basit ve anlaşılır parametrelerin yararlı olabileceğini gösterdik.

Granüloza hücreleri için iki temel fonksiyon tanımlanmaktadır; Birinci fonksiyon, ovulasyon başlangıcında ve sonrasında oositin bütünlüğünün korunmasına yardım edilmesi ve beslenmesi iken, ikinci fonksiyon ise ovulasyon sonrasında gelişen foliküle ait lutein hücrelerinin steroid hormon üretim sürecinde öncelikle estradiol ve progesteron olmak üzere steroid hormonları üretmesidir.

Ovaryum foliküllerinde geliştikçe oositin etrafını saran, zona pellucida gibi kalın özelleşmiş ekstraselüler matrikse bağlı çok sayıda granüloza hücresi tabakası vardır. Bu hücrelerin en içteki tabakası olan korona radiata, zona pellucida'dan geçen sitoplazmik uzantılarla doğrudan oosit ile iletişim kurar. Yumurtlamada oosit salınımının ardından, bu hücreler granolosa tabakasını oluşturur. Granüloza hücreleri ayrıca yumurtalık folikülündeki yere bağlı olarak belirli isimlere de sahip olabilir: kümülüs ooforus, hemen oosit çevresinde yer alır ve bununla serbest bırakılır. İnsan gelişiminde, döllenmeden sonraki ilk gelişme haftasında kümülüs- granuloza hücre katmanı ve zona pellucida, implantasyona başlaması için "kuluçkalandığı" blastosistin etrafını sarmaya devam eder.

LH hormonunun ani yükselmesi, menstrual siklus' un ortasında ovaryum foliküllerinde ovulasyon için başlatılan bir seri kritik değişikliği tetikler. Normal seyreden ovulasyon süreci steroidogenez, kümülüs hücre büyümesi ve oosit matürasyonu gibi birçok kritik değişiklikte rol oynar. LH'nin stimülasyonu, ovulasyon indüksiyonu ile duraksayan mayozun tekrar başlamasına neden olurken, mRNA ve proteinlerin sentezlenmesinde ivme kazandırır, bu sayede ise oositi saran kümülüs hücrelerindeki salgılayıcı özellikler farklılaşır (Cha and Chain, 1998).

Host ve arkadaşlarının 2002 de yaptıkları çalışmaya göre kümülüs hücrelerin apoptozisi, zona pellusidanın kalınlığının değişiklikleri ile oositin maturasyon ve fertilizasyonu üzerine etkisi arasındaki bağlantı araştırılmıştır. Retrospektif olan bu çalışmada özel bir klinikte 50 hasta üzerinde yapılan çalışmada kümülüs hücrelerinin apoptozisi, zona pellusida kalınlığı ve oositin fertilizasyon, maturasyon ve embriyo kalitesi incelenmiştir fertilize olan M2 oositler ile fertilize olmayan M2 oositlerdeki apoptozis oranı incelendiğinde fertilize olmayan M2 oositlerde apoptozis oranı daha yüksek bulunmuştur.

Zona pellusida kalınlığına bakıldığında ise embriyo kalitesi ile arasında bir ilişki olduğu, fakat apoptozis, zona kalitesi ve embriyo kalitesi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca immatür ve matür oositlerin kümülüs hücrelerindeki apoptozis oranı bakıldığında immatür oositlerde anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuş ve kümülüs hücrelerindeki apoptozisin embriyonun ilerleyişi ve kalitesi hakkında bize bir öngörü kazandıracağını saptamışlardır (Host et al., 2002).

Bu çalışmada herhangi bir klinik endikasyonu bulunmayan 40 hasta örneği ile çalışıldı. Amaçlanan olgu ise kümülüs hücrelerinde günlere bağlı değişen programlanmış hücre ölümü yani Apoptozisin gelişen embriyo kaliteleri ve gebelikler üstünde nasıl bir etkisi olduğunu incelemektir. Her bir hasta için oluşturulan 4 günlük periyodik olarak takip edilecek kümülüs hücre kültürlerinin den 1. 2. 3. Ve 4. günlerde Tunel TESTİ ile ölçümler alındı ve eş zamanlı olarak da her bir hastanın embriyo gelişimleri takip edildi. Çalışmamız; özellikle apoptotik hücre oranlarında günlere bağlı artış olduğu ve bu artışın yüksek progesteron değeriyle bir ilişkisinin bulunduğunu ortaya koydu. Kümülüs hücre kültürlerinin periyodik takibine eş her hastaya ait yapılan embriyo gelişim aşamalarında özellikle apoptotik hücre oranının artmasının embriyonun zayıf gelişimini öngördüğünü anlamlı ölçüde ortaya çıkardı. Aynı zamanda embriyo gelişiminin takip edildiği 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 96 saatlerde embriyo hücre sayılarındaki gününe uygun sayıların ve

kalitelerin hcg günü ölçülen progesteron değerinin haberci olma niteliğini kuvvetlendirdiği ortaya çıktı. Hücresel anlamda günlere uygun sayılara bakıldığında ise apoptotik hücre oranının arttığı hasta örneklerinde hücre sayılarının beklenilenden daha yavaş ilerlediği yapılan ölçüm ve takiplerle desteklendi .

Endojen gonadotropinlerin gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) agonistleri tarafından rutin olarak bastırılmasına rağmen, insan koryonik gonadotropin (hCG) tetikleyici günündeki serum progesteron yükselmesi, kontrollü yumurtalık stimülasyonu döngülerinde sadece kısa protokollerde değil, uzun protokollerde de gösterilmiştir. Progesteron yükselmesinin oluşum oranlarının GnRH agonistleri ile in vitro fertilizasyon / intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF / ICSI) döngülerinin %13 ile %46'sı olduğu bildirilmiştir. Ancak, bu ince progesteron artışlarının gebelik sonuçları üzerindeki olası etkileri tartışmalıdır. Çalışmaların çoğunda, HCG günü Progesteron yükselmesinin gebelik sonucunu olumsuz etkilediği savunuldu (Huang, 2015). Bazı araştırmacılar ise bunun tam tersi bulgular ileri sürdüler (Urman B.1999). Santos-Ribeiro ve arkadaşlarının 2014 de yaptıkları bir çalışmada HCG günü progesteron seviyelerinin canlı doğum oranlarını etkilediği, hCG tetikleyici günde hem düşük (.00.0 ng / mL) hem de yüksek (≥ 1.5 ng / mL) progesteron seviyelerinde düşük doğum oranları olduğunu gösterdiler (Santos-Ribeiro, 2014). Ancak bu konuda kesin bir görüş oluşmamıştır. Bizim çalışmamızda HCG günü progesteron değeri gebe olan olgularda 0,91 ng/ml, gebelik gerçekleşmeyen olgularda ise 1,07 bulundu. HCG günü progesteron ile apoptotik kümülüs hücre sayısının artışı kültür öncesi ve kültür sürecinde bulundu. Ayrıca progesteron değerinin embriyo kalitesi ile ilişkisini de gösterdik. Bu sonuçlar yükselen progesteron değerinin apoptotik kümülüs hücre sayısını artırarak embriyo kalitesini de düşürdüğü düşüncesi ileri sürülebilir.

Çalışmamızda kümülüs hücre kültürlerinden periyodik olarak alınan apoptotik hücre oranlarının, embriyo gelişiminin 4. Gününde embriyo kaliteleri arasındaki bağı ortaya konmuştur. Üyte' de kabul gören 3 aşamalı embriyo kalite standardı mevcuttur. Yaptığımız ölçümlere göre; kümülüs apoptozisin daha yüksek oranda görüldüğü hastalara ait embriyoların kalitelerinin kümülüs apoptozisinin daha düşük olduğu hastalara ait embriyoların kalitelerinden daha düşük olduğunu saptanmıştır.

Embriyo takibinde döllenmeyi gördüğümüz 24. saat PN gününde; gebeliğin pozitif sonuçlanmasıyla birinci gün de görülen 2 pronükleus aşamasının doğrudan ilgili olduğu geç döllenme gösteren oositlerden gelişen embriyolarda transfer sonrası

negatif gebeliğin daha yüksek olduğu anlamlı ölçüde görüldü. Çalışmamızda 1. Gün embriyo değerlendirmesinde apoptotik kümülüs hücre artışının pronukleus görülmesini de geciktirdiği varsayımı ortaya çıkmıştır.

Gebelik oranı ve oosit kalitesi, in vitro fertilizasyon (IVF) tedavisi alan kadınlarda apoptozis insidansı ile ilişkilendirilmiştir (Oosterhuis, 1998). Araştırmacılar kötü prognozlu hastalarda, apoptozis insidansının daha yüksekken, döllenmiş oosit veren foliküllerde granülosa hücresi apoptozisi daha düşük olduğunu gösterdiler (Oosterhuis, 1998, Nakahara, 1997).

Son çalışmalar kümülüs hücre apoptozu ve progesteron hormonunun kabul edilebilir sınırlarda oositin gelişim potansiyeli için gerekli olduğunu göstermiştir (Grupen, 2010). Çalışmamız apoptotik kümülüs hücrelerinin yüzde değeri ve HCG günü serum progesteron değerinin oosit final maturasyonu ve embriyo gelişim potansiyeli ile klinik gebelik geliştirmede optimal değerlerin ortaya çıkarılmasının gerekliliğini göstermiştir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak;

- Yapılan çalışmada; kümülüs hücre kültürünün periyodik takibinden alınan apoptotik hücre oranlarının artışının gebelik oranları üzerinde negatif etkili olduğu,
- Yumurta toplama işlemi öncesi HCG günü ölçülen progesteron değerinin gebelik üzerinde önemli ve anlamlı bir negatif etkisinin olduğu,
- Progesteron değerindeki artışın kümülüs hücre kültüründeki oluşacak apoptozis oranı hakkında haberci görevi üstlendiği,
- Luteinizasyon süreci ile kümülüs hücre kültüründeki apoptozisin ilişkili olduğu,
- Embriyo gelişim kalitelerinin, kümülüs hücre kültüründeki apoptozis değerlerinin artması ve azalması arasında bir anlamlılık olduğu yapılan tüm deneysel çalışmalar, bilimsel çalışmalar ve istatistiksel veri analizleriyle desteklenmiştir.

9. KAYNAKLAR

Abramovich S. S., Edry I., Galiani D. et al. (2006). Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*. 147: 2280–2286.

Akyol N., (2007). *İn vitro* sığır embriyosu üretimi. *Embriyo Transferi (Bülten)*, Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg., 47 (1), 1-8

Altunkaynak Z. B., Ozbek E., (2008). Programlanmış hücre ölümü; Apoptozis nedir? *Tıp. Araş. Derg.*, 6 (2): 93-104.

Anwar A, Moussa M. D. (Jan. 2002). *In vitro* maturation of oocytes. *Obgyn Net Advertisement*, Erişim 26.04.2015
<http://www.obgyn.net/infertility/vitromaturation-oocytes>

Atabekoğlu S.C., 1998, Oosit maturasyonunun folliküler sıvı hormon parametreleri ile ilişkisi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi.

Beck W.W., 1989, The menstrual cycle. In: Beck WW, ed. *Obstetrics & Gynaecology*. New York: John Wiley Sons.

Bosco L., Ruvolo G. ,Luparello C., Ferrari S., Valerio D., Santi D., Piomboni P., Sarcina E., Lispi M., Roccheri M.C., 2017, Gene Expression and Apoptosis Levels in Cumulus Cells of Patients with Polymorphisms of FSHR and LHB Undergoing in Vitro Fertilization Program. *Cell Physiol Biochem* ;43:2391–2404

Buccione R., Vanderhyden B.C., Caron P.J., Eppig J.J., 1990, FSH-induced expansion of the Mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon specific factor (s) secreted by the oocyte. *Dev Biol.* ;138:16-25.

Carson R.S., Salamonsen L.A., Findlay J.K.,1986, Permeability of rat ovarian follicles to LH development and luteinization .*J Rerod Fertil.* ; 76:663-668

Cha K-Y., Chain R-C., (1998). Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical usage, Hum Reprod Update., Mar-Apr; 4(2): 103-20 61)

Cıncık M., Sezen ğ., Özsoy H.M., Küçük T., Korkmaz C.,2001, Kumulus hücrelerinin oosit in-vitro maturasyonu üzerine etkileri T Klin J Med Sci ; 21:161-165.

Cihangir N. , 2009, Intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu - embriyo transferi sikluslarında otolog-kumulus hücre-oosit komplekslerinin kültür ortamı olarak kullanılmasının embriyo gelişim kalitesine, implantasyon ve gebelik oranlarına etkisinin araştırılması. Konya, Selçuk Üniversitesi Uzmanlık tezi

Derici E., (2007). Rho kinaz ve Siklooksijenaz İnhibitörleri ile Siklofosamid Kombinasyonlarının Çeşitli Tümör Hücre Serilerine Etkileri, Doktora Tezi Mersin, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Dujikers I.J.M.,1997, Willemsen WNP, Hollanders HMG, Hamilton CJ, Thomas CM, Vemer HM. Follicular fluid hormone concentrations after ovarian stimulation using gonadotropin preparations with different FSH/LH ratios.Int J Fertil.1997;42:306-310.

Dunlop C., Anderson R.A., 2014, The regulation and assessment of follicular growth Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation,2014, 74(S244):13-17 DOI: 10.3109/00365513.2014.936674

Enien W.M., Sahway S.E., Haris C.P., Seif M.W., Elstein M.,1995, Human chorionic gonadotropin and steroid concentrations in follicular fluid:the relationship to oocyte maturity and fertilization rates in stimulated and naturel in-vitro fertilization cycles. Human Reproduction. 1995;10:2840-2844.

Fabrizi R., Porcu E., Tiziana M., Primavera M.R., Cecconi S., Nottola S.A., Motta P.M., Venturoli S., Flamigni C.,2000, Human Embryo development and

pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system. *Journ of Asit Reprod Genetic*.2000; 17:1-12.

Gardner D. K., Vella P., Lane M., Wagley L., Schlenker T., Schoolcraft W. B., (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril*, 69: 84–88.

Gaud P.T., Goud A.P., Qiqn C., Laverge H., Van der Elst J., Sutter P De, Dhont M.,1998, In vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod*. 1998;13:1638-44.

Gilchrist R.B. , Lane M., Thompson J.G.,2008,Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, Volume 14, Issue 2, March/April 2008, Pages 159–177

Gougeon A., Echochard R., Thalabard J.C.,1994, Age related changes of population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early follicles in aging women, *Biol Reprod* 1994; 31: 50- 653.

Greve T, Madison V., Avery B., Callesen H., Hyttel P.,1993, In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim Reprod Sci*. 1993; 33: 51-69

Gruppen C., Armstrong D.T., 2010, Relationship between cumulus cell apoptosis, progesterone production and porcine oocyte developmental competence: Temporal effects of follicular fluid during IVM. *January 2010 Reproduction Fertility and Development* 22(7):1100-9 DOI: 10.1071/RD09307

Hampl A, Eppig J.J., 1995, Analysis of the mechanisms of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes *Development* Apr; 1995; 121 (4): 925-33.

Hernandez-Gonzalez I., Gonzalez-Robayna I., Shimada M., Wayne C.M., Ochsner S.A., White L., Richards J.S.,2006, Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process. *Mol Endocrinol.* 2006;20: 1300-21.

Hinrichs K. and Williams K.A.,1997, Relationships among Oocyte-Cumulus Morphology, Follicular Atresia, Initial Chromatin Configuration, and Oocyte Meiotic Competence in the Horse. *Biology of Reproduction* 57, 377-384

Host E., Gabrielsen A., Lindenberg S., Smidt-Jensen S., (2002). Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 77(3):511-515

Huang,Y., Wang,E.Y. Du,Q., Xiong,Y., Guo,X., Yu,Y. and Sun Y., 2015, Progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotropin administration adversely affects the outcome of IVF with transferred embryos at different developmental stages. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015; 13: 82. Published online 2015 Aug 4. doi: 10.1186/s12958-015-0075-3 PMID: PMC4524365

Hurk R., Bevers M.M., Beckers J.K.,1997, In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology.*1997; 47: 73-82.

Ikeda S., Imai H., Yamada M.,2003, Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. *Reproduction.* 2003 Mar; 125(3):369-76

Iwai T., Nanbu Y., Iwai M., Taii S., Fujii S., Mori T.,1990, Immunohistochemical localization of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1990; 417: 369–75.

Ishizuka Y., Takeo T., Nakao S., Yoshimoto H., Hirose Y., Sakai Y., Horikoshi Y., Takeuji S., Tsuchiyama S., and Nakagata N.,2014, Prolonged exposure to hyaluronidase decreases the fertilization and development rates of fresh and cryopreserved mouse oocytes. J Reprod Dev. 2014 Dec; 60(6): 454–459.

Jin W. P., Quan X. Q., Meng F. P., Cui X. D., Piao H. J., (2007). Relationship among hepatocyte apoptozis, P450 2E1 and oxidative stress in alcoholic liver disease of rats, 19(7):419-421

Junqueira L.C, Carneiro J., Kelley R.O.,1998, Temel Histoloji. In: Aytakin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B, ed. 8. Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi, 1998

Kalaycı G.,1986, Histoloji, Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986.

Kayaalp S.O.,2000, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 9. Baskı, Hacettepe-Taç

Keane R. W., Kraydieh S., Lotocki G., Bethea J. R., Krajewski S., Reed J. C.,Dietrich W. D., (2001). Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. J Nueropathol Exp Neurol, 60:422-429.

Kierszenbaum A. L., (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş, Ankara, Palme Yayıncılık, pp. 565-575.

Koçyiğit A, Çevik M., (2011). Memeli Reprodüktif Dokuları, Gamet Hücreleri ve Embriolarında Apoptozis. Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg. 8(1) 33-41, Erişim 26.04.2015, <http://ercivet.erciyes.edu.tr/arsiv/2011-1/1-memelireproduktif.pdf>

Koyabashi T., Oda T., Yoshimura Y., Takehara Y., Natori M. and Nozawa S.,1991, Androstenedione and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with succesful fertilization and cleavage of human oocytes in vitro. Fertility and Sterility 1991; 56:301-305.

Lee K.S., Joo B.S., Na Y.J., Yoon M.S., Choi O.H., and Kim W.W., 2001, Cumulus Cells Apoptosis as an Indicator to Predict the Quality of Oocytes and the Outcome of IVF-ET. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 18, No. 9, 2001

Leeson T.S., Leeson C.R., Poparo A.A., 1988, *Text/ Atlas Histology*. W.B Company. Harcourt Brace Jovanovich.

Lindner Ch., Lichtenberg V., Westhof G., Braendle W., and Bettendorff G., 1988, Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. *Horm Metab Res*. 1988; 20: 243-246.

Lopata A., 1988, The fertilizability of human oocytes at different stages of meiotic maturation *Ann NY Acad Sc: USA*, 1988; 541:324-36.

Lossi L., Merighi A., (2003). In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian. *Cns. Prog Neurobiol*, 69:287-312.

Lou J., Lenke L. G., Ludwig F. J., O'Brien M. F., (1998). Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 36:683-690.

Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R., (2004). Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*, 71 (1): 28-37.

McNatty K.P., Markris A., Degrazia C., Osathanondh R., Ryan K.J., 1980, Steroidogenesis by recombined follicular cells from the human ovary in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980 51; 1286-1285.

Mlyncikova A., Nagyova E., Fickova M., Scsukova S., 2008, Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol In Vitro* 2008;23:317-7

Moffatt O., Drury S., Tomlinson M., Afnan M., Sakkas D.,2002, The apoptotic profile of human cumulus cells changes with patient age and after exposure to sperm but not in relation to oocyte maturity.Fertil Steril. 2002 May; 77(5):1006-11

Oktem S., Ozhan H. M., Ozol D., (2001). Apoptozisinin önemi. Toraks Dergisi,2 (1): 91-95

Oosterhuis GJ, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I.,1998, Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome. Fertil Steril (1998) 70:747–9.10.1016/S0015-0282(98)00266-0

Ovalle W.K., Nahirney P.C.,2009, Netter Temel Histoloji.In: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P,ed.Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri,2009.

Raman R.S., Chan P.J., Corselli J.U., Patton W.C., Jacobson J.D., Chan S.R., King A.,2001, Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection.[Hum Reprod. 2001]Hum Reprod. 2001 May; 16(5):831-5

Rao R. V., Hermel E., Obregon S. C., Rio G., Ellerby L. M., Ellerby H. M., Bredesen D. E., (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. J Biol Chem., 276:869-874

Ross M. H., Pawlina W., (2006). Histology, A Text And Atlas. Philadelphia USA,Lippinott Williams and Wilkins, 5th Ed, Bölüm 3, 830-831

Russell D.L, Robker R.L.,2007,Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. Hum Reprod Update 2007; 13: 289–312.

Russell D.L, Salustri A.,2006, Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. Semin Reprod Med 2006;24:217–227.

Sadler T.W., (2005). Langman Medikal Embriyoloji. Dokuzuncu Baskıdan Çeviri. Ankara, Palme Yayıncılık; Bölüm1, 156-158.

Sadler T.W.,2000, Langman's Medical Embryology, 8. Edition, Lippincott Williams & Wilkins.

Sakkas D., Bizzaro D., Manicardi C.G., (2007). Chromatin Damage and Male Infertility. Humana press, Totowa New Jersey, 304-306.

Sirard M.A, Blondin P.,1996, Oocyte maturation and IVF in cattle. Anim Reprod. Sci. 1996 ;42:417-426.

Solakoğlu Z., (2009). Apoptozis varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. Klinik Gelişim, 22(3): 20-25.

Soom A.V., Kruif A.D., Oocyte maturation, sperm capacitation and preimplantation development in the bovine: Implications for in vitro production of embryos. Reprod Dom Anim. 1996;31:687-701.

Ulukaya E., (2003). Apoptozis Ders Notları, Erişim 26.04.2015, <http://biyokimya.uludag.edu.tr>

Urman, B., Alatas C., Aksoy S. ,Mercan,R., Isiklar,A., Balaban,B.,1999, Elevated serum progesterone level on the day of human chorionic gonadotropin administration does not adversely affect implantation rates after intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. Fertil. Steril. 72, 975–979

Voss A.K., Fortune J.E., 1991, Oxytocin secretion by bovine granulosa cells: Effects of stage of follicular development, gonadotropins, and co-culture with theca interna. Endocrinology 1991,128 :1991-1999

Weng L.S., Taylor L.S., Morshedi M., Schuffner A., Duran H.E., Beebe S., Oehninger S., (2002). Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. Mol Hum Reprod, 8 (10): 984-991.

Young E.L., Baird D.T., Hillier S.G.,1992, Mediation of gonadotropin-stimulated and differentiation of human granulosa cells by adenosine 3'5'-monophosphate:one molecule, two messages. Clin Endocrinol.1992; 37: 51-55.

Younis A.I., Brackett B.G., Fayrer H.R.A.,1989, Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. Gametes Res.1989;23: 189-201.

Yuan Y.Q., Peelman L.J., Williams J.L., Van Zeveren A., de Kruif A., Law A., Van Soom A.,2004, Mapping and transcription profiling of CASP1, 3, 6, 7 and 8 in relation to caspase activity in the bovine cumulus-oocyte complex.[Anim Genet. 2004] Anim Genet. 2004 Jun; 35(3):234-7

10. EKLER

Etik Kurul Onayı

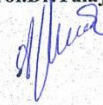
Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

26.04.2017

Sayın: Gökçe Dünder

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda "Kümüls hücre kültüründe apoptosis ve luteinizasyon sürecinin IVF hastalarında embriyo gelişimi ve gebelik açısından değerlendirilmesi" isimli araştırmanızın kurulumuzun 26/04/2017 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Tülay İrez



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Tarih:26.04.2017 Toplantı Sayısı:5	Karar No: 2017/5-8 Araştırmacı Gökçe Dünder'in planladığı "Kümüls hücre kültüründe apoptosis ve luteinizasyon sürecinin IVF hastalarında embriyo gelişimi ve gebelik açısından değerlendirilmesi" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.
---------------------------------------	--

ÜYELER

Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Tülay İrez	Temel Tıp Bilimleri	Histoloji ve Embriyoloji	Etik kurul Başkanı	Katılmadı
Doç.Dr.Leman Şenturan	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Hemşirelik	Etik Kurul Başkan Yardımcısı	L. Şenturan
Prof.Dr.Fatma Çelik	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Beslenme ve Diyetetik	Üye	F. Çelik
Doç.Dr.Şölen Himmetoğlu	Tıp Fakültesi Temel Bilimler	Tıbbi Biyokimya	Raportör	Şölen Himmetoğlu
Yrd.Doç.Dr.Ayşe Tuğba Ceyhun Duman	Eğitim Fakültesi	Zihin Engelliler	Üye	Ayşe Tuğba Ceyhun Duman
Yrd.Doç.Dr.Belen Şirinoğlu Çapan	Diş Hekimliği Fakültesi	Pedodonti	Üye	Belen Şirinoğlu Çapan

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gökçe DÜNDAR ÇİFTLİK

Doğum Tarihi ve Yeri: 14.01.1987, Biga/Çanakkale

Mail Adresi: dundargokce87@gmail.com

Unvanı: Biyolog

Öğrenim Durumu: EGE Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
06.2010

BİRÜNİ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik
Embriyoloji Yüksek Lisans Programı, devam ediyor.

İNTİHAL RAPORU

KÜMÜLÜS HÜCRE KÜLTÜRÜNDE APOPTOSİS VE LUTEİNİZASYON SÜRECİNİN IVF HASTALARINDA EMBRİYO GELİŞİMİ VE GEBELİK AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 16 BENZERLİK ENDEKSİ	% 16 İNTERNET KAYNAKLARI	% 1 YAYINLAR	% 2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	------------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 11
2	adumilas.adu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	ercivet.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to City and Islington College, London Öğrenci Ödevi	<% 1
5	acikerisim.istanbulbilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	tr.skycheck.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1