

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KÖK HÜCRE UYGULAMASININ
SIÇAN MODELİNDE
İN VİTRO FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Alican GÜMÜRDÜ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU

MANİSA-2014



YÜKSEK LİSANS TEZ SINAVI TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Alican GÜMÜRDÜ 'nün Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı **“KÖK HÜCRE UYGULAMASININ SIÇAN MODELİNDE İN VİTRO FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİLERİ”** başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğini ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek **KABUL** kararı verilmiştir. **01/09 /2014**

İmza

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Sevinç İNAN

Prof. Dr. Tuncay VAROL

Not: Bu sınav Tutanağı 2 adet olarak Anabilim Dalı üst yazısı ile sınavı izleyen 3 gün içerisinde Enstitü'ye iletilir. Ayrıca; Altta belirtilen Enstitü tarafından onaylanan tutanak, 2 adet olarak hazırlanacak Tez kitaplarına konulur.

BİLGİLENDİRME:

- Jüri salt çoğunlukla, tez hakkında kabul/ Red veya Düzeltme kararı verir. Bunlarla ilgili tutanaklar, Anabilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla, tez sınavını izleyen 3 gün içerisinde Enstitüye bildirilir./
- Tezi hakkında düzeltme verilen öğrenci en geç üç ay içinde Jüri'nin istediği düzeltmeleri yaparak, tezini aynı jüri önünde yeniden savunur./
- Tezi Reddedilen Öğrencinin durumu ile ilgili karar, Anabilim Dalı Kurul Kararı , Anabilim Dalı Başkanlığı'nın önerisi üzerine Enstitü Yönetim Kurulu Kararı ile verilir.
- Tez sınavında başarılı olan ve diğer koşullar sağlayan doktora öğrencisi, Tezini ilgili Enstitünün istediği formatta danışmanın oluru ve Anabilim Dalı Başkanlığı'nın üst yazısı ile 2 adet kitap, 2 adet CD şeklinde Enstitüye teslim eder. Tezi şekil yönünden uygun bulunan yüksek lisans öğrencisine, yüksek lisans diploması verilir. Ayrıca; Avrupa Kredi Transfer Sistemi (AKTS) ile uyumlu diploma eki de öğrenciye verilir./

(Tez kitabına konulacak olan)

YÜKSEK LİSANS TEZ SINAVI TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Alican GÜMÜRDÜ 'nün Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı **“KÖK HÜCRE UYGULAMASININ SIÇAN MODELİNDE İN VİTRO FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİLERİ”** başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğini ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek **KABUL** kararı verilmiştir. **01/09 /2014.**

İmza

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU (Tez Danışmanı)

.....

Prof. Dr. Sevinç İNAN

.....

Prof. Dr. Tuncay VAROL

.....

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../.... tarih ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim TUĞLU
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez projemi destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Dekanlığına;

Tezimin gerçekleşmesinde bana her zaman yol gösteren, göstermiş olduğu özveri ve katkıların ötesinde, yüksek lisans eğitimim boyunca üzerimden manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. İbrahim TUĞLU'ya

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini en verimli şekilde aktaran ve her konuda yardımcı olan öncelikle Histoloji-Embriyoloji Anabilim Başkanı Sayın Prof. Dr. Sevinç İNAN'a, Sayın Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Sayın Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER hocalarıma,

Çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Anatomi AD. Başkanı Prof.Dr. Tuncay VAROL, Anatomi AD öğretim Üyesi Doç. Dr. Enis CEZAYİRLİ ve Farmakoloji AD Öğretim Üyesi Doç. Dr. Kamil VURAL'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Deney hayvanlarının temini ve uygulamaların yapılmasında destek sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi ve çalışanlarına,

Deney hayvanlarının cerrahi işlemleri ve laboratuvar çalışmaları sırasında yardımını esirgemeyen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji A.D. yüksek lisans öğrencisi arkadaşım Uzm. Bio. Işıl AYDEMİR, Uzm. Bio. Fatma ÖZTÜRK ve İsmail ÇAYLI'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım ve eğitimimde pay sahibi, aynı zamanda meslektaşım olan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji A.D.'daki diğer tüm uzman-asistan arkadaşlarıma ve ayrıca histoloji bölümünün hayatıma kazandırdığı gerçek dostlar olan Uzm. Bio. Mahmud ÖZKUT ve Araş. Gör. Tuna ÖNAL'a ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca gerek sağlam kişiliği ve karakteri açısından örnek aldığım ve beni bu günlere getirmek için maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen CANIM ANNEME ve annem kadar bana sahip çıkan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ablamlar Aslı ÇETİNKAYA Duygu ŞENÇAMLAR'ya ve biricik yiğenim Ege ÇETİNKAYA'ya ayrıca teşekkürü borç bilir ve sonsuz minnetimi sunarım.

ÖZET

Günümüzde artan bir şekilde sorun haline gelen çocuk sahibi olamama durumu, geliştirilen yeni tekniklerle aşılmaya çalışılmaktadır. Bu tekniklerin önemli bir tanesi ise fertilizasyonun laboratuvar koşullarında sağlandığı in vitro fertilizasyon (İVF) olup başarı oranı maalesef hala yeterli değildir. Bu başarının artırılması için değişik besiyeri, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi etkenler ile daha iyi sonuç elde edilmeye çalışılmaktadır. Kök hücreler organizmanın kendi bünyesinde bulundurduğu kolayca elde edilen ve faktörler aracılığı ile yönlendirilen öncül hücrelerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerin bizatihi kendilerinin dışında salgıladığı faktörler ile niş denilen bir mikroçevre oluşturarak özellikle kanser hücrelerinde olmak üzere diğer hücreleri olumlu yönde etkiledikleri bilinmektedir. Bu çalışmada sıçanlardan toplanan oositler, kök hücre ortamında ve kök hücrenin beklediği besiyeri ile muamele edilerek fertilizasyona etkisi ve embriyo gelişimine etkisi saptandı. Kök hücre mikroçevresinin fertilizasyon üzerine etkileri ilgili parametrelerle ortaya konup daha kaliteli bir embriyo ve daha başarılı bir gelişim saptanmaya çalışıldı.

Bu çalışmada, erişkin ve ortalama ağırlıkları 250 ± 50 gr wistar sıçanlar kullanıldı. Erkek ve dişi sıçanlardan alınan sperm ve oositler kök hücre niş etkisine maruz bırakılarak oluşan değişiklikler olgunlaşma açısından incelendi. Dişi sıçanlar süperovulasyon yapılan ile yapılmayan olarak iki gruba ayrıldı. Bu iki gruptaki sıçanlardan toplanan oositler İTSBY (İnsan Tubal Sıvı Besiyeri), SSBY (Single Step Besiyeri), AMBY (Alfa-MEM Besiyeri) ve KİMKHBY (Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Besiyeri) içerisine eşit miktarlarda olacak şekilde oositler paylaştırıldı. Erkek sıçanlarda epididimisten spermler toplanarak kriterler açısından değerlendirildi. Bu spermler oositlerin buldukları besiyerleri içerisine ortalama bin sperm olacak şekilde sperm solüsyonu eklendi. İVF yapılan örneklerde oluşan embriyolar on birinci güne kadar izlendi. Fertilizasyon ve embriyo gelişimine etkileri ile arrest, dejenerasyon oranları ve canlılığı süren embriyoların durumları ortaya kondu.

Çalışmamızda İTSBY, SSBY, AMBY ve KİMKHBY'ne maruz bırakılan oositlerde sıfır ile dokuzuncu günler arasındaki süreçte oosit olgunlaşması, iki ile on altı hücreli ve morula safhasında embriyoların oluştuğu gözlemlendi. Aynı şekilde spermlerin hareket, sperm

kalitesi ve canlılığı yönünden etkileri ortaya kondu. Olgunlaştırılan germ hücrelerinin fertilizasyon ve embriyo gelişimine etkisi AMBY besiyerinde çok az iken, İTSBY ve SSBY besiyerlerinde daha iyi olduğu ancak en iyi etkinin KİMKHBY ile olduğu gözlemlendi. Kök hücre nişinin, oosit ve sperm olgunlaşmasına, kalitesine ve canlılık süresini uzatmasına önemli etkisinin olduğunu gözlemledik. İVF açısından da KİMKHBY embriyo kalitesine ve canlılığına önemli ölçüde katkı sağladığını gösterdik.

Sonuç olarak kök hücre uygulamalarının infertiliteye yönelik tedavi için bir umut olmakla kalmayıp koruyucu bir yaklaşım olarak kullanılabilceği görüldü. Ayrıca mezenkimal kök hücre tedavisinin zarar vermeme anlamında etkinliği ve güvenilirliği çalışmamızın sonuçlarını daha da önemli hale getirmektedir. Kök hücre uygulamalarının germ hücrelerine yaptığı etkilerin mekanizmalarının anlaşılması İVF için hala yeterli olmayan başarının artmasını sağlamada büyük önem taşıyacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri, İn Vitro Fertilizasyon, Testis, Ovaryum, Oosit, Sperm, Süperovulasyon.

ABSTRACT

Nowadays, the inability to have children is an important problem that is trying to overcome with the development of new techniques. The important one of these techniques is in vitro fertilization (IVF), fertilization is performed under laboratory conditions, unfortunately success rate still is not enough. To increase the success in IVF, different media, factors such as growth factors and hormones are used. Stem cells are settled in the organism and the precursor cells directed through factors, also derived easily. Recently, it is known that stem cells create a microenvironment called 'niche' by secreting factors such as growth factors and affect positively the other cells, especially cancer cells.

In this study, effects of stem cells and niche on fertilization and development of embryo were detected by exposing the stem cell and niche with oocytes collected from rats. The effects of stem cell microenvironment on fertilization were tried to determine by related parameters whether there is a increasing in the development of embryo and quality embryo. In our study, adult Wistar rats weighing 250 ± 50 g were used. Sperm and oocytes harvested from male and female rats were exposed to stem cell niche and effects of niche on maturation were examined. Female rats were divided into two groups including control and superovulation. Oocytes from both two groups were treated with Human Tubal Fluid Media, Single Step Media, alpha-MEM Media and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Media. Sperm collected from male rat epididymis were assessed in terms of criteria. Per thousand sperm with solution were added into the media including oocytes. Embryos occurred with IVF were followed up to the eleventh day, and arrest, degeneration rates and alive embryos were established. After treatment, oocyte maturation, embryos at two or sixteen-cell and morula stage were observed between day 0 and day 9. Similarly treatment of the different media on the viability, quality and movement of sperm were searched. The effect of alpha-MEM Media on fertilization and embryo development was decreased while Single Step Media and Human Tubal Fluid Media were more better respectively. The most optimal effect was occurred by Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Media. It was ascertained that stem cell niche affected maturation, quality and viability of oocytes and sperm.

Consequently, we supposed that application of stem cells might be used in the case of infertility. Additionally, results of our study are more important in that mesenchymal stem cell therapy was not occur damages. Understanding the mechanisms of efficiency of stem cell applications to germ cells will be fundamental step to enhance the succes of IVF.

Key Words: Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell, In Vitro Fertilization, Testis, Ovary, Oocyte, Sperm, Superovulation.



SİMGELER ve KISALTMALAR

µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ABD	Amerika Birlesik Devletleri
AMBY	Alfa-MEM Besiyeri
BMP-15	Bone Morphogenic Protein 15 – Kemik Morfogenik Protein 15
BMSC	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell
CD44	Cluster of Differentiation 44
CD90	Cluster of Differentiation 90
CFU-F	Colony Forming Unit Fibroblast
CO ₂	Carbon dioxide- Karbon Dioksit
CSF	Cytostatic Factor- Sitostatik Faktör
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E2	Estradiole- Östradiol
ECS	Endometrial Stromal Cells-Endometriyal Stromal Hücreler
EGF	Epidermal Growth Factor- Epidermal Büyüme Faktörü
EKH	Embriyonk Kök Hücreler
e-NOS	Endotelial Nitric Oxid Sentetase, Endoteliyal Nitrik Oksit Sentetaz
FBS	Fötal Bovin Serum
FCS	Fetal Calf Serum-Fötal Buzağı Serumu
FGF-2	Fibroblast Büyüme faktör-2
FITC	Floresein izotiyosiyanat
FSH	Follicle Stimulating Hormone-Folikül Uyarıcı Hormon
FSH β	Follicle Stimulating Hormone β -Folikül Uyarıcı Hormon β
GDF-9	Growth Differentiating Factor 9
GFP	Green Flouresans Protein- Yeşil Floresan Proteini
GIFT	Gamete Intrafallopian Transfer
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone-Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GnRH _a	Gonadotropin Releasing Hormone Agonisti

GV	Germinal Vezikül
GVBD	Germinal Vesicle Break Down- Germinal Vezikül Yıkımı
HCG	Human Coryonic Gonadotrophin-İnsan Koriyonik Gonadotropini
H-E	Hematoksilen-Eozin
hMG	Human Menopausal Gonadotropin-İnsan Menopozal Gonadotropin
ICAM-1	İntersellular Adhesion Molecule 1- Hücrelerarası Adezyon Molekül 1
IFN	İnterferon
IGF	Insuline-like Growth Factor-İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGF-1	Insuline-like Growth Factor-1-İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IGF-1R	Insuline-like Growth Factor 1 Reseptor-İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IGF-2	Insuline-like Growth Factor-2-İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2
IL1:	İnterleukin 1- İnterlökin 1
IL6:	İnterleukin 6- İnterlökin 6
i-NOS	İnducible Nitric Oxid Sentetase, İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
ISCT	International Society of Cell Treatment- Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
İTSBY	İnsan Tubal Sıvı Besiyeri- İnsan Tubal Sıvı İçeren Besiyeri
IU	International Unit
IUI	Intra Uterin Insemination-İntra Uterin İnseminasyon
IVF	İn Vitro Fertilisation, İn Vitro Fertilizasyon
IVM	İn vitro maturasyon
KD	Kilo Dalton
KİMKH	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri
KİMKHBY	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Besiyeri
KOH	Kontrollü Over Hiperstimülasyonu
LH	Luteinazing Hormone-Luteinizan Hormon
LIF	Leukemia İnhibition Factor-Lösemi İnhibe Edici Faktör
MAPK	Mitogen Activated Kinase –Mitojenlerden Aktive Edilmiş Protein Kinaz
mg	Miligram
MI	Metafaz 1
MII	Metafaz 2
MPF	Maturation Proceed Factor-Olgunlaşmayı İlerletici Faktör

MPF	Maturation Promoting Factor
NO	Azot Monoksit
NO ₂	Azot Dioksit
OHSS	Ovarian Hyperstimulation Syndrome-Ovaryum Hipersitümlasyon Sendromu
OKK	Oosit- Kumulus Kompleksi
OMI	Oocyte Maturation Inhibitor-Oosit Olgunlaşma İnhibitörü
OPU	Oosit pick-up
P1	Profaz 1
PAS	Periodic Asid Schiff
PGH	Primordiyal Germ Hücresi
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PVB	Perivitellin boşluk
PZD	Partial Zona Dissection-Kısmi Zona Disseksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
SKH	Spermatogoniyal Kök Hücre
SO	Süperovulasyon
SSBY	Single Step Besiyeri
SUZI	Subzonal Sperm İnsemination- Zona altı Sperm İnseminasyonu
TET	Tubal Embryo Transfer-Tubal Embriyo Transferi
TGF	Transforming Growth Factor
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF	Tumor Necrosis Factor-Tümör Nekroz Faktör
uFSH	Urinary Follicle Stimulating Hormone-İdrardaki Folikül Uyarıcı Hormon
ÜYTE	Üremeye Yardımcı Tedavi
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1-Damar Hücreleri Adezyon Molekülü 1
VEGF A	Vascular Endothelial Growth Factor A -Vasküler Endotelial Büyüme Faktör A
WHO	World Health Organization-Dünya Sağlık Örgütü
ZIFT	Zygote Intrafallopian Transfer
ZP1	Zona Pellusida 1
ZP2	Zona Pellusida 2
ZP3	Zona Pellusida

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.4.2.1.1.Primordiyal folikül

Resim 1.4.2.3.1. Sekonder folikül

Resim 1.4.2.4.1. Ovaryum korteksinde graff folikülü

Resim. 2.1.1. Sıçan menstueal siklus görüntüleri

Resim 2.2.1. Sıçanlardan toplanan profaz I, metafaz I ve metafaz II oosit örnekleri,

Resim. 2.6.1. Primordiyal ve primer folikül

Resim 2.6.2. Sekonder folikül

Resim 2.6.3. Tersiyer (graff) folikül

Resim 2.7.1. Ovaryum örneklerinin in vivo alınışı ve oosit eldesi

Resim 2.7.2. Erkek sıçandaki testis görüntüleri

Resim 2.8.3.1. Embriyoların çeşitli embriyonik fazlardaki görüntüleri

Resim 2.9.1. Grade A ve Grade B embriyoların görüntüleri

Resim 3.1.1 KİMKH'lerin kültür ortamında yerleşip, çoğalmış 4. pasajdaki hücrelerin görüntüleri.

Resim 3.1.2 KİMKH'lerin Stro-1 antikor ile boyanmamış pozitif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı.

Resim 3.1.3 KİMKH CD90 antikor ile boyanmamış negatif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı.

Resim 3.2.1 Östrus siklusunda olan sıçan ovaryum alınan kesitlerin görüntüleri.

Resim 3.3.1 Oositlerin x100'lük büyütmedeki morfolojik görüntüleri.

Resim 3.3.2 Oositlerin x200'lük büyütmedeki morfolojik görüntüleri.

Resim 3.4.1 Spermlerin x100'lük büyütmedeki morfolojik görüntüleri.

Resim 3.4.2 Spermlerin çeşitli besiyerlerindeki morfolojik görüntüleri.

Resim 3.5.1. Kültür ortamında oositlerin değişik by etkisinde 100'lük mikroskobik büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.5.2. Üçüncü günde kültür ortamında oositlerin değişik by etkisinde 100'lük mikroskobik büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.5.3. Kùltür ortamında oositlerin değişik by etkisinde 200'lük mikroskopik büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.5.4. Kùltür ortamında embriyonun x100'lük, x200'lük, x400'lük büyütmelerdeki görüntüleri.

Resim 3.5.5. Altıncı günde kùltür ortamında oositlerin değişik by etkisinde 100'lük mikroskopik büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.5.6. Altıncı günde KİMKBHY kùltür ortamında embriyonun x100'lük, x200'lük, x400'lük büyütmelerdeki görüntüleri.

Resim 3.5.7. Dokuzuncu kùltür ortamında oositlerin KİMKBHY etkisinde çeşitli mikroskopik büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.5.8. Dokuzuncu günde KİMKBHY kùltür ortamında embriyonun x100'lük, x200'lük ve x400'lük büyütmelerdeki görüntüleri

Resim 3.6.1. HCG verilmiş dişi sıçanların ovaryumlarından alınan 5µ'luk kesitlerin H-E boyalı görüntüleri.

Resim 3.6.2. FSH ve HCG verilmiş dişi sıçanların ovaryumlarından alınan H-E boyalı görüntüleri

Resim 3.7.1. SO+ ovaryumdan toplanan oositlerin sıfırıncı günde kùltür ortamında x100'lük büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.7.2. SO+ ovaryumdan toplanan oositlerin sıfırıncı günde kùltür ortamında x200'lük büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.7.3. Kùltür ortamında fertilize olmamış oositlerin x100'lük büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.7.4. Üçüncü günde kùltür ortamında oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.7.5. Üçüncü günde kùltür ortamında çeşitli oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.7.6. Üçüncü günde kùltür ortamında oosit ve embriyoların x200'lük büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.7.7. Altıncı günde kùltür ortamında oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.7.8. Altıncı günde kültür ortamında oosit ve embriyoların x200'lük büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.7.9. Altıncı günde kültür ortamında çeşitli oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri.

Resim 3.7.10. Dokuzuncu günde kültür ortamında oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri.



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.3.3.1. Ovaryumların gelişimi

Şekil 1.3.2.1 Ovaryum anatomisi

Şekil 1.3.2.2. Kadın iç genital organlarının arterleri; arka taraftan görünüş

Şekil 1.3.3.1. Ovaryum histolojisi

Şekil 1.4.1.1. Oositin ince yapısı

Şekil 1.6.1. Testisin genel histolojik görüntüsü



TABLO DİZİNİ

Tablo 1.3.4.1. Follikül düzenlenmesi kapsamında rol alan başlıca büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri.

Tablo.2.2.1. Wolf ve arkadaşlarının (1988) oosit-kumulus kompleksi için inceleme sistemi.

Tablo 2.3.1.1 Parafin doku takip protokolü

Tablo 2.4.1.1. H-E boyama protokolü.

Tablo 3.1.1. KİMKH CD90, CD44 ve Stro-1 tanımlanmasının skorlama ile analizinde hücrelerimizin tanımlamaları doğrulandı.

Tablo 3.3.1. BY uygulamasının OKK üzerine etkileri.

Tablo 3.3.2. AMBY, SSBY, İTSBY, KİMKHBY'lerine bırakılmış oositlerin üç ile dokuzuncu gün arasındaki zaman içerisindeki besiyerlerindeki dejenerasyonlarının değerlendirilmesi.

Tablo 3.4.1. BY uygulamasının sperm üzerine etkileri. BY uygulamasının sperm üzerine etkisi incelendiğinde KİMKHBY anlamlı bir şekilde olumlu etki gösterdiği en iyinin +1 ve en kötünün +5 olduğu skorlama ile görüldü.

Tablo 3.4.2. AMBY, SSBY, İTSBY ve KİMKHBY ile muameleye bırakılan spermilerin BY içerisindeki dejenerasyonları değerlendirilmesi.

Tablo 3.5.2. Alfa-MEM Besiyeri (AMBY), Single Step Besiyeri (SSBY), İnsan Tubal SıvıBesiyeri (İTSBY), Kemik iliği Mezenkimal Kök Hücre Niş Besiyeri (KİMKHBY)'lerine bırakılmış oositlerin üç ile dokuz gün arasındaki zaman içerisindeki besiyerlerindeki dejenerasyonlarının değerlendirilmesi.

Tablo 3.6.1. Süperovulasyon Uygulamasının OKK Üzerine Etkisi.

Tablo 3.7.1. Süperovulasyon Yapılmış Dişi Sıçanlardan Toplanan Oositlerin Fertilizasyon Oranı, Profaz I Ve Metafaz II Oosit Miktarları Ve Dejenere Oosit Miktarları.

Tablo 3.7.2. Oositlerin AMBY, KİMKHBY, SSBY, İTSBY'de 0, 3, 6, 9 ve 11. günlerdeki yaşama süreçleri ve besiyerlerinin oosit yaşam süreçlerine etkisi.

Tablo 3.7.3. Oosit olgunluğunun gruplara göre yüzde dağılımı.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
RESİMLER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLO DİZİNİ	XIII
İÇİNDEKİLER.....	XVI
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Genel Bilgiler.....	2
1.2 Üreme Ve İnfertilite	3
1.2.1. İnfertilite Nedenleri.....	6
1.2.2. İnfertililerde Kök Hücrenin Yararı	7
1.3 Üreme Organları Embriyolojisi, Anatomisi Ve Histolojisi.....	9
1.3.1 Ovaryum Embriyolojisi	9
1.3.2. Ovaryum Anatomisi	11
1.3.3. Ovaryum Histolojisi Ve Foliküler Gelişim	13
1.3.3.1. Epitel Ve Tunika Albuginea.....	14
1.3.3.2. Ovaryum Korteksi.....	15
1.3.3.3. Ovaryum Medullası.....	15
1.3.4.Ovulasyon Ve Moleküler Mekanizmaları	16
1.4. Kemirgenlerde Oositin Yapısı Ve Oositte Gerçekleşen Olaylar.....	19
1.4.1. Oositin Genel Yapısı.....	24

1.4.2 Folikül Gelişimi	27
1.4.2.1 Primordiyal Foliküller	28
1.4.2.2. Primer Foliküller	29
1.4.2.3 Sekonder Foliküller	30
1.4.2.4. Olgun Folikül (Graaf Folikülü).....	32
1.5.Kontrollü Ovaryum Hiperstimülasyonu (KOH).....	32
1.5.1.Koh Tedavisinde Kullanılan Ajanlar.....	34
1.6. Testisin Genel Histolojik Yapısı.....	36
1.6.1.Seminifer Tübüller	37
1.6.2. Spermatogenez	37
1.6.3.Spermiyogenez.....	38
1.7. İn Vitro Fertilizasyon (Ivf).....	40
1.7.1. IVF Tarihi.....	40
1.7.2 Deneysel IVF.....	40
1.8. Mezenkimal Kök Hücreler.....	43
1.8.1. MKH Tanımlama	44
1.8.2.Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları	45
1.8.3.Fiziksel Özellikler Ve İn Vitro Çoğaltılma	46
1.9. Amaç	47
2. MATERYAL VE METOD	48
2.1 Vaginal Yayma Preperat Hazırlanması Ve Grupların Oluşturulması	48
2.2. Örneklemeye	50
2.3. Östrüs Grubuna Ait Over Örneklerinin Histolojik Değerlendirilmesi	53
2.4. Histokimyasal Bulgular.....	54

2.4.1.Hematoksilen-Eozin Boyama	54
2.5.Kontrollü Ovaryum Hiperstimülasyon (KOH) Protokolü	55
2.6. Folikül Sayımı Ve Tanımlaması.....	55
2.7. Oosit, Sperm Ve Embriyo Kültürü.....	57
2.8. IVF Protokolü.....	59
2.8.1. İnseminasyon	59
2.8.2. Zigotlar	59
2.8.3. Embriyo Kültürü.....	59
2.9. Embriyo Morfolojisinin Belirlenmesi	60
2.10. Mezenkimal Kök Hücrelerin Fonksiyonel Tanımlanması	61
2.10.1. Belirteçlerin İmmunohistokimyasal Yolla Gösterilmesi	61
2.10.2. Kemik İliği Stromal Kök Hücre Kültürü	62
2.10.3.Kök Hücre Tanımlaması İçin STRO-1 İle CD44 İmmunohistokimyası.....	62
2.11. Fertilizasyon Kriterleri Ve Oosit Olgunlaşması.....	63
3.BULGULAR.....	64
3.1. KİMKH Tanımlanması.....	64
3.2. Süperovulasyon Yapılmamış Ovaryumdaki Hücre Durumu	68
3.3. Oosit Eldesi Ve Olgunlaşması	69
3.4. Sperm Eldesi Ve Olgunlaşması	73
3.5.Süperovulasyon Yapılmayan Sıçanlardan Alınan Oositlerin Kültür Ortamında Sperm İle Birlikteliğine Besiyeri Etkisi.	76
3.6. Süperovulasyon Grubu Ovaryumdaki Hücre Durumu	86
3.7. Süperovulasyon Grubuna Ait Oosit Ve Sperm Eldesi Ve Tanımlanması	88
4 .TARTIŞMA.....	102

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	110
KAYNAKÇA.....	111



1. GİRİŞ

Modernleşen dünyada çevresel faktörler üreme hücreleri üzerine gittikçe artan bir şekilde olumsuz etki göstermektedir. Üreme hücrelerinin fertilizasyonu erkek genital organlarında başlayan bir sürecin dişi genital organlarında devam etmesi, tubanın ampullasında oosit ile spermin buluşmasına bağlıdır. Spermier epididimis, uretra, vajinadaki douglas çukuru, serviks ağzı, uterus lümeni ve tubanın fallop tüpü üzerinden ampullasına kadar geçen sürede birçok farklı hücrenin etkisine uğramakta ve bu şekilde olgunlaşmakta hem de oositin kumulus ooforus hücreleri ile birlikte ampulladaki epitel hücreleri ile ilişkiye girmektedir. Birçok farklı hücrenin etkileşmesi sonrasında gerçekleşen fertilizasyon bu hücrelerden aldığı sinyaller sonrasında embriyonun gelişmesini sağlayan birçok farklı mekanizmayı gerçekleştirmektedir. Fertilizasyon dediğimiz durum bu hücrelerin etkileşmesindeki eksikliklere bağlı oluşmaktadır. Kök hücre uygulaması ile amaçlanan kök hücrenin kendi oluşturduğu sinyaller ve çevreye gönderdiği uyarılar sonucu bu eksik olan etkileşmelerin yeniden sağlanmasıdır. Sağlıklı bir embriyonun gelişmesi için in vitro olarak kültür ortamında kullanabileceğimiz arası etkileşimlerin sayesinde gerçekleşmektedir. Sağlıklı bir embriyonun gelişmesi için in vitro olarak kültür ortamında kullanabileceğimiz 3 önemli parametre bulunmaktadır. Bunlar; spermin oosit ile füzyonu sonucu fertilizasyonun oluşması, klivaj denilen oluşan zigotun mitotik bölünmeler sonucu 128 ila 256 hücre aşamasına geldiği bölünmeler ve embriyonik cisim denilen embriyonun gelişim durumu parametreler olarak kullanılmaktadır (Opiela J, Samiec M. 2013).

IVF çalışmalarında kök hücrelerden germ hücresi oluşturulması dışında bir uygulama düşünülmemiş ve kök hücrelerin buluşturuldukları niş ortamının klinik uygulamalar için kullanılmamıştır. Oysaki özellikle erişkin kemik iliğinden kök hücre toplanması, kültüre edilmesi ve çoğaltılması günümüzde var olan teknoloji ile son derece basit bir uygulamadır (Sağsöz ve ark. 2008). Birçok farklı kök hücre elde edilebilmesine karşın erişkin kemik iliği kök hücresi her türlü hücreye dönüşebilen, ideal mikroçevre oluşturabilen ve kültür ortamında hızla çoğalabilen bir hücre grubudur (Pittenger, M.F. ve ark, 2002). Bu çalışmadan alınacak bilimsel verilerin sonucunda eğer fertilizasyona olan başarısı ortaya konursa klinikte rahatlıkla kullanılabilirse bir uygulama olacaktır. Kök hücrelerin buluşturuldukları mikroçevrenin özellikle kanser hücrelerinde olumlu etkileri çalışılmış olmasına karşılık germ hücreleri üzerindeki etkileri ve fertilizasyon ile ilişkileri literatürde

bulunmamaktadır. Bilim hayatına kazandıracığımız bu verilerin germ hücre oluşması, olgunlaşması ve farklılaşması açısından oldukça önemli katkılar sağlayacaktır.

1.1.Genel Bilgiler

Ovulasyon çeşitli fizyolojik mekanizmalar içinde bulundurmakta olup, sağlıklı gebeliğin elde edilmesi için bu mekanizmalar önemli yer teşkil etmektedir. Bu süreçlerin devamını sağlayan faktörlerden biri ya da birkaçının bulunmaması, infertilite ile sonuçlanmaktadır. Ovulasyon, graaf folikülünde oosit mayozunun yeniden aktifleştiği, folikül duvarının apikalinde stigmanın oluşumu ile sekonder oositin atıldığı ve korpus luteumun şekillenmesi ile dokunun yeniden yapılanmasının başladığı kompleks bir olaydır (Gandolfi F ve ark. 2005). Ovaryum döngüsünde; foliküler evrede primordiyal folikülden, primer, sekonder ve graaf folikülü gelişmektedir. FSH (Follicle Stimulating Hormone, Follikül Uyarıcı Hormon) etkisiyle gelişen follikülden, LH (Luteinizing Hormone, Luteinizan Hormon)'ın pik yapması ile oosit I. mayoz bölünmeyi ovulasyondan hemen önce tamamlar (Pepling M ve ark. 2001). Atılan sekonder oosit ovaryuma çok yaklaşmış olan tuba uterinanın fimbriyal uçları ile alınır ve bir spermium ile karşılaşır ampulla bölgesinde fertilizasyon gerçekleşir. Oluşan zigot bölünerek, 2, 4, 8, 16, 32 hücreli embriyo, morula ve blastosist evrelerinden geçerek olgunlaşır (Sarani S. Ve ark. 1999).

Günümüzde artan bir şekilde sorun haline gelen çocuk sahibi olamama durumu geliştirilen yeni tekniklerle aşılmaya çalışılmaktadır. Bu tekniklerin önemli bir tanesi fertilizasyonun labratuar koşullarında sağlandığı in vitro fertilizasyondur. İn vitro fertilizasyon başarı oranı maalesef hala % 30 civarındadır. Bu başarının artırılması için değişik besiyeri, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi etkenler ile sonuç elde edilmeye çalışılmaktadır. Kök hücreler organizmanın kendi bünyesinde bulundurduğu kolayca elde edilen ve faktörler aracılığı ile farklılaştırılabilen öncül hücrelerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerin bizatihi kendilerinin dışında salgıladığı faktörler ile niş denilen bir mikro çevre oluşturarak özellikle kanser hücrelerinde olmak üzere diğer hücreleri olumlu yönde etkiledikleri bilinmektedir (Hugues JN ve ark. 2002).

IVF çalışmalarında kök hücreler germ hücresi üretmek dışında bir uygulama düşünülmemiş kök hücrelerin buluşturuldukları niş ortamının klinik uygulamalar için kullanılmamıştır. Oysaki özellikle erişkin kemik iliğinden kök hücre toplanması, kültüre

edilmesi ve çoğaltılması günümüzde var olan teknoloji ile son derece basit bir uygulamadır. Birçok farklı kök hücre elde edilebilmesine karşın erişkin kemik iliği kök hücresi her türlü hücreye dönüşebilen, ideal mikroçevre oluşturabilen ve kültür ortamında hızla çoğalabilen bir hücre grubudur. Bu çalışmadan alınacak bilimsel verilerin sonucunda eğer fertilizasyona olan başarısı ortaya konursa klinikte rahatlıkla kullanılabilirse bir uygulama olacaktır (Opiela J, Samiec M. 2013).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), olgun organizmalardaki dokularda oldukça çeşitli bir şekilde sınıflandırılmakta olup, MKH'ler içerisinde monosit kemotaktik protein, Vasküler Endotelial Büyüme Faktör A (VEGF A) , Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Fibroblast Büyüme faktör-2 (FGF-2), İnterlakün-6, Lösemi İnhibe Edici Faktör (LIF), Dönüştürücü Büyüme Faktör- β (TGF- β) gibi buna benzer çoğu faktörü yapısında bulundurur. Biyoaktif faktörlerin foliküler büyümeyi ve sıçan oositlerinin in vitro maturasyonu buradaki büyüme faktörleri bu hücreler üzerinde besleyici bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Ancak mezenkimal kök hücreler ile oosit-kumulus kompleksi (OKK) kültüre edilen bazı mayoz II oositleri bu kültür içerisinde bu oositleri geliştirilmesine rağmen meydana gelen bölünme sonucu aktive edildikleri düşünülmektedir. Daha sonraki gözlemlerde MKH'ler için kullanılan besiyeri içerisinde bulunan sitokinler ve büyüme faktörleri hücrelere uyarıcı etki yaptıkları saptanmıştır. Bu yüzden, MKH'ler için kullanılan uygun besiyerinin implantasyondan önce fare oositini partenogenetik bir şekilde aktive edebilmekte ve embriyo gelişimini hızlandırmaktadır (Feng D.Q. ve ark. 2009).

Bizim çalışmamızda MKH kendi ve besiyeri içerisindeki farklılaşma faktörleri, büyüme faktörleri gibi etken maddelerin sıçan in vitro fertilizasyonuna ne gibi etki yapacağı konusu araştırıldı. Kök hücrelerin buluşturuldukları mikroçevrenin özellikle kanser hücrelerinde olumlu etkileri çalışılmış olmasına karşılık germ hücreleri üzerindeki etkileri ve fertilizasyon ile ilişkileri literatürde bulunmamaktadır. Bilim hayatına kazandıracığımız bu verilerin germ hücre oluşması, olgunlaşması ve farklılaşması açısından oldukça önemli katkılar sağlayacaktır (Feng D.Q. ve ark. 2009, Dominici M. ve ark. 2001).

1.2. Üreme ve İnfertilite

İnfertilite, çiftlerin bir yıl süre zarfında herhangi bir korunma olmaksızın düzenli cinsel ilişkide (haftada iki gün) bulunmasına rağmen gebe kalamaması durumudur

(Kışınışı ve ark. 1996). Üreme çağındaki çiftlerde infertiliteye rastlanma oranı yaklaşık %10-15'tir. İnfertilitenin nedenleri ve sıklıkları toplumlara göre farklılık göstermektedir. Çiftlerin % 40-50' sinde kadın, % 30-40' ndan erkek, % 10-15 çiftte ise mevcut standart tanısı testler ile açıklanamayan infertilite mevcuttur (Kışınışı ve ark. 1996; Shoham et al. 1991). Günümüzde infertilitenin ortaya çıkmasında değişik etmenlerin rolünün hızlı bir şekilde artmasından dolayı bilim adamlarının ilgisi bu yöne doğru kaymış ve bu konuda değişik teknikler geliştirmişleridir. Bununla paralel yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesi, medyanın yardımcı üreme teknikleri hakkında bilgilendirdiği çiftlerin sayısındaki artış ve de bu konuyla ilgili yardım arayışı içinde olan çiftlerin başvurularındaki artışı sonucunda bu tekniklerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir (Speroff ve ark. 2007; Günaslan N. 2011).

İnfertiliteye çözüm olarak geliştirilen yardımcı üreme teknikleri; Intra Uterin İnseminasyon (IUI), Gamete İntrafallopian Transfer (GIFT), Zygote İntrafallopian Transfer (ZİFT), Tubal Embriyo Transferi (TET), In Vitro Fertilization (IVF), Partial Zona Dissection (PZD), Subzonal Sperm İnseminasyonu (SUZI) ve İntrastoplazmic Sperm İnjesiyonu (ICSI)' dur. Bunlardan IVF en sık kullanılan yöntemdir (Alyürük B, 2011).

Intra Uterin İnseminasyonu (IUI); İnfertilite tedavilerinde maliyetinin düşük ve etkili bir yöntem olmasından dolayı infertilite tedavilerinde ilk tedavi seçenek olarak kullanılır. IUI; Uterus içine, oosite yakın bir yere, bir kanül vasıtası ile laboratuvar ortamında işlemden geçirilmiş kaliteli spermelerin bırakılmasıdır (Akyüz, 2003). Böylece yoğunlaştırılmış ve motil spermeler fertilizasyon için doğal konumunun yakınına yerleştirilmiş olur (Alyürük B, 2011).

Gamet İntra Fallopian Transfer (GIFT); Sperm ve oositin tubanın ampulla bölgesine yerleştirilerek fertilizasyon oluşturulması esasına dayanır. En az bir adet normal fallop tüplerine ihtiyaç vardır. IVF' ten farkı fertilizasyonun in vivo olmasıdır böylece fertilizasyon doğal ortamda gerçekleşmiş olur (Alyürük B, 2011).

Zigot İntra Fallopian Transfer (ZİFT); Başarısız GIFT uygulamalarında, oositlerin fertilize olmadığı durularda ve önemli derecedeki erkek infertilitesi gibi fertilizasyonun azaldığı durumlarda tercih edilir. Tek dezavantajı hastanın iki kademeli operasyon geçirmek zorunda oluşudur (Alyürük B, 2011).

Tubal Embriyo Transferi (TET); 4-8 hücre sayısına ulaşmış döllenmiş oosit fallop tüplerine bırakılır. Spermin direkt olarak sitoplazma içine yerleştirilmesi esasına dayanır (Alyürük B, 2011).

IVF; IVF yöntemi, laboratuvar koşullarında oosit ve spermin döllenmesi demektir. Bir ya da daha fazla oosit ultrasonografi eşliğinde, iğne vasıtasıyla ve anestezi altında oositler toplanır. Erkeğin spermeleri ile laboratuvar ortamında oosit ile fertilize edildikten sonra döllenmiş embriyolar yaklaşık 3-5 gün sonra bir katater yardımı ile ana rahmine verilir (Aoto T ve ark. 2011). IVF yönteminin aşamaları; foliküllerin geliştirilmesi, oositlerin toplanması, spermelerin hazırlanıp oositlerin döllenmesi, gerekliyse embriyo zarının inceltmesi (assisted hatching yöntemi) ve embriyoların transferidir (Alyürük B, 2011).

IVF temel fizyoloji, morfoloji, gametlerdeki moleküler olayların ve devam eden etkileşimlerinin ve hayvanların üremelerinin infertilitesinin mutasyonlar tarafından betimlendiği önemli bir yaklaşımdır. IVF sıkça insan infertilite tedavileri ve evcil hayvanların çok sayıda embriyolarının üretimi için kullanılır (Aoto T ve ark. 2011). Sperm ve olgun, yaşlı olmayan oositler başarılı in vitro fertilizasyon için iki temel ihtiyaçtır.

Gebeliğin gerçekleşmesi için ilk aşama sağlıklı bir embriyonun sağlıklı bir endometriuma implantasyonudur. İmplantasyon, pek çok faktörün etki ettiği, hem embriyo hem endometriumun katıldığı karmaşık bir olaydır. Herhangi bir faktörün eksikliği veya bozukluğu implantasyona olumsuz etki edecektir. Sağlıklı kişilerde bile embriyonun endometriuma implantasyonu hayranlık uyandıran bir moleküler olaylar zinciridir. Son yıllarda infertilite tedavisinin yaygınlaşması ile gebeliğin ilk aşaması olan implantasyon ile ilgili sorular ve sorunlar artmış giderek daha fazla araştırmacı bu konuya eğilmeye başlamıştır. İmplantasyon biyolojisi üzerine pek çok çalışma ve deneysel araştırma bulunmaktadır. Tedavide kullanılan ilaçlar ve kullanım protokolleri her gün değişmekte ve optimum embriyo seçiminden optimum endometrial çevreye kadar her ayrıntı için detaylı çalışmalar yapılmaktadır. İnfertilite vakalarında uygulanan IVF tedavilerinin başarı olasılığını arttırmak için yine implantasyona etki eden faktörlerin iyi bilinmesi gerekmektedir. IVF çalışmalarında kullanılan ilaçların endometriuma etkilerini bilinmesi başarı olasılığını arttıracak ve hem çiftleri hem de doktoru doğru zamanda doğru ilaçlara yönlendirecektir. Embriyonun kompleks maturasyonu ve ötopik implantasyonu ile

sonuçlanacak olan preimplantasyon, embriyonun gelişimini ve embriyo-maternal etkileşim açısından reproduktif tıp için çok önemli bir durumdur (Pepling M. ve ark. 2001).

Yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) gelişmesiyle beraber infertilite ile ilgili pek çok probleme çözüm getirilmiş olmakla birlikte implantasyon ve gebelik oranları halen daha istenen düzeyde değildir. Oosit ve embriyo kalitesinin yanısıra ovulasyon indüksiyonunda kullanılan ilaçların uterin reseptivite üzerine etkileri tam anlamıyla bilinmemekte ve başarılı embriyo transferine rağmen implantasyonun düşük oranda gerçekleşmesi belki de bu kimyasallar nedeniyle olmaktadır (Pritts EA, Atwood AK. ,2002). İnfertilite nedeniyle tedavi alan kişilerde doğal olarak başarısızlıkla sonuçlanan gebelikler yanı sıra kullanılan ilaçların endometriuma etkisiyle de implantasyonun başarılı olamadığı düşüncesi mevcuttur. Çok sayıda folikül elde etmek amacıyla verilen ilaçlar ile bu amaca ulaşılmakta ancak gebeliğin belki de en hassas aşaması olan implantasyon dönemine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Belki de endometrium üzerine olumsuz etkiler ile fertilize olmayı başarmış embriyonun implantasyonu yine bu maddelerle engellenmektedir. Özellikle kullanımda yeni bulunan GnRH antagonistlerine yönelik bu konuda yapılmış araştırmalar kısıtlıdır (Hskowitz-Eldor J. ve ark 2000).

1.2.1. İnfertilite Nedenleri

İnfertilite nedenleri; biyolojik faktörler, yaşam biçimi faktörleri, çevresel faktörler ve fiziksel faktörler olmak üzere dört temel kısımda ele alınır. İnfertilite en sık fiziksel faktörlere bağlı olarak gözlenir. Bunlar; ovulatuvar bozukluk, tubal ve peritoneal faktörler ve erkek faktörleridir (Akyüz A. 2003). Bunların sıklığı yaşla birlikte değişmektedir. Genç kadınlarda ovulasyon bozuklukları çok siktir, tubal ve peritoneal patoloji genç ve yaşlılarda eşit sıklıktadır. Erkek faktörü ve açıklanamayan infertilite yaşlı çiftlerde daha sık olarak görülmektedir (Alyürük B, 2011).

Kadın doğurganlığı puberte başlar, yirmili yaşlarda zirveye ulaşır, menepoza kadar yavaş yavaş azalır ve menepozla son bulur. Yaşla birlikte erkeklerde sperm kalitesi, dişilerde ise oosit sayısı ve kalitesi düşmektedir (Montella K. R. Ve ark. 2000). Gebeliklerini otuzlu yaşlardan sonraya erteleyen kadınlarda fertilitedeki azalmaya bağlı olarak gebelik şansı da azalır (Akyüz, 2003; Dicker ve ark. 1991; Erdem ve Yıldırım, 2003; Eskenazi et al. 2003, Orshan, 2008; Plas et al. 2000).

Birden fazla cinsel partneri olan insanlar, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar açısından risk altındadır. Pelvik enfeksiyonlara müdahale edilmezse zamanla fallop tüpleri tıkanabilir veya daralabilir böylelikle fertilizasyon azalabilir (Orshan, 2008). Afrika; infertilite oranının en yüksek olduğu ülkelerin başını çekmektedir. Burada yapılan bir çalışmada, HIV enfeksiyon oranının infertil kadınlarda fertil kadınlara oranla önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır.

Genetik faktörlerin de infertiliteye etkisi olabileceği düşünülmektedir. Örneğin erkekte Klinefelter sendromu ve kistik fibrozis genetik kökenle ilgili olup kistik fibrozis bilateral vas deferens yokluğu ile ilgilidir. Kadında ise Turner sendromu olarak bilinen X kromozomlarından birinin bozuk ya da olmamasına bağlı olarak gelişen hastalık durumu infertiliteye neden olmaktadır (Koşar ve Özçelik, 2007; Orshan, 2008). Kadına ait nedenler (% 40-45) Ovulatuvar (% 30-40) Tubal/Peritoneal Faktör (% 20-40) Servikal ve İmmünolojik Faktörlerdir (% 1-2). Diğer faktörler arasında Erkeğe ait nedenler ikinci (% 30-40) ve açıklanamayanlar ise (% 10-15) üçüncü olarak gruplanır.

Obezite; erkekte testesteron seviyesinde azalmanın yanısıra semen kalitesinde düşmesine, kadında ise polikistik over sendromuna neden olarak infertiliteye sebep olmaktadır (Kort ve ark. 2006). Sıcaklık, travma, ışın gibi fiziksel çevre koşulları da fertiliteye karşı tehlike oluşturmaktadır. Ayrıca kimyasal etkenler ve stres, ekonomik düzey gibi psikolojik etkenler de kadın ve erkek infertilitesine neden olan çevresel faktörlerdendir (Orshan, 2008). Hava kirliliği, karbondioksit ve kurşun, nikel gibi metallere maruz kalmak sperm DNA harabiyetlerine neden olacağından erkek üremesi için toksiktir (Hassa H., 2003; Cemal H. ve ark. 2007).

1.2.2. İnfertillerde Kök Hücrenin Yararı

Germ hücrelerinin izole edilmesi ve laboratuvar koşullarında üretilerek pekçok çeşitli infertilite durumlarının tedavisinde etkili olarak kullanılabilir. İnfertilite tedavisinde in vitro proliferasyon yöntemi ile çeşitli yerlerden kök hücre kaynaklarına ulaşılması ve bunların germ hücrelerine farklılaştırılması ya da primordiyal germ hücreler (PGH) ve spermatogonial kök hücrelerden (SKH) doğrudan izolasyon yoluyla elde edilen hücreler infertilite için bir çözüm yolu oluşturabilirler. İnfertilite nedeniyle sağlık merkezlerine başvuran erkeklerin ortalama %5-20'sinin ejakulat örneğinde canlı sperme

raslanmamaktadır. Bu durum azospermi olarak adlandırılmakta olup obstrüktif ve daha sık olarak non-obstrüktif nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Yardımcı üreme tekniklerinde meydana gelen gelişmeler sonucunda bu hastaların testislerinde az sayıda bile canlı spermlerin elde edilebilmesi durumunda intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) yöntemi ile bu hastaların çocuk sahibi olma durumu ortaya çıkmıştır. Günümüz teknolojisine rağmen, non-obstrüktif tipte azospermik erkeklerde testislerinden canlı sperm elde etme şansı %50-60 civarını aşmamaktadır (Alyürük B. 2011). Yapılan histopatolojik çalışmalarda sadece erken evrede spermatogenezise ait germ hücrelerinin saptadığı ya da sadece sertoli hücrelerinin bulunduğu testiste spermatogenik aktiviteyi indüklemek ve spermatozoa elde etme çalışmaları günümüzde klinik açıdan hala başarıya ulaşamamıştır. Bu konuda deneysel olarak yapılan kök hücre çalışmalarının obstrüktif ve non-obstrüktif erkeklerde infertilite tedavisinde çeşitli kök hücre kaynaklarının spermatogenik seriye ait hücreleri tekrardan oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu görüşü ortaya konmaktadır (Cakıcı C ve ark. 2013).

Spermatogenezis SKH'lerin kendini yenilediği ve haploid spermatogonia'ya farklılaştığı karmaşık bir süreçtir. Memelilerde, bu süreç erkek germ hücreleri için fonksiyonel bir nişin bulunduğu (K. Kita ve ark. 2007) ve mitoz, mayoz ve spermiogenezisi gibi üç önemli olayın gerçekleştiği testisin seminifer tübüllerinde meydana gelir. Spermatogenezisin herhangi bir bölümünde meydana gelecek bir hata infertiliteye yol açabilir. Olgun testiste SKH'lerin testisin bazal membranına yakın alanda bulunur ve spermatogenezisde rol alırlar ve erkek yaşam süresi boyunca sürekli olarak sperm üretiminde görevlidir (M. Kanatsu-Shinohara ve ark. 2008). SKH'ler embriyo döneminde az farklılaşmış primordiyal germ hücrelerinin gonadal alana göç etmesi sonucunda oluşan diploid hücrelerdir (A. McLaren , 2003).

SKH'ler in vitro olarak erkek germ hücrelerine farklılaşma yeteneği ve in vivo yolla erek infertilitesini tedavi etme yeteneğinden dolayı erkek infertilitesi çalışmalarında kullanılan önemli bir hücredir. SKH'lere ek olarak embriyonik kök hücreler (EKH) de erkek infertilitesi çalışmalarında kullanılmaktadır. Fakat EKH'lerin getirdiği klinik ve etik sorunlardan dolayı günümüzde infertilite çalışmalarında kullanılmamaktadır. Kök hücre biyolojisinde önemli bir gelişme, infertile bireye özgü indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPS) keşfi infertilite üzerinde önemli yol katedeceği düşünülmektedir. Ayrıca

günümüzde yapılan infertilite ile ilgili kök hücre çalışmalarında kullanılan KİMKH testis içerisine enjeksiyonu sonucunda bu KİMKH'lerinin ya buradaki spermatogonial kök hücrelere farklılaştığı yada burada bulunan spermatogonial kök hücrelerin çoğalmasını indükleyici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Cakici C ve ark. 2013).

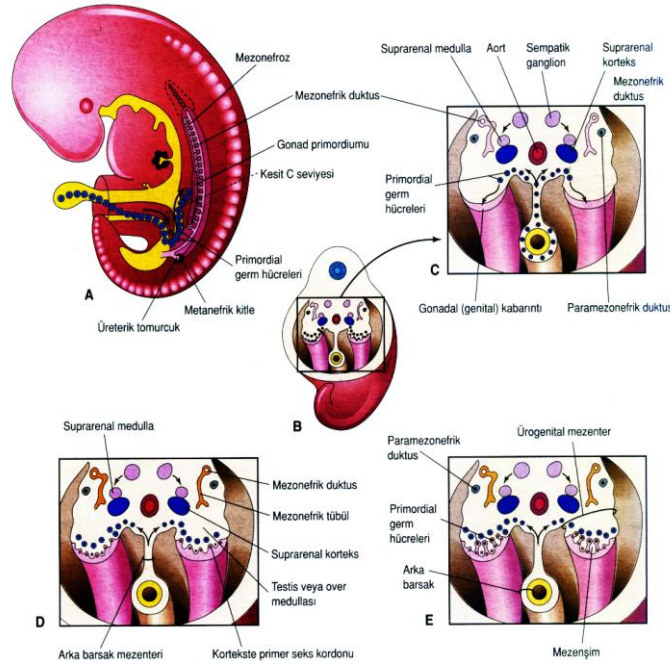
1.3 Üreme Organları Anatomisi, Histolojisi ve Embriyolojisi

1.3.1 Ovaryum Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak döllenme sırasında belirlenmesine rağmen; gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar, erkek ya da dişi yapısal özelliklere sahip değildir. Gonadlar başlangıçta sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş, bir çift uzunlamasına düzenlenmiş genital ya da gonadal kabartılar halinde belirirler. Gelişimin 6. Haftasına kadar genital kabartılar içinde germ hücreleri görülmez (Moore KL, 2002). İlk eşey hücreleri, gelişimin 4. haftasında vitellus kesesinin allontois'e yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında görülmeye başlarlar. Son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek, 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşır, 6. haftada da genital kabartıları işgal ederler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum ya da testis'e farklılaşmasında ilkel germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır. İlkel cins hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartıların epiteli çoğalır ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada ilkel cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kolonlar oluştururlar. Erkek ve dişi embriyolarda ilkel cins kordonları yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede, erkek ya da dişi gonadların birbirinden ayırt edilebilmesi olanaksızdır. Bu nedenle bu evreye farklılaşmamış dönem, gonad'a da farklılaşmamış gonad denir (Sadler T W, 2005).

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaştır. X kromozomları ovaryum'un gelişimi için genler içerir; ovaryum oluşmasında otozomal bir genin rol oynadığı bilinmektedir. 10. haftaya değin, ovaryumlar histolojik olarak ayırt edilemezler. İlkel seks kordonları dişi embriyolarda erkekteki kadar belirgin değildir (**Şekil 1.3.1.1**). Gonad taslağının medullasına kadar uzanırlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Normalde rete ovarii ve ilkel seks kordonları dejenere olarak ortadan kalkarlar ve yerlerini ovaryum medullasını oluşturan damarlı stromaya bırakırlar. Erken fetal

dönemde kortikal kordonlar denilen ikinci cinsiyet kordonları, gelişmekte olan gonadın yüzey sölom epitelinin başlayarak, alttaki mezenşime doğru gelişmeye başlar. Kortikal kordonlar sölom epitelinin çoğalmasıyla kalınlaşırken, ilkel cins hücreleri kordonların içine karışırlar. Yaklaşık 16. haftada bu kordonlar primordiyal folikül denilen ayrı hücre gruplarına bölünürler. Her grup ortada ilkel cins hücrelerinden köken alan bir oogonyum (oogonium) ve onun çevresinde, kortikal kordon epitelyum kökenli tek sıra yassı folikül hücrelerinden oluşur. Fetal dönemde milyonlarca oogonyum aktif olarak mitozla çoğalır. Doğum öncesi, oogonyumların bir kısmı dejenere olurken geri kalanı büyüyerek primer oositleri yapar (Moore KL, Persaud TVN, 2002).



Şekil 1.3.1.1. Ovaryumların gelişimi (Moore KL, Persaud TVN, 2002).

Doğumdan sonra oogonium oluşmaz. Primer oositlerin çoğu doğumdan önce dejenere olur. Doğumdan sonra iki milyon kadar primer oosit kalır. Doğumdan sonra ovaryum yüzey epiteli düzleşir. Ovaryum hilusunda, periton mezoteli ile devam eder. Ovaryum folikülleri biçimlenirken yüzey epiteliyle olan bağlantılarını yitirirler. Yüzey epiteli ile ovaryum korteks'i arasında tunika albuginea (tunica albuginea) denilen ince fibröz bir kapsül gelişir. Mezonefroz gerilerken, ovaryum ondan ayrılır ve mezovaryumdenilen kendi mezoteriyle vücut duvarına asılır (Moore KL, Persaud TVN, 2002.).

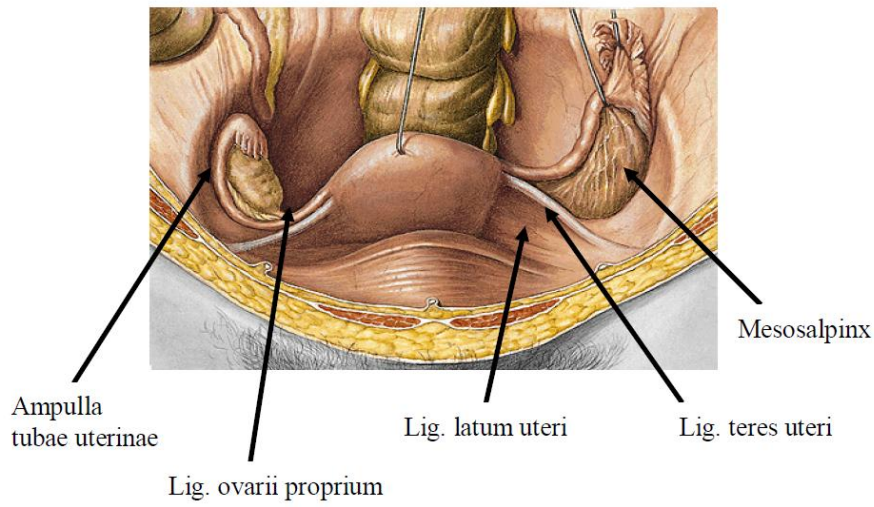
1.3.2. Ovaryum Anatomisi

Ovaryum'lar, erkekteki testis'lerin karşılığı olan, iri badem büyüklüğünde, pelviste sağda ve solda kendilerine ait çukurcuklara (fossa ovarica) yerleşik iki organdır. Embriyonal yaşamın başlangıcında ovaryumlar, intraabdominal yerleşimli iken, gelişimin ikinci ayından başlayarak aşağıya pelvis boşluğuna doğru inmeye (descensus ovarii) başlarlar. Bu süreç testisin inişine göre daha kısa sürede tamamlanır. Ovaryum bu inişle pelvis minor'un duvarında ki fossa ovarica (Krause çukuru) denilen çukurlara yerleşirler (Netter F. H, 2012). Fossa ovarica, a. İliaca externa ile a. iliaca interna arasında bulunur. Bu çukuru, alt-ön taraftan, lig. latum uteri'nin tabanı; yukarıdan, a. iliaca externa ve arkadan, ureterler sınırlar. Çukurun dibinde ve periton (peritoneum)'un altından a.-v. obturatoria ile n. obturatorius geçer. İlk gebelikte ovaryumlar, uterus ile karın boşluğuna doğru çekilirler ve bir daha aynı yerlerine dönemezler. Çoklu doğumlarda ovaryum'lar biraz daha aşağıda bulunur (Gövsa F 2003.). Tuba uterina'nın arka ve alt kısmında bulunan ovaryum'lar, lig. latum uteri içinde bulunurlar. Uzun ekseni hemen hemen vertikal yöndedir. Pembemsi-gri renkli olan ovaryum'ların yüzü ergenlik çağına değin periton'la örtülü olup düz ve parlaktır. Pubertadan sonra periton özelliğini yitirir ve matlaşır. Ovulasyon ve doğurmaya koştur olarak da üzeri pürüklü bir görünüm alır (Gövsa F 2003.). Her bir ovaryum yaklaşık 4 cm uzunluğunda, 2 cm eninde ve 0,8 cm kalınlığındadır. Ağırlığı da 3 - 5 g. kadardır (Netter F. H, 2012). Ovaryum'un anatomik olarak facies lateralis ve medialis olarak üzere iki yüzü, margo liber ve margo mesoovaricus olarak iki kenarı ve extremitas tubaria ve extremitas uterina olarak iki ucu bulunur. Ligamentum latum uteri'nin arka yaprağı olup ovaryum'un ön kenarına tutunur (Gövsa F 2003.). Kısa olduğundan ovaryum'un sadece menteşe hareketini yapmasına olanak sağlar. Ovaryumun tutunma yapıları şunlardır;

Ligamentum ovarii proprium: Ovaryum'un alt ucunu, fundus uteri'nin yan köşesine bağlar. Embriyonik yaşamdaki gubernaculum'un üst kısmının kalıntısıdır. Ortalama 2-3 cm uzunluğunda ve 2-3 mm kalınlığındadır. Yapısında düz kas ve elastik lifler bulundurduğundan gerektiğinde uzunluğunu değiştirebilir. Lig. latum uteri'nin arka kıvrımını oluşturması açısından önemli bir bağıdır (Gövsa F 2003). Fimbria ovarica: Tuba uterina'dan ovaryumlara doğru uzanan saçaksız uzantılardan (fimbriae tubae uterinae)

birisine verilen isimdir. Bu uzantı ovaryumun üst ucuna yapışır. Karın boşluğuna atılan ovum'u tutarak tuba uterina'ya taşınmasını sağlar (Netter F. H, 2012).

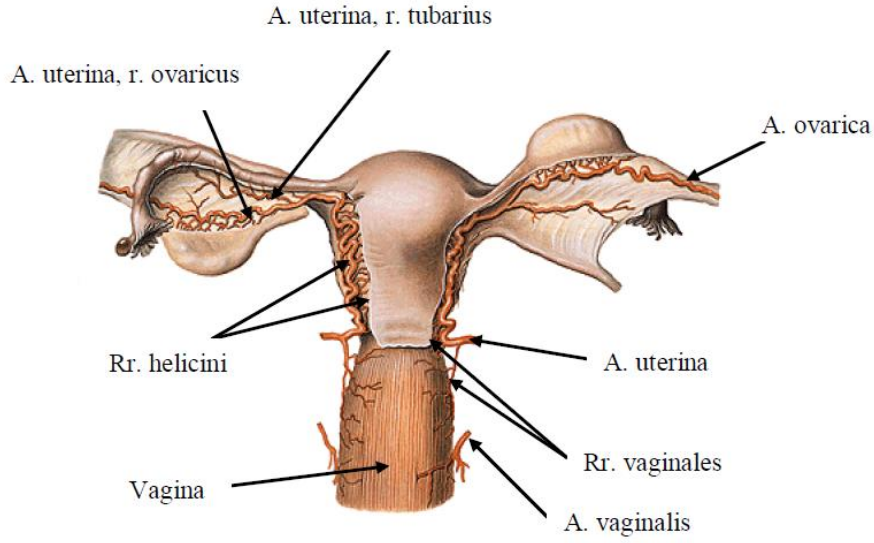
Ligamentum suspensorium ovarii: Ovaryum'u pelvis yan duvarına sabitleyen periton katlantısıdır. Aditus pelvis'ten başlayan bu bağ m. psoas major, a. iliaca externa, v. iliaca externa ve ureter'i önden çaprazlayarak aşağıda ovaryum'un üst ucunda sonlanır. Elastik teller ve düz kas lifleri içeren bu bağ içinde, ovaryum'un damar ve sinirleri bulunur. Bunlar bağı kuvvetlendirirler. Bu bağlardan mesovarium ve lig. suspensorium ovarii, ovaryum'u tutan en önemli bağlardır (Şekil 1.3.2.1).



Şekil 1.3.2.1 Ovaryum anatomisi (Sabotta'dan alınmıştır).

Ovaryum'un Arterleri: Aorta abdominalis'ten çıkan a. ovarica'lardır. 1. Lumbar vertebra denginde aorta abdominalis'ten ayrılan a. ovarica, lig. ovarii suspensorium içerisinde ilerler ve mesovarium'a gelir. Burada a. uterina'nın bir dalı olan ramus ovaricus ile anastomoz yapar. Hilum ovarii'den organa giren arter, medulla-korteks sınırında oluşturduğu pleksustan dağılan dallarıyla, foliküllerin çevresini saran zengin kapiller ağırları oluşturur (Şekil 1.3.2.2). Damarların çapı döngü evrelerine göre değişir. Damarlar

foliküllerin gelişimi sırasında genişir. Ovulasyondan sonra ise daralır.



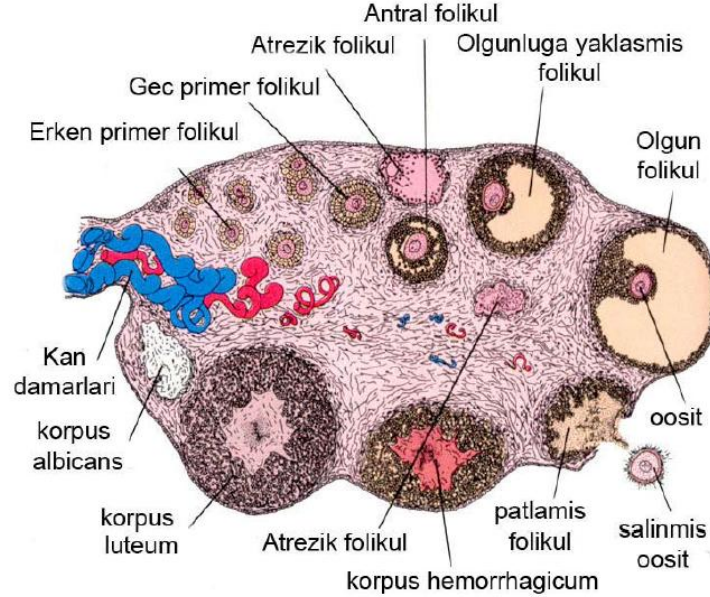
Şekil 1.3.2.2. Kadın iç genital organlarının arterleri; arka taraftan görünüş (Sobotta'dan alınmıştır).

Ovaryum'un Venleri: Arterleri izleyerek hilum ovarii'den çıkarlar. Venler ilk önce plexus ovaricus denen venöz bir ağ yaparlar. Buradan ayrılan venler birleşerek az bölümü plexus uterovaginalis'e, çoğu ise lig. ovarii suspensorum içerisindeki v. ovarica'ya açılırlar. V. ovarica, a. ovarica'larla birlikte uzanırlar. Sol taraftaki v. renalis'e, sağ taraftaki ise v. cava inferior'a açılır.

1.3.3. Ovaryum Histolojisi ve Foliküler Gelişim

İnsanlarda ovaryumlar, badem şeklinde yapılar olup, yüzeyleri tek katlı yassı ya da kübik ovaryum yüzey epiteli (germinal epitel) ile kaplıdır. Germinal epitelin altında, ovaryumun beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bağ doku tabakası bulunur. Tunika albugineanın altında primer oositleri içeren ovaryum folliküllerinin bol miktarda bulunduğu korteks yer alır (Junqueira L ve ark. 2005). Kortekste ovaryum yüzey epitelinin altında, primer oositlerin tek sıralı yassı follikül epiteli ile çevrili olduğu primordiyal folliküller bulunur (Kierszenbaum A.L ve ark 2006). Folliküller, kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içine gömülüdür. Bu stroma hormonal uyarılara diğer organlarda bulunan fibroblastlarından farklı yanıt veren fibroblastlar içerir

(Kierszenbaum A.L ve ark 2006). Ovaryumun en iç kısmı yani medulla bölgesi gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı, sinirleri içeren kısımdır (Junqueira L ve ark. 2005, Inoue A ve ark. 2007). Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (**Şekil 1.3.3.1**).



Şekil 1.3.3.1. Ovaryum histolojisi (Öner Z, 2011).

Ovaryumdaki folliküllerin gelişip olgunlaşmasına ovaryum döngüsü denir ve ovaryum döngüsü 3 evreden oluşur; folliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre. Ovaryum'da yapısal olarak farklı üç tabaka gözlenir:

1.3.3.1. Epitel ve Tunika Albuginea

Over yüzeyini örten epitel tek sıra kübik epitel yapılmıştır. Germinal epitel olarak da adlandırılan epitelin peritona bakan tarafında mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyalar izlenir. Hücre sitoplazması mitokondriyonlar ve pinositoz veziküllerinden zengindir. Az damarlı, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Kollajen lifler yüzeye dik uzanan demetler oluştururlar (Ross HM ve ark. 2003). Altında, oosit içeren foliküllerin bulunduğu korteks bölümü ve en iç kısımda gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medulla bölümleri vardır. Yaş ilerledikçe tunika albuginea kalınlaşır ve sertleşir (Junqueira LC. Ve ark. 2009). Germinal kök hücreleri germinal epitel içinde yerleşim gösterirler. Bu kök hücreler germ hücrelerine benzer büyük ve oval şekilli hücrelerdir ve mitotik olarak

aktiftirler. Germinal kök hücreleri epitelin içinde olmasına karşın epitel ile ilişkili değildir ve bu hücreler ovaryumların içinde korumasız ve çıplak halde bulunurlar. Germinal kök hücrelerden postnatal ovaryumlarda yeni oositler elde edilir. Ayrıca, ovaryum epitelinde bulunan kök hücreler, oosit ve onu çevreleyen granuloza hücrelerinin bipotent kaynağıdır (Bukovsky A. ve ark. 2005, Johnson, J. ve ark. 2004).

1.3.3.2. Ovaryum Korteksi

Organın dış ve işlevsel bölümüdür. Çeşitli gelişim aşamalarındaki ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapılarını içerir. Puberteden önce kortekste sadece primordiyal foliküller bulunurken puberteden sonra primer, sekonder ve antral foliküller bulunur. Seksüel olgunluk döneminde bu foliküllerden başka korpus luteum ve atretik foliküller bulunur. Menopoz döneminde ise foliküllerin sayısı oldukça azalır. Korteks stromasında kollajen, elastik lifler ve lif ağları ile ince uzun mekik şeklinde stroma hücreleri bulunur. Stroma hücreleri fibroblastlardan farklı olarak hormon salgılayan teka interna hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir (Kierszenbaum A.L ve ark 2006).

1.3.3.3. Ovaryum Medullası

Kan, lenf damarları ve sinirlerden zengin, açık renk iç bölgedir. Korteks ve medullayı yapısal olarak kesin sınırla ayırmak mümkün değildir. Medulla stroması korteks'e benzer. Medulla elastik liflerden zengin, düz kas hücreleri içeren fibroelastik gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Medullada ayrıca oksidasyon enzimlerini ve diğer enzimleri içeren hücreler bulunur; bunların sayıları yaşla artar, menopozda %80 oranında bulunurlar. İntertisiyel hücreler poligonal şekilli, ortada yuvarlak çekirdeği ve belirgin çekirdekçikleri olan epiteloid hücrelerdir. Sitoplazmalarında küçük yağ damlacıkları bulunur. Luteinize hücrelere benzedikleri için atreziye giden foliküllerin teka internalarından oluştukları düşünülmektedir. Bunlar ovaryum stromasında tek tek ya da gruplar halinde bulunurlar ve östrojen salgırlar. Bu hücreler, çok doğuran memelilerde fazladır ve intertisiyel bezler olarak adlandırılırlar; insanda ilk adet kanamasından sonra azalır, erişkinde son derece azdır. Hilus hücreleri, başka bir diğer iri epiteloid hücre grubudur, küçük adacıklar şeklinde hilusta gözlenirler. Testis'in Leydig hücrelerine (endocrinocytus interstitialis) benzer ve sitoplazmalarında yağ damlacıkları, lipofuksin

pigmenti, Reinke kristallerini içerirler ve steroid hormon olarak androjen salgırlar. Kortikomeduller stroma geçişinde arjirofilî gösteren nöroendokrin (APUD) hücreler, kadınlarda % 6 oranında gösterilmiştir (Bloom W, Fawcett DW 1975; Junqueira, L.C ve ark. 2003).

1.3.4. Ovulasyon ve Moleküler Mekanizmaları

Kadın hormonal sistemi üç ayrı hormondan oluşur. Bunlar; Gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH), Ön hipofiz hormonlarından folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormonu (LH)'dır (Fair, T. 2003; Filicori, M. Ve ark. 2002). Bu hormonlardan FSH ve LH hipotalamusta sentezlenen GnRH'a yanıt olarak salgılanır. Ovaryum hormonları, östrojen ve progesteron olup, bu hormonlar ön hipofiz bezinden salgılanan iki hormona yanıt olarak, ovaryum tarafından salgılanır.

Bu hormonların sekresyon miktarları kadında aylık seksüel siklus sürecinde değişkenlik gösterir (Guyton, A.C, 2001). Ovaryumda gelişimini tamamlayıp graaf follikülünden sekonder oositin dışarı atılması olayı ovulasyon olarak tanımlanır. Ovulasyon hormon bağımlı bir süreç olup, olgun follikülden sekonder oositin salıverilmesi ile sonuçlanır (Ross ve Pawlina 2011). Üreme sürecinin ömrü doğum anında belirlenir. Tek sıralı yassı follikül hücreleri tarafından çevrelenmiş her bir primer oositi içeren primordiyal follikülün oluşması üremenin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için gereklidir (Pepling M. E. 2012). Ovaryum follikül gelişimi ovulasyon için seçilen follikül ile koordineli olarak rol oynayan çeşitli endokrin, parakrin ve otokrin mekanizmalar tarafından düzenlenen süreçtir (Matsuda F. ve ark. 2012). Follikülogenez, oosit gelişimi ve gerekli steroid hormonların sağlanmasında rol oynadığından, normal fertilitte ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi için esastır. Follikülogenezin normal sürecinin başarısızlığı, kadınlardaki ovaryum disfonksiyonu ve fertilitte kaybının başlıca nedeni olabilmektedir (Chowdhury I ve ark. 2012.). Ovaryumun temel ünitesi olan folliküller, oositlere mikroçevre yaratmanın yanı sıra maturasyonun ve canlılığın için de gereklidir (Sarraj M. A ve ark. 2012). Normal folliküler gelişim sırasında, folliküller büyüme hormon dengesi tarafından kontrol edilir. FSH folliküllerin büyüme ve gelişimini sağladığında, bu folliküller östradiol, aktivin ve inhibin üretmeye başlarlar, bu hormonlar hipotalamus-hipofiziyal-ovariyan eksenin feedback mekanizması ile kontrol edilir (Stilley J. Ve ark. 2012). Ovulasyondan yaklaşık

iki gün önce, henüz tam bilinmeyen nedenlerle adenohipofizin LH sekresyon hızı belirgin şekilde yükselir. Bu artış ovulasyondan 16 saat önce 6-10 kat kadardır. FSH da aynı süreç içinde 2-3 kat kadar artar. Böylece iki hormon aynı anda birlikte etki ederek ovulasyon öncesi son birkaç gün içinde folikülün hızla şişmesini sağlar.

FSH ve LH ovaryumlarda her ay tekrarlanan ovaryum döngüsünü oluşturur. Her döngüde follikül gelişimi, ovulasyon ve korpus luteum oluşur. Her döngüde FSH etkisi ile primordiyal folliküllerden 5-15 tanesi primer follikül oluşturmak için gelişmeye başlar (Karabulut O ve ark. 2007). Döngünün geç folliküler evresinde yine hipofiz ön lobundan salgılanan LH, ovulasyondan hemen önce pik yaparak, oositte GVBD (Germinal Vesicle Break Down- Germinal Vezikülün Yıkılması) gerçekleşir ve oosit metafaz I' den, telofaz I evresine geçer. Oosit I. mayoz bölünmeyi ovulasyondan hemen önce tamamlar (Johnson J ve ark. 2004). LH seviyesindeki dalgalanma sonucunda ovaryumlara doğru olan kan akımı artar, teka eksterna içine kapiller damarlardan plazma sızmaya başlar ve ödeme neden olur. Olgun folikül çevresine salınan histamin, prostaglandinler ve kollajenazda ödem oluşumuna eşlik eder. Ayrıca folikül içinde plazminojen aktivatör proteini seviyesi de artar ve yeni oluşan plazmin membrana granülozanın proteolizisine yardımcı olur (Gartner ve Hiatt 2007).

Çeşitli büyüme faktörleri, follikül oluşumunun tamamlanması için gerekli görünmektedir. Büyüyen follikülün folliküler sıvısı incelendiğinde, steroidler ve büyüme faktörleri (östradiol ve insülin-benzeri büyüme faktörü 1) içerdiği görülmektedir. İnsan oositleri östrojen reseptör, IGF1, IGF2 ve IGF1R (Insulin Growth Factor 1 Reseptör- İnsülin Büyüme Faktörü1 Reseptörü) mRNA içermekle birlikte gelişimin preantral aşamasındaki oositlerin EGF (Epidermal Growth Factor- Epidermal Büyüme Faktörü) ve EGFR (Epidermal Growth Factor Reseptör- Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) ekspres ettiği de görülmektedir. Oosit-kumulus komplekslerinin EGF ve IGF1 varlığında kültürü sonucunda, immatür oositlerin nüklear maturasyonun arttığı rapor edilmiştir (Heikinheimo O. ve ark. 1998).

Menstrual siklusun yaklaşık 14. gününde sekonder oositin salınmasından bir dizi hormonal değişiklik ve enzimatik etkiler sorumludur. Bu faktörler arasında foliküler sıvının hacminin ve yaptığı basıncın artması, aktive edilmiş plazminojen ile foliküler duvarda enzimatik proteolizis, oosit-kumulus kompleksi ile granüloza hücreleri arasında

hormon etkisiyle glikozaminoglikanların birikmesi, prostaglandinlerin tetiklemesiyle teka eksterna tabakasındaki düz kasların kasılmasını içerir (Ross ve Pawlina, 2011). Ovulasyonla aynı zamanda uterin tüp fimbriyaları ovaryum yüzeyine iyice yaklaşırlar ve kumulus hücre yığını içindeki oositi fimbriyaları ile nazikçe süpürerek uterin tüplerin abdominal ostiumu içine alırlar. Kumulus yığını fimbriyalara yapışır ve uterin tüpün içini kaplayan siliyalı hücreler tarafından periton boşluğuna kaçmasını önlemek için aktif olarak taşınırlar.

Ovulasyondan sonra sekonder oosit yaklaşık 24 saat hayatta kalabilir. Eğer fertilizasyon bu süreçte gerçekleşmezse dejenere olur. Sekonder oositin ikinci mayoz bölünmesi sadece fertilizasyon gerçekleşirse tamamlanır. İkinci mayoz bölünmesini tamamlayan sekonder oosit 23 kromozom setini taşıyan maternal pronükleus haline gelir. Bu bölünme sonucunda oluşan diğer hücre ise ikinci kutup cisimciği olarak adlandırılır ve fertilize oosit iki polar cisimciğe sahip olması ile teşhis edilir. Polar cisimcikler gelişme yeteneğinde değildirler ve apoptoza giderler (Ross ve Pawlina, 2011). Ovaryum organ kültür çalışmalarında, primordiyal follükül oluşumunda kök hücre faktörü ve diğer birçok faktörün potansiyel rolü gösterilmiştir (Pepling M. ve ark. 2001). Bu faktörlerden başlıcaları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (**Tablo 1.3.4.1**).

Aktivite A	ROLU	EDİLDİĞİ YER		Referans	
		Oositler, hücreleri	Granuloza		
	TGFβ ailesi üyesi	Folikül formasyonunu yönlendirir.	Oositler, hücreleri	Granuloza	McMullen ve ark. (2001) & Bristol-Gould ve ark. (2006)
AKT1	Serin-Threonin Kinaz, Protein Kinaz B (PKB) olarak da bilinir.	Çoklu oosit follikülünü gelişimini uyarır.	Oositler, hücreleri	Granuloza	Brown ve ark. (2010)
AMH	Anti-Müllerian hormon, TGFβ ailesi üyesi	Folikül formasyonunu azaltır ve mastaslarda oosit sayısını artırır.	Stromal Hücreler		Nilsson ve ark. (2011)
BDNF	Beyin-kaynaklı nörotrofin faktör, Nörotrofin sinyali	Organ kültür sonuçlarında yenidoğan sağ kalımını azaltır.	ND		Spears ve ark. (2003)
BMP15	Kemik morfogenezik protein 15, TGFβ ailesi üyesi	Mutantlarda çoklu oosit gelişimini uyarır.	Oositler		Yan ve ark. (2001)
CTGF	Bağ dokü büyüme faktörü, CCN protein ailesi üyesi	Folikül formasyonuna öncülük eder.	Oositler		Schindler ve ark. (2010)
Follistatin	Aktivin antagonisti, TGFβ ailesi üyesi	Doğurganlığı ve folikül formasyonunu yapmasını azaltır.	Oositler, hücreleri, Stromal hücre		Kimura ve ark. (2011)
GDF9	Büyüme faktörüne faktörü 9, TGFβ ailesi üyesi	Mutantlarda çoklu oosit formasyonunda azalma görülür.	Oositler		Yan ve ark. (2001)
Inhibin α	Aktivin antagonisti, TGFβ ailesi üyesi	Over ekspresyonu çoklu oosit gelişimine neden olur.	ND		McMullen ve ark. (2001)
Jagged 1	Notch ligandı	Notch sinyalini inhibe eder ve oosit formasyonunu azaltır.	Oositler		Trombly ve ark. (2008)
Jagged 2	Notch ligandı	Notch sinyalini inhibe eder ve oosit formasyonunu azaltır.	ND		Trombly ve ark. (2008)
Lanatic fringe	Notch sinyal düzenleyicisi	Çoklu oosit gelişimine neden olur.	Granuloza hücreleri		Halm ve ark. (2005)
NGF	Stair büyüme faktörü, nörotrofin sinyali	Mutantlarda folikül formasyonunu azaltır.	Oositler, hücreleri	Granuloza	Dixon ve ark. (2001) & Abir ve ark. (2005)
Notch1	Notch reseptörü	Notch sinyalini inhibe eder ve oosit formasyonunu azaltır.	ND		Trombly ve ark. (2008)
Notch2	Notch reseptörü	Notch sinyalini inhibe eder ve oosit formasyonunu azaltır.	Granuloza hücreleri		Trombly ve ark. (2008)
NT4	Nörotrofin 4, Nörotrofin reseptörü	Organ kültür sonuçlarında yenidoğan sağ kalımını azaltır.	ND		Spears ve ark. (2003)
NTRK1	NGF reseptörü, Nörotrofin sinyali	Mutantlarda folikül formasyonunu azaltır.	Oositler, hücreleri	Somatik	Kerr ve ark. (2009)
NTRK 2	NT4 ve BDNF reseptörü, Nörotrofin sinyali	Mutantlarda germ hücre sayısı ve folikül formasyonunu azaltır.	Oositler		Spears ve ark. (2003) & Kerr ve ark. (2009)
P 27	Siklin-bağımlı kinaz inhibitör 1, P13K sinyal azaltıcı	Mutantlarda primordiyal folikül oluşumunu hızlandırır.	Oositler, hücreleri	Granuloza	Rajareddy ve ark. (2007)
SCF	Kök hücre faktörü, kit sinyalizasyonu	Hamsterlarda primordiyal folikül formasyonunu etkiler.	Granuloza hücreleri		Wang & Roy (2004) & Nandekar ve ark. (2007)

Tablo 1.3.4.1. Follikül düzenlenmesi kapsamında rol alan başlıca büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri (Evirgen G. 2011).

1.4. Kemirgenlerde Oositin Yapısı Ve Oositte Gerçekleşen Olaylar

Dişi farelerin üreme hücresi olan oosit, fare puberteye ulaşana dek primordiyal follikül içerisinde primer oosit olarak adlandırılan aşamada beklemektedir. Primordiyal follikül; primer oosit ve onu tek tabaka halinde çevreleyen yassı folliküler hücrelerden oluşmaktadır. Bu aşamadaki oosit, I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında duraklamış vaziyettedir. Dişi farenin puberteye girmesiyle, salgılanan hormonlar sayesinde her östrüsta birkaç tane olmak üzere oositler mayoza kaldıkları yerden devam ederler (Hugues JN ve ark. 2002, Ross MH ve ark. 2006).

Gebelik, yalancı gebelik ya da başka bir nedenden örneğin hormonal bir düzensizlik ötürü kesintiye uğramadığı sürece, dişi fare her 4–5 günde bir, periyodik östrüs siklusları

sergiler. Bu sikluslar; sonuç olarak fertilizasyon amacı ile, hipotalamus, hipofiz ve ovaryumdan salgılanan hormonların etkileşimi ile salgısal, anatomik ve davranışsal değişimlere neden olan olaylardır (Ross MH ve ark. 2006). Östral sikluslar, farelerde 4 aşamada incelenir. Proöstrüs ve östrüs; aktif büyümenin, ovulasyon, fertilizasyon ve implantasyonun gerçekleştiği aşamalarıdır. Onu takip eden metöstrüs; dejeneratif değişikliklerin meydana geldiği aşamadır. Metöstrüsten sonra diöstrüs gelir ve bu evrede pasif ve yavaş büyüme görülür (Eroschenko V. ve ark. 2008).

Foliküllerin en erken aşaması sayılabilecek primordiyal folliküllerin sayısı zamanla ovulasyon ve atrezi nedeniyle gittikçe azalır, ardından tükenir (Ross MH, ve ark. 2006). Hipotalamustan salgılanan GnRH etkisi altında ön hipofizden salınan FSH ve LH ovaryumda folliküllerin gelişimini uyarırlar (Hugues JN ve ark. 2002, Ross MH ve ark. 2006). FSH, follikül gelişimini ilerletirken; LH, olgun follikülün son gelişim aşamalarına katkı sağlar ve östrojen üretimini uyarır. Folliküller, gelecek ovulasyon için büyümeye ve gelişmeye diöstrüs evresinde başlarlar (Liu X ve ark. 2005).

Preantral follikül içerisinde gelişen oositler; olgunlaşma, fertilizasyon ve implantasyon öncesi embriyo gelişimi için gereken kaynakları biriktirirler (Marteil G ve ark. 2009). Örneğin, zona pellusida glikoproteinleri preantral follikül oositleri tarafından sentezlenir ve salgılanır. Bununla birlikte, ileride fertilizasyon sonrası salınımı ile polispermi blokajını sağlayacak olan membran bağımlı-salgı vezikülleri olan kortikal granüller de follikül gelişimin başlangıcında golgi aparatustan salgılanır (Liu X ark. 2005). Ayrıca her ne kadar bu aşamadaki oositler, mayozu tamamlama yeteneğine sahip olmasalar da, bunun için gerekli moleküller olan siklin B ve mitojenler tarafından aktive edilen protein kinazı (MAPK) sentezlerler (Liu X ve ark. 2005).

Hormonal uyarım etkisi ile mayoz bölünmesini tamamlama yeteneği kazanımı olan oositlerde, germinal vezikül yıkımı (GVBD) olarak adlandırılan nüklear kılıfın ve çekirdekçiğin kaybolduğu olaylar görülür ve sonrasında kromozomlar kondanse olarak metafaza ilerlerler. GVBD'dan önce hücre sitoplazmasında, bir düzenleyici komponent olan siklin B ve katalitik bir alt ünite olan p34cdc2'den meydana gelen olgunlaşmayı ilerletici faktör (MPF) aktivitesi hızla artmaya başlar ki bu sayede nüklear kılıfın yıkımı ve kromozom kondansasyonu gerçekleşir. MPF, kromozomların mayotik iğ üzerinde ekvatoriyal düzlemde dizildiği evre olan 1. mayozun metafazı süresince yüksek kalır.

Anafaz ve telofazda yeniden düşer, ancak 2. mayozun metafazında tekrar artar (Tsai MC ve ark. 2000).

Oosit mayoz bölünmesine devam ederken etrafındaki folliküler hücreler önce kübik ya da alçak prizmatik hücrelere dönüşür, ardından da mitoz bölünme ile çok tabakalı bir yapı kazanırlar. Bu küçük bazofilik folliküler hücreler granüloza hücreleri; oluşturdukları çok katlı yapı stratum granulozum adını alır ve follikül artık primer follikül olarak adlandırılır. Bu aşamada oosit ve granüloza hücreleri arasında aselüler, saydam bir yapı olan zona pellusida oluşumu gözlenir (Hugues JN ve ark. 2002, Ross MH ve ark. 2006, Nagy A ve ark. 2003). Zona pellusida; yaklaşık 7 µm kalınlığında (Nagy A ve ark. 2003), glikozaminoglikan ve ZP1, ZP2 ve ZP3 olarak tanımlanmış üç glikoproteinden oluşan ve türe özgü olarak spermatozoonun tanınması, akrozom reaksiyonunun indüksiyonu, spermatozoonun oosit içine penetrasyonu, polisperminin engellenmesi, oositlerin füzyonu olayının engellenmesi (mozaizm üretme çalışmalarında uygulandığı gibi) ve implantasyon öncesi blastomerlerin kaybı ya da blastokistin çeşitli patojenlere karşı korunması gibi önemli fonksiyonlara sahiptir (Junqueira L. Ve ark. 2005, Çelik Ö. 2011, Krüssel JS ve ark. 2003).

Follikül gelişimine devam ederken granüloza hücrelerinin çevresinde stroma hücrelerinden kaynaklanan bir kılıf oluşmaya başlar. Bu kılıf, içte gevşek düzenlenmiş, en önemli fonksiyonu östrojen salgılamak olan hücrelerden oluşan oldukça vasküler teka interna ve dışta herhangi bir salgılama fonksiyonu olmayan hücrelerin daha sıkı bir şekilde bir arada olduğu fibröz teka eksternaya farklanır, kılıfın tamamı teka follikülü ismini alır. Teka follikülü ve granüloza hücreleri, birbirlerinden bir bazal lamina ile ayrılırlar. Bu aşamada granüloza hücreleri arasında içi sıvı ile dolu düzensiz boşluklar oluşur. Sekonder ya da antral follikül olarak adlandırılmaya başlanan bu follikülde, follikül sıvısı ile dolu boşluklar gelişim devam ettikçe genişler, follikül sıvısının miktarı artar ve boşluklar birleşerek içi sıvı ile dolu antrum denilen tek bir boşluk oluştururlar (Hugues JN ve ark. 2002, Ross MH ve ark. 2006, Nagy A ve ark. 2003). Follikül sıvısı ya da likör follikülü, hiyaluronandan zengin bir sıvıdır (Hugues JN ve ark. 2002). Sekonder follikül gelişmeye devam ettikçe, oosit ve etrafında bulunan granüloza hücreleri follikül içerisinde bir kenara çekilmiş ve antruma doğru bir şişkinlik oluşturmuş duruma gelirler; granüloza hücreleri kümülüs ooforus, oositle beraber oluşturdukları kompleks ise kumulus-oosit kompleksi

(COC, OKK) adını alır. Kümüls ooforusun en iç tabakasındaki prizmatik hücreler, radyal düzenlenmelerinden ötürü korona radiata olarak adlandırılırlar (Hugues JN ve ark. 2002, Ross MH ve ark). Korona radiatadan oosite doğru olan uzantılar, zona pellusidayı aşarak oosit yüzeyindeki mikrovilli ile oluklu bağlantılar aracılığıyla iletişindedir (Hugues JN ve ark. 2002). Antrum genişledikçe, follikül sıvısı miktar olarak artar, OKK bir tarafından granüloza hücreleriyle bağlantılı kalacak şekilde sarar ve visköz bir hal alır. Antrumun büyümesiyle beraber follikül de büyür ve oositi ovaryumun stigma denilen bölgesinden periovaryan boşluğa atmak üzere ovaryum yüzeyine iyice yaklaşır. Atılmaya hazır, olgun follikül graff follikülü ismini alır ve bu follikülün görüldüğü aşama, proöstrudur (Ross MH ve ark. 2006, Nagy A ve ark. 2003). Olgun follikül yaklaşık (Bloom W ark. 1975) 5µm çapa sahipken, içerisindeki oosit 70µm çapa ulaşmıştır (Ross MH ve ark. 2006). Ovulasyondan önce oosit, son olgunlaşma aşamalarına girerek birinci mayoz bölünmesini tamamlar ve birinci polar cisimciğini atar. İkinci mayoz bölünme başlar ancak metafazda duraklar. Oosit sperm tarafından fertilize olana dek bu aşamada kalır (Nagy A ve ark. 2003). İkinci mayoz bölünmenin metafazındaki bu duraklama, bir sitostatik faktör (CSF) etkisi ile sürdürülen yüksek bir MPF aktivitesi ile sağlanır (McGee E ve ark. 2000). Follikül gelişiminin son aşamalarında, oositi çevreleyen hücrelerin aralarının, hiyaluronik asitten zengin hücreler arası sıvı girmesiyle bir miktar açılmaya ve hücrelerin nispeten daha gevşek bir şekilde toplanmaya başladıkları görülür. Kan akışı ovulasyon bölgesinde giderek azalır, ardından yok olur, follikül şeffaf bir görünüm kazanır. Germinal epitel bu bölgede düzensizleşir ve stroma giderek incilir. Oldukça incelmış teka follikülü ve germinal epitel ile periovaryan boşluktan ayrılan bu olgun follikül, ön hipofizden ikinci bir LH salgılanmasıyla, içerisinde bulunan kumulus-oosit kompleksini periovaryan boşluğa atar. LH salgısı etkisindeki follikülde oositin çapında önemli bir değişiklik olmaz ancak follikülün çapı ovulasyon öncesi 550µm'ye ulaşmıştır (Ross MH ve ark. 2006). Ovulasyon, östrüs evresinde gerçekleşir (Ross MH ve ark. 2006). Atılan oositin oolemma adı verilen membranının dışında; zona pellusida, follikül hücrelerinin oluşturduğu topluluk olan kümülüs ooforus ve bu hücrelerin aralarında asidik mukopolisakkarit, hiyaluronik asit, protein içerikli bir matriks bulunur. Follikülden geriye kalan kısım, iki önemli steroid hormon olan progesteron ve bir miktar da östrojen salgılamakla görevli korpus luteumdur. Corpus luteum'da granüloza hücreleri çok yoğun düz endoplazmik retikulum'a sahiptir. Bu

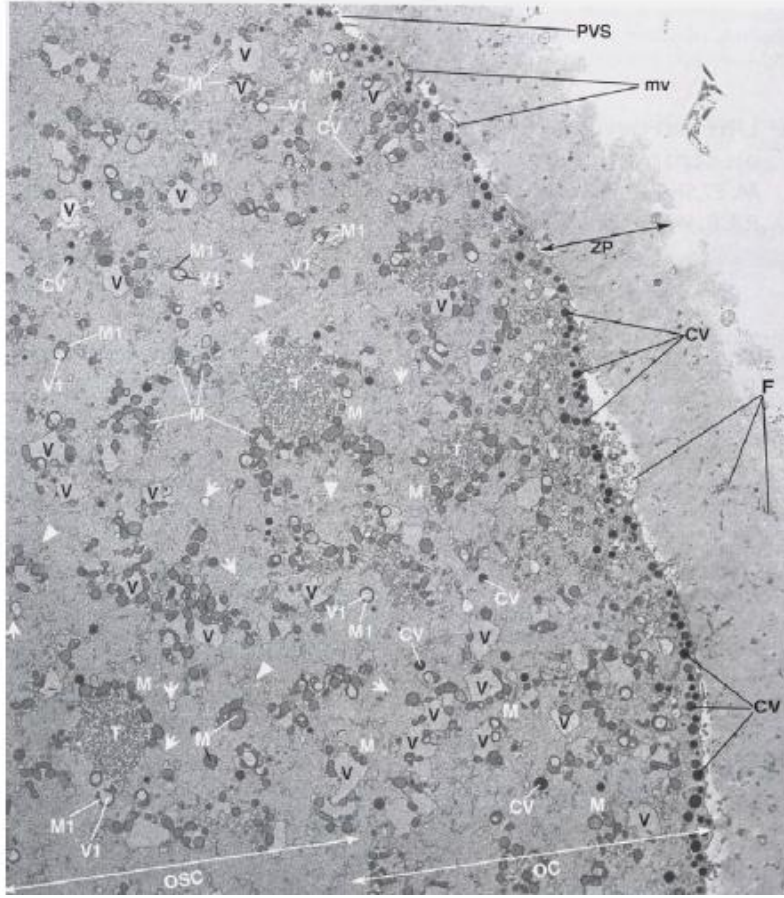
yapılar büyük miktarlarda dişi seks hormonları olan progesteron ve östrojen oluştururlar (Çelik, Ö, 2011). Ovulasyondan sonra stigma bölgesi epiteli onarılır, granüloza hücreleri hipertrofik hal alır ve bağ dokusu ve kapillerler antrumu kapatacak şekilde teka interna içerisine ilerler (Ross MH ve ark. 2006). Daha önce küçük ve bazofilik sitoplazmalı, büyük bir çekirdeğe sahip olan granüloza hücreleri, daha sonra vakuollü eozinofilik sitoplazma içeren, büyük veziküler tip çekirdeğe sahip, poligonal lutein hücrelerine dönüşürler (Ross MH ve ark. 2006). Her östrüste birkaç follikül olgunlaştığından, aktif ovaryumda birkaç korpus luteum görmek mümkündür. Bu, metöstrus aşamasıdır. Eğer ovulasyon ile atılan ovum döllenen ise corpus luteum gerileyerek ovulasyondan yaklaşık 9 gün sonra dejenere olup ortadan kalkar. Buna menstruasyon corpus luteum'u denir. Hücreleri küçülen ve vaskülarizasyonu zayıflayan corpus luteum'da yağlı dejenerasyon gelişir. Genişleyen bağ dokusunda hiyalinizasyon izlenir. Corpus luteum kademeli olarak beyaz bir skar dokusu olan corpus albicans'a dönüşür. Ovulasyonla atılan ovum döllense corpus luteum gelişerek gebelik corpus luteum'unu oluşturur. Hücreler gebeliğin orta dönemlerine kadar büyümeye devam ederler. Daha sonra yavaşça gerileyerek, doğumdan sonra hızla dejenere olur. Bunun dışında birçok oosit ya da follikül de gelişimin çeşitli aşamalarında olgunlaşmaya devam etmez, atreziye gider. Atretik follikül, piknotik hücreleri ve fragmente olmuş oositi ile karakterizedir (Niimura S ve ark. 2004). Kortekste folliküller dışında bulunan interstisyel hücreler morfolojik olarak olgun lutein hücrelerine benzerler. Kökenleri tam olarak bilinmese de, hipertrofik stromal hücrelerden, korpora lutea kalıntılarından ve teka interna hücrelerinden kaynaklanıyor olabilirler (Ross MH ve ark. 2006).

Ovulasyon ile atılan oosit, oviduktun fimbria denilen parmaklı çıkıntıları sayesinde tutularak fertilizasyonun gerçekleşeceği ampulla bölgesine iletilir. Ovulasyondan 9 ila 12 saat sonrasına kadar, atılan oosit, fertilize olma ve normal embriyo oluşturma yeteneğini korur (Ross MH ve ark. 2006). Spermin ampullaya ulaşması bazen 5 dakika kadar kısa zaman alabilir ancak bu spermiler fertilizasyon için gereken kapasitasyon olayını bir saatten önce tamamlayamadıklarından dölleme yeteneğinde değillerdir. Sperm genellikle ovulasyon olduğu sırada ampullada hazır olarak beklemektedir ancak sperm oosite penetre oluncaya kadar birkaç saat gecikme olur. Sperm 8 saat dölleme yeteneğini korur ancak

fertilizasyon olayı çiftleşmeden sonra yaklaşık 6 saat içinde gerçekleşmektedir (Ng, E.H. ve ark 2003).

1.4.1. Oositin Genel Yapısı

Foliküler gelişimin en erken aşaması olan primordiyal follikülün oositleri; büyük, eksentrik yerleşimli, çekirdekçiği belirgin ve yaygın kromatin içeren veziküler tip çekirdeğe sahiptirler. Birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında bekleyen bu oositin germinal vezikül (GV) adı verilen büyük çekirdeği ışık mikroskopunda dahi net olarak seçilebilmektedir (Inoue ve ark. 2007). Bu oositte, jukstanükleer yerleşimli iyi gelişmiş Golgi aygıtı ve çok sayıda mitokondri ile çevrelenmiştir. Golgi aygıtı paralel bir görünüm veren kısa sisternal yapılar ve çok miktarda küçük veziküllere sahiptir (Moore K ve ark. 2009, Bloom W ark. 1975). Ooplazma içerisinde Golgi aygıtından köken aldığı düşünülen benzer küçük veziküller dağılmış olarak bulunur (Bloom W ark. 1975). Perinükleer yerleşimli olarak, merkezde Golgi aygıtı ve çevresinde mitokondriler dışında endoplazmik retikulum, lizozomlar ve granülofibriler yapıların da içinde bulunduğu bir organel topluluğu bulunur ki, başta bu yapı farklı bir organel olarak düşünüldüğünden Balbiani cisimciği adını almıştır (Moore K ve ark. 2009; Pepling ME ve ark. 2007; De Smedt V ve ark. 2000). Balbiani cisimciği, primordiyal follikül oositlerinde bulunmakta ancak follikül gelişmeye başladığında mitokondriler ve endoplazmik retikulum yapılarının tüm ooplazma içerisinde dağılması nedeniyle (Pepling ME. ve ark. 2007) ortadan kalkmaktadır (**Şekil 1.4.1.1**). Endoplazmik retikulum, erken aşamalarda, veziküler ya da bir miktar ribozom içeren hafifçe uzamış oluşumlar şeklindedir ancak daha sonraları daha uzun sisternal yapılar gittikçe artarak paralel düzenlenme gösterirler. Gelişim ilerledikçe sayıları artan multiveziküler cisimcikler de ooplazma içerisinde yer alır (Bloom W ark. 1975). Ayrıca enerji ihtiyacını karşılamak üzere, glikojen granülleri, lipid damlacıkları ve fibröz yapıları kapsayan sitoplazmik inklüzyonlar da ooplazmada dağılmış şekilde yer almaktadır (Niimura S ve ark. 2004). Oosit ve etrafını saran yassı folliküler hücrelerin yüzeyleri birbirleri ile yakın ilişkilidir (Moore K ark. 2009).



Şekil 1.4.1.1. Oositin ince yapısı; Zona pelusidanın gevşek fibriler bir yapısı vardır. Perivitellin aralık (PVS) zona pelusidanın iç kısmıyla oolemma arasında bulunan dar ve ışık kırıcı bir alandır ve burada foliküler hücrelerin artıkları (F) da bulunabilir. Oositin yüzeyinde normal, küçük mikrovilliler (mv) görülür. Oosit korteksinde (OC) bir ya da iki sıra yoğun kortikal veziküller (CV) vardır. OC ayrıca mitokondria (M), düz endoplasmik retikulum (SER), tubul kümeleri (T), SER geniş vezikülleri (V), SER küçük vezikülleri (oklar) ve SER izole tubulleri (ok başları) içerirler (Başar M,2006).

Büyüyen follikülün gelişiminde ilk farklanma; primordiyal follikülün primer folliküle farklılaştığı aşamadır. Primer follikül gelişirken oositte, folliküler hücrelerde ve komşu stromada değişiklikler olur. Preantral folliküllerde, oositin hacmi yaklaşık 34 katı kadar artış gösterir ki bu, protein içeriğindeki artışla ilişkilidir. Folliküler hücreler ilk olarak yassı hücreden kübik hücrelere değişir (Esrefoglu M.,2004). Fertilize olmamış oositte ooplazma içinde dağılmış şekilde bulunmaktadır. Embriyolarda ise; endozomlar,

filamentöz aktin ve klatrin yapılarının her ikisinin birlikte kutuplaşmaya katkı sağladığını düşündürecek şekilde farklı bölgelerde toplandıkları rapor edilmiştir. Oolemma'nın hemen altında, kortikal granül adı verilen salgı vezikülleri bu evrede görülmeye başlar. Bu salgı granüllerinin oolemma içerisindeki yerleşiminde follikül gelişimiyle birlikte bazı değişiklikler görülür. Sitoplazmik olgunlaşma kapsamında değerlendirilebilecek olan bu dağılım önce kortekse doğru oolemma'nın hemen altında devamlı bir tabaka oluşturacak şekildedir; ardından özellikle fare oositlerinde görülen germinal vezikül yıkımından yaklaşık bir saat sonra, metafaz mekiğinin etrafında bir kortikal granülsüz bölge bırakacak şekilde düzenlenirler (Liu X ark. 2006). Bu granüller, sperm tarafından aktive edilen oositten ekzositoz yoluyla dışarı atılan yapılardır; glikozidaz ve proteaz içerikli bir salgı içerirler. Follikül büyüdükçe, oosit ve çevre folliküler hücrelerin arasında homojen, oldukça koyu boyanan, asidofilik ve kesintisiz bir tabaka olan ZP, oosit tarafından salgılanır. Gelişen primer follikülde granüloza hücrelerinin de yüzeyinde, oosite doğru ince uzantılar vardır ve bazen oosit plazma membranına invajine olabilmektedirler (Moore K ark. 2009). Oosit ve granüloza hücre uzantıları arasında mayotik yeterliliği kazanmak için gerekli olan heterolog oluklu bağlantılar bulunmaktadır. Oolemma ve zona pellusida arasındaki perivitellin boşluk (PVB), bu transzonal uzantıların azalması nedeniyle genişlemektedir. Bu genişlemenin, mayotik yeterliliğin kazanılması ile ilişkili olduğu ve onunla koordineli olarak gerçekleştiği düşünülmektedir (Inoue Ave ark. 2007).

Granüloza hücrelerinin aralarındaki hyaluronandan zengin likör follikülü ile dolu boşlukların birleşmesi ile antrum oluşmuş ve follikül gelişmeye devam ederek daha da büyüyüp olgun graff follikülü haline gelmiştir (Jamnongjit M, Hammes SR, 2005). Bu aşamada; granüloza hücrelerinde mitotik figürlerin azaldığı görülür (Moore K ark. 2009). Ovüle edilecek oosit ise, 1. mayozunu tamamlayıp 2. mayoz bölünmenin metafazına kadar ilerlemektedir (Inoue Ave ark. 2007). Oosit sitoplazmasında aktin, tübülün ve bazı sitokeratinler dahil sitoskelet elemanlarının kompleks bir matriksi bulunur. Fertilizasyonda meydana gelen göç olayında pronükleideki değişiklikler ve özellikle sitokinez olayı için hücre yüzeyindeki olayların koordineli bir şekilde gerçekleşmesi için bu sistemin gerekli olduğu düşünülmektedir.

1.4.2 Folikül Gelişimi

Primordiyal folikülden graff foliküle kadar olan süreç olan folikül gelişim süreci birkaç ay sürer. Bu sürece başlayan primordiyal foliküllerin büyük bir çoğunluğu antral folikül aşamasına ulaşmadan apoptozis sonucunda atreziye uğrar. Erken folikül gelişim aşamalarında FSH'nin etkisi tam olarak açık değildir. Hipofizektomi ve transgenik hayvanlarla yapılan çalışmalarda folikül havuzunda bulunan aktive olmamış foliküllerin aktivasyonunda gonadotropinlerin etkili olabileceği göstermiştir (Van Montfoort AP ve ark. 2014; Filicori, M. ve ark. 2002). Bununla birlikte, insan FSH reseptör mRNA'sı sadece primer folikül aşamasından ileriye doğru olan gelişim aşamalarında görülür. FSH β alt ünitesi mutasyona uğramış kadınlarla yapılan çalışmalarda foliküler büyüme sekonder folikül aşamasına kadar gerçekleştiği göstermiştir. (Feeney A ve ark. 2014; Hayırlı N, 2011). Buna ek olarak hipofizektomi yapılmış kadınlarda dışarıdan verilen FSH folikül büyümesini ovulasyon öncesi aşamaya kadar uyarabildiğini göstermiştir.

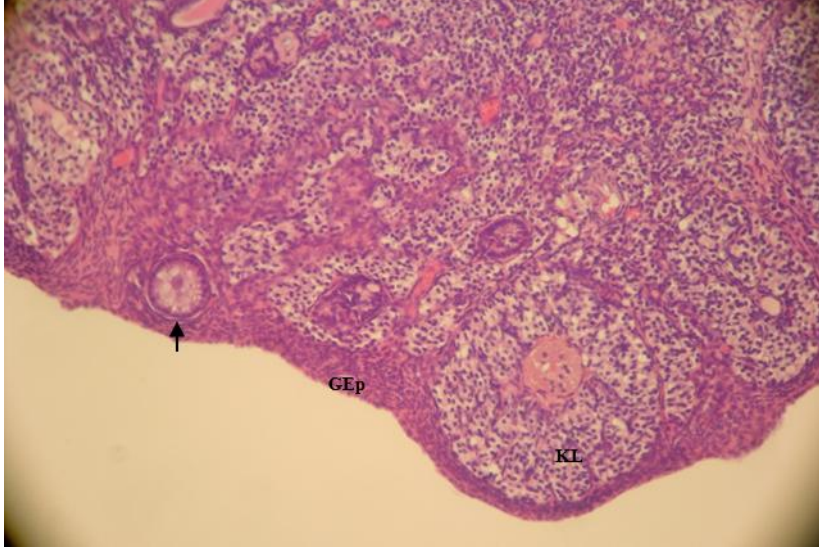
Ovaryum teka hücrelerinden salgılanan Transforming Growth Factor (TGF)- α , oosit tarafından üretilen Growth Differentiating Factor (GDF)-9 ve Bone Morphogenic Protein (BMP)-15 gibi faktörler FSH'nin granüloza hücre farklılaşması ve erken aşamadaki folikül gelişimi üzerine olan etkilerini kısıtlar. Sadece gelişimin daha ileriki aşamalarında folikül FSH'ya duyarlı hale gelir ve teka hücrelerinden kaynaklanan bir madde olan androstenoide estradiol (E2) dönüştürebilme yeteneğini kazanır (van Santbrink, E. ve ark. 1995). Aktive olmuş folikül grubu içinden tek bir baskın folikül seçiminde, foliküler fazdaki FSH'nin azalmasının etkisi çok önemlidir (van Santbrink, E. ve ark. 1995). FSH seviyeleri azaldığında baskın folikül dışındaki tüm foliküller uyarılmayı kaybederler ve atretik hale gelirler (Fauser, B.C. ve ark. , 2003). Son zamanlarda ortaya çıkan yeni bulgulara göre normal ovulasyona gerçekleştiği menstrüel sikluslarda tek bir baskın folikül seçiminde LH'nin de etkisi çok önemli olduğu gösterilmiştir (Filicori, M. ve ark. 2002; Sullivan, M.W, ve ark. ,1999). Erken antral foliküldeki granüloza hücrelerinin sadece FSH'ya cevap vermelerine rağmen olgun foliküllerdeki granüloza hücreleri hem FSH'ya hemde LH'ya cevap verirler. Olgunlaşan folikül LH'ya cevap verebilme özelliği

kazandığından dolayı FSH' ya daha az bağımlıdır (Filicori, M. ve ark. 2002; Sullivan, M.W, ve ark., 1999).

Histolojik olarak gelişimsel aşamaları köken alan üç temel tip ovaryum folikülü tanımlanmıştır: Primordiyal foliküller, Gelişmekte olan foliküller; primer ve sekonder (antral) olarak alt kategorilere ayrılır. Bunlar; Olgun foliküller veya Graff folikülleri olarak adlandırılmaktadır.

1.4.2.1 Primordiyal Foliküller

Foliküler gelişimin en erken aşaması olup ilk defa ovaryumlardaki fetal gelişimin üçüncü ayında ortaya çıkarlar. Primordiyal foliküllerin erken gelişim aşamaları gonadotropin uyarımından bağımsızdır ve olgun ovaryumda primordiyal foliküller korteks stroması içinde tunika albuginea'nın hemen altında bulunurlar (Ross ve Pawlina 2011). Primer oosit ve onu çevreleyen tek tabakalı yassı foliküler hücrelerden oluşurlar (Gartner ve Hiatt 2007). Folikül hücrelerinin dış yüzü bazal lamina ile sınırlanmıştır. Bu aşamada oosit ve etrafını saran folikül hücreleri birbirlerine sıkıca yanaşmıştır. Folikül içindeki oosit yaklaşık 30 µm çapında ve büyük, kenar duruşlu, iyi biçimde dağılmış kromatin, bir veya daha fazla iri nukleolus içeren çekirdeğe sahiptir (Ross ve Pawlina 2011). Nükleoplazma sarmal yapmamış kromozomlar nedeniyle veziküler görünüme sahiptir (Gartner ve Hiatt 2007). Ooplazma olarak anılacak oosit sitoplazması Balbiani cismini içerir. Ultrastrüktürel seviyede Balbiani cismi Golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondriyon ve lizozomların lokalize olarak birikimiyle meydana gelir. Buna ek olarak insan oositi annulat lameller ve sitoplazma boyunca dağılmış küçük sferik mitokondriyonlarla birlikte çok sayıda küçük vezikül içerirler. Annulate lameller çekirdek zarı kesitlerinin kümelerini andırmaktadır. Yığının her bir katı por yapıları içermektedir (Ross ve Pawlina 2011; Hayırlı N, 2011) ve bunlar morfolojik olarak çekirdek porlarıyla özdeşir (**Resim 1.4.2.1.1**).



Resim 1.4.2.1.1.Primordiyal folikül, oklar: primordiyal folikül, GEp: Germinal epitel,KL: Korpus Luteum, Hematoksilen-Eozin (x200)

1.4.2.2. Primer Foliküller

Primordiyal foliküller gelişmekte olan folikül haline gelirken oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler meydana gelir. İlk olarak, oosit genişler ve etrafını saran yassı folikül hücreleri kübik hale gelirler (Ross ve Pawlina 2011). Primer oositi çevreleyen folikül hücre tabaka sayısına göre tek tabakalı primer folikül ve çok tabakalı primer folikül olmak üzere iki tip primer folikül vardır. Primer oosit genişlemiş nukleusu ile birlikte 100-150 µm çapa ulaşır (Gartner ve Hiatt 2007). Oosit büyürken spesifik proteinler salgılar ve oosit ile komşu folikül hücreleri arasında ortaya çıkan bu ekstraselüler kılıfa zona pellusida (ZP) denir. İnsanlarda ZP'yı ZP-1, ZP-2 ve ZP-3 olarak adlandırılan üç sınıf sülfatlı asidik glikoproteinler oluşturur. Üçü arasında en önemlisi türe özgü akrozom reaksiyonunu henüz geçirmemiş spermatozoaların bağlanması için primer reseptör ve akrozom reaksiyonu başlatıcısı olan ZP-3'dür, ZP-2'nin akrozom reaksiyonunu tamamlamış spermatozoon için ikincil bağlanma reseptörü proteini olarak rol oynadığına inanılır, ZP-1 ise henüz fonksiyonel olarak karakterize edilmemiştir fakat zona için yapısal proteindir. ZP ışık mikroskopunda açıkça görülebilir. Periyodik asit Schiff (PAS) boyası ve asidofilik boyalarla boyanır. İlk olarak oosit yaklaşık 50-80µm büyüklüğe ulaşır tek katlı

kübik veya prizmatik folikül epiteli ile döşendiği zaman gözlenir. Stromal hücreler çok katlı primer folikülün çevresinde organize olmaya başlarlar (Gartner ve Hiatt 2007) ve hemen bazal laminaya komşu teka folikülü olarak bilinen bağ doku hücreleri ile sararlar (Ross ve Pawlina 2011).

Teka folikülü iki tabakaya ayrılır. Teka İnterna daha içte bulunan oldukça damarlı küboidal salgı yapan hücrelerden oluşan bir tabakadır. Tamamen farklılaşmasını tamamlamış teka interna hücreleri ultrastrüktürel yapıları bakımından steroid üreten hücrelere benzerler (Ross ve Pawlina, 2011). Çok sayıda LH reseptörüne sahiptirler. Granüloza hücrelerine girerek aromataz enzimiyle östradiole çevrilen erkek seks hormonu androstenedionu üretirler. Salgı yapan hücrelerin yanı sıra teka interna fibroblastlar, kollajen demetleri ve endokrin organlarda olduğu gibi zengin bir kılcal damar ağı içerir (Gartner ve Hiatt 2007, Ross ve Pawlina 2011).

Teka eksterna bağ doku hücrelerinin dış tabakası olup esas olarak düz kas hücreleri ve kollajen fibril demetleri içerir. Teka tabakaları arasındaki ve teka eksterna ile çevreleyen stroma arasındaki sınırlar belirgin değildir. Ancak granüloza tabakası ile teka interna arasındaki bazal lamina kesin bir sınır oluşturur ve teka internanın zengin kapiller yatağı ile granüloza tabakasını ayırır (Ross ve Pawlina 2011).

1.4.2.3 Sekonder Foliküller

Sekonder foliküller sıvı -likör folikülü (Gartner ve Hiatt 2007) içeren antrum ile karakterizedir. Oosit ve folikül gelişiminde FSH, Büyüme faktörleri (örneğin: epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-I), Kalsiyum iyonları (Ca²⁺) gibi bazı faktörler gereklidir: Çok katlı primer folikül gelişmeye devam eder ve çapını 200 µm'nin üzerine çıkarır. Stratum granülozum tabakası 6-12 hücre katına ulaştığında granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar görülmeye başlanır (**Şekil 1.4.2.3.1**). Glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve steroid-bağlanma proteinleri içeren bu sıvı granüloza hücreleri tarafından üretilir. Bunlardan başka LH ve FSH salınımını kontrol eden hormonlar olan progesteron, östradiol, inhibin, follükülostatin ve aktivin hormonlarını da içerir (Gartner ve Hiatt 2007). Sıvı birikmeye devam eder, boşluklar birleşmeye başlar ve sonunda hilal şeklinde antrum denen tek bir boşluk haline gelir. Artık folikül sekonder veya antral folikül olarak tanımlanır. 125 µm çapa ulaşan ve kenarda yerleşen oosit artık

daha fazla büyümmez. Büyümenin inhibisyonu granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salınan 1-2 kD ağırlığındaki bir peptid olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından gerçekleştirilir. OMI konsantrasyonu ile sekonder folikül büyüklüğü arasında bir korelasyon belirlenmiştir. Konsantrasyon küçük foliküllerde daha yüksek, olgun foliküllerde ise daha düşüktür. Folikül, sıvının ilk gözükmeye başladığı erken sekonder folikül evresinde 0,2 mm çapa sahipken büyüme ve birikme devam ettikçe 10 mm ve daha büyük hale gelir. Sekonder foliküldeki granüloza hücrelerinin proliferasyonunun devamı hipofizin ön lobundaki bazofilik hücrelerden salgılanan FSH'a bağlıdır. Stratum granulozum oositle ilişkili olduğu bölge dışında nispeten benzer kalınlığa sahiptir. Burada granüloza hücreleri antruma doğru kumulus ooforus adı verilen bir tepelik meydana getirirler. Kumulus ooforus hücreleri kısa sürede oositin etrafını sararlar ve korona radiata adını alırlar. Korona radiata hücreleri zona pellusidaya doğru mikrovilluslarını gönderirler ve oluklu bağlantılar aracılığıyla oositin mikrovilluslarıyla iletişim kurarlar. Ekstraselüler olarak bulunan PAS ile yoğun boyanma özelliği gösteren Call-Exner cisimcikleri granüloza hücrelerinin arasında görülebilir. Bu cisimcikler granüloza hücreleri tarafından salgılanırlar (Gartner ve Hiatt 2007, Ross ve Pawlina 2011) ve hiyaluronan ve proteoglikanları içerirler (Resim 1.4.2.3.1).



Resim 1.4.2.3.1. Sekonder folikül, Ok başı: Sekonder Folikül, A: Antrum, O: Oosit, GH: Granüloza hücre tabakaları, TK: Teka tabakası, H-E, X400 objektif,

1.4.2.4. Olgun Folikül (Graaf Folikülü)

Granüloza hücrelerinde devam eden proliferasyon ve devam eden likör folikülü oluşumu olgun folikül olarak da bilinen Graaf folikülü (Resim 1.4.2.4.1) oluşumu ile sonuçlanır ve ovulasyon esnasında yaklaşık 2,5cm büyüklüğe ulaşabilir (Gartner ve Hiatt 2007). Folikül maksimum büyüklüğüne yaklaştıkça granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi düşer. Ovulasyona hazırlanmak için granüloza hücrelerinin arasında boşluklar meydana gelir. Oositin etrafındaki korona radiata hücreleri ve bunlara zayıf şekilde tutunmuş olan kumulus hücreleri ovulasyonda oositle birlikte kalırlar. Bu dönemde teka interna hücre sitoplazmasında lipid damlacıkları görülmeye başlanır ve ultrastrüktürel olarak tipik steroid sentezleyen hücre görünümü kazanırlar (Ross ve Pawlina 2011).



Resim 1.4.2.4.1. Ovaryum korteksinde graff folikülü A: Antrum boşluğu, KO: Kumülüs Ooforus, KR: Korona Radiata, GH: Granüloza hücre tabakaları, Tk: Teka tabakası, O:Oosit, H-E (X200).

1.5.Kontrollü Ovaryum Hiperstimülasyonu (KOH)

Endokrin hipofizyal gonadal aksinin 20.yy'ın başlarında hipofizin ön lobunda meydana gelen lezyonların genital organlarda atrofiye neden olmasıyla kanıtlanmıştır. İki

ayrı gonadotropin (başlarda Prolan A ve B olarak adlandırılan) varlığını destekleyen ilk ikna edici kanıt 1931'de Fevold ve ark. tarafından ortaya konulmuş olup, LH ve FSH sonradan izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Hayvanlardan elde edilen gonadotropinlerin insanda hızlı immunolojik cevap yaratmaları nedeniyle bu hormonlar insan kaynaklarından elde edilmeye çalışılmıştır.

Süperovulasyon uygulaması infertilite nedeniyle tedavi görmek isteyen çiftlerden kadınlara yaygın olarak uygulanmaktadır. Uygulamanın amacı IVF'deki dölllenme şansını arttırmak için en çok sayıda, en iyi kalitede, olgunlaşmış oositler elde etmektir. Elde edilen oosit sayısı ve olgunluğu ne kadar iyi ise embriyo kültürü ve implantasyon başarısı da o oranda artacaktır. Fakat süperovulasyon tedavi süreci sorunsuz değildir. Karşılaşılan en önemli problemlerden biri erken LH artışıdır. Erken LH artışıyla birlikte luteinizasyon görülmekte ve kaliteli, olgun oosit elde edilmesi şansı çok azalmaktadır (Hayırlı N, 2011).

Süperovulasyon için FSH, HCG ve GnRH agonisti kullanılır. GnRH agonistleri klinikte ovaryum uyarılmasıyla birlikte kullanılmaya başlanmıştır. GnRH'nın fare ovaryumuna etkisi sonucunda oosit olgunlaşmasını indüklemektedir (Yang, B.C ve ark., 1995). Memelilerde foliküler oositler birinci mayotik bölünmenin profaz safhasında duraklarlar. Mayozun devamı için fizyolojik uyarıcı ovulasyon öncesi LH yükselmesidir. GnRH agonistleri LH'nın bu etkisini taklit ederek mayozun devamını sağladığı düşünülmektedir (Yoshimura, Y. ve ark 1991).

1950'lerin sonunda yapılan klinik denemelerde insan hipofizinden elde edilen ekstraktların gonad fonksiyonunu düzenlemede kullanılabileceği kanıtlanmıştır. Bu süreci takiben deneyler gonadotropik hormonların her ikisinin de postmenopozal kadınların idrarından ekstraksiyonunu ile ilgili çalışmalar yapılmış ve insan menopozal gonadotropini (hMG) preparatlarının gelişimine yol açmıştır (Wang Y ve ark. 2006). 1960'ların başında bu hormonlar gonadal fonksiyonun stimülasyonu için insanda kullanılmıştır (Macklon ve ark. 2006). Günümüzde hormonal preparatlar rekombinant teknoloji ürünü olarak elde edilmeye başlanmıştır.

Süperovulasyon protokolü fetal büyümede azalma ve hamilelik sürecinin uzamasına da neden olur (Edwards, L.J. ve ark. 2005). Bununla birlikte farelerde yapılan çalışmalar süperovulasyon protokolünün IGF-II, IGF-II reseptör ya da VEGF gen ekspresyonuna anlamlı derecede etkisi olmadığını göstermiştir. Diğer taraftan da uygulanan

gonadotropin tedavisinin kromozomal anormalliklerin sıklığını arttırdığı bilinmektedir. Bu da süperovulasyon protokolü uygulandıktan sonra in vitro embriyo gelişiminin zayıf olmasının nedenidir.

Süperovulasyon protokolüne aşırı cevap veren kadınlarda, oosit ve embriyo kalitesi üzerine gonadotropin uygulamasının kötü bir etkisi yoktur (Ng, E.H., ve ark.2003). Normal IVF uygulamasıyla, ovaryum uyarılması protokolü kullanılarak yapılan IVF uygulamalarının karşılaştırıldığı geriye dönük bir çalışmada bildirildiğine göre; her iki gruptaki embriyoların kalitesi ve yarıklanma kapasiteleri arasında bir fark olmadığını göstermiştir (Ziebe, S ve ark. 2004). Yüksek FSH seviyelerine maruz kalmanın da embriyo gelişimi üzerine doğrudan etkisi yoktur. Pre-antral folikülden elde edilen oositlerin kültürü yapılırken ortama FSH eklendiğinde yararlı bir etki görülmemiştir. Ayrıca FSH'nın insulin ile birlikte oosit gelişimine zararlı olduğu ve istenmeyen granuloza hücre çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir.

Kontrollü Ovaryum Hiperstimülasyonunun (KOH) birden fazla sayıda olgun oosit elde etmek, ovulasyonu zamanını kontrol altında tutmak ve yardımla üreme teknikleri tedavisi sonrası gebelik oranını artırmak olarak özetlenebilir (Hayırlı N, 2011).

1.5.1.KOH Tedavisinde Kullanılan Ajanlar

Klomifen Sitrata: 1956 yılında sentezlenmiştir. Görevi hipotalamustan hipotalmik-hipofiz portal akımına GnRH salgılanmasını artırmak ve bu sayede hipofiz kaynaklı gonadotropinlerinin artışına yol açmaktır (Hayırlı N, 2011).

Aromataz İnhibitörleri: Aromataz sitokrom P-450 bağımlı bir enzimdir. Östrojen sentezinin son basamağında rol oynar ve androjenlerin östrojene dönüştürülmesini katalizler. Aromataz inhibitörleri aromataz enzim sistemlerinin kompetitif inhibitörüdür ve androjenlerin östrojene dönüşmesini inhibe eder (Hayırlı N, 2011).

İnsan koryonik gonadotropini (HCG): İki hormonun arasındaki homoloji derecesi nedeniyle HCG, LH yerine kullanılabilir. En önemlisi iki hormonda aynı doğal fonksiyona sahiptir, lüteinizasyonu indüklemek ve lütein hücrelerini desteklemek. HCG'nin uzun bir serum yarı ömrüne sahip olması klinik uygulamalarda istenmeyen bir özelliktir. Korpus luteumun sürekli yüksek seviyede stimülasyonu gonadotropin tedavisinin başlıca komplikasyonu olan OHSS yol açabilir (Hayırlı N, 2011).

İnsan Menopozal Gonadotropini: 75 IU FSH ve 75 IU LH'a eşit değerde in-vivo biyoaktiviteye sahiptir. Çeşitli hMG preparatları içinde TNF bağlanma proteini I, transferin, ürokinaz, tamm-horsfall glikoproteini, epidermal büyüme faktörü ve immünoglobulin ilişkili proteinlerini de içeren değişik proteinler bulunmuştur (Hayırlı N, 2011).

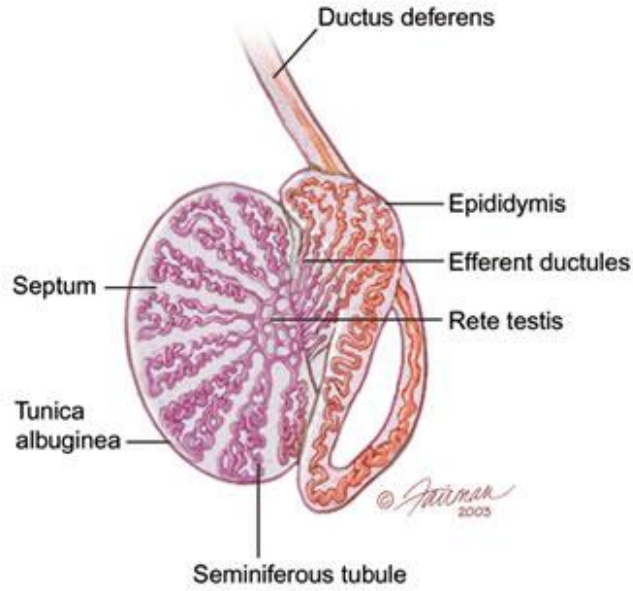
GnRH Analogları: GnRH analogları, hipofiz bezinde GnRH reseptörlerine bağlanır ve daha uzun süre burada kalırlar. Menopoza benzer bir durum yaratır ve hypoöstrojenik ortam sağlanarak, endometriyal atrofi ve amenore oluşturulur. Ağrı semptomlarının iyileştirilmesinde ve endometriyotik implantların boyutlarının küçülmesinde diğer medikal tedaviler kadar etkindir. Fakat bu ilaç da diğerleri gibi gebelik oranlarını artırmamaktadır (Hayırlı N, 2011).

Gonadotropinler: İnsan menopozal gonadotropinleri, geniş bir şekilde ilk olarak Amerika Bileşik Devletlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Yirmi seneden fazla olarak IVF uygulamalarında gonadotropinlerin kullanılmasının nedeni fertilizasyon için gerekli olan oositlerin sayılarının mümkün olduğunca arttırılmak istenmesidir. Kullanılan hMG preparatlarının FSH: LH biyolojik etkinlik oranı 1:1'dir. Hormonun saflığı arttıkça biyolojik etkinlik oranını korumak için HCG eklenmesi gereklidir. İlk hazırlanan preparatların saflığı çok düşüktü ve preparat içinde bulunan proteinlerin sadece %5'i biyolojik olarak etkindi. Protein saflaştırma tekniklerinin gelişmesiyle birlikte etkinliği daha az olan proteinlerin karışımının en aza indirildiği hMG üretilmeye başlandı ve 1980'lerin başından itibaren monoklonal antikorlarında kullanımıyla idrardan saflaştırılmış FSH (uFSH) elde edildi (Lunenfeld, B ve ark. 2004). Günümüzde kullanılan saf ürünler sayesinde aşırı duyarlılık durumu daha az meydana gelmekte ve daha ağrısız deri altı uygulamaları yapılabilmektedir. Gonadotropin preparatlara olan ihtiyacın tüm dünyada artmasıyla birlikte, menopozdan sonra elde edilecek idrar ihtiyacı da muazzam şekilde artmıştır ve sınırlı kaynaklar bu ihtiyaca cevap veremez hale gelmiştir.

1.6. Testisin Genel Histolojik Yapısı

Testisler, tunika albuginea adı verilen yoğun bir bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Burada bezin içerisine giren fibröz uzantılar (septum) bezi testis lobçukları/bölmeleri adı verilen yaklaşık 250 adet bölmeye ayırır. Bu uzantılan kesintisiz değildir ve çoğunlukla bölmeler ile birbirlerine bağlıdır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve Leydig hücreleri adı verilen intertisyel hücreler içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoaları üretirken, intertisyel hücreler de testis androjenlerini salgılar (Kierszenbaum A. L, 2006).

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fetüsün gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların uçlarında asılı olarak bulunurlar. Skrotuma doğru gerçekleştirdikleri bu göç nedeniyle her testis **tunika vaginalis** adı verilen ve peritondan gelişmiş olan seröz bir kese taşır (**Şekil 1.6.1**). Tunika vaginalis dışta paryetal, içte ise viseral bir tabakadan oluşur ve testisin ön ve yan kısımlarında tunika albugineayı örter (Kierszenbaum A. L, 2006).



Şekil 1.6.1. Testisin genel histolojik görüntüsü (Kierszenbaum A. L, 2006).

1.6.1.Seminifer Tübüller

Spermatozoonlar seminifer tübüllerde üretilir. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her seminifer tübül karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşeli olup, yaklaşık 150-250 çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller ya da tubuli rekti olarak anılan kısa segmentier halinde devam eder (Kierszenbaum A. L, 2006). Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin **rete testis** denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 **duktuli efferentes** ile **epididimisin** baş kısmına bağlanmıştır. Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir **germinal** ya da **seminifer** epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz **tunika propria** birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış **miyoid** hücreler içerir (Kierszenbaum A. L, 2006).

Seminifer epitelde iki tip hücre vardır: **Sertoli** ya da **destek hücreleri** ile spermatogenezdeki seriyi oluşturan hücrelerdir. Spermatogenik seri hücreleri 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir; işlevleri spermatozoonları üretmektir. Spermatozoon üretimi **spermatogenez** olarak adlandırılır. Bu süreç, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri içerir ve hücreler sonunda spermatozoidlere farklılaşır ve bu aşama **spermiyogenez** olarak adlandırılır (Kierszenbaum A. L, 2006).

1.6.2. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatozoon üretim sürecidir. Süreç ilkel primitif bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar (Yun. *Sperma* + *göne*, üreme, kuşak). Spermatogonyum, yaklaşık 12 pm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan küçük bir hücredir. Cinsel olgunluk çağında spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir: **A tipi spermatogonyumlar** olarak da adlandırılan kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da süregiden mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak **B tipi spermatogonyumları** oluştururlar. B tipi spermatogonyumlar **primer spermatositlere** farklılaşan öncül (progenitor) hücrelerdir. Primer spermatositler 46 kromozom (44 +XY) ve 4N DNA içerir

(N haplo- id kromozom sayısını [insanlarda 23 kromozom] ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını gösterir. Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamada olacaktır. Primer spermatositler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir ve nükleuslarında kangal oluşturma sürecinin değişik safhalarında kromozomların bulunması ile tanınırlar (Kierszenbaum A. L, 2006).

Birinci mayoz bölünmeden sonra **sekonder spermatositler** olarak adlandırılan ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Kromozomlardaki bu sayıya azalmaya her hücredeki DNA miktarının eksilmesi eşlik eder. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi 23 kromozom içeren iki hücrenin, **spermatidlerin** oluşmasıyla sonuçlanır. Spermatositlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı görülmediği için, ikinci bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid hücreler meydana gelir. Böylece, mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid sayıda kromozom içeren hücreler oluşur. Döllenme ile bunlar normal diploid sayıya dönerler (Kierszenbaum A. L, 2006).

1.6.3.Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatazoonla dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler, küçük boyutları (7-8 pm çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tübüllerde lümen yakınında (jukstalüminal) yerleşmişlerdir. Spermiyogenez, akrozom (Yun. akron, ekstremit + soma, gövde) oluşumunu, nükleus yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum gelişmesini ve sitoplazmanın büyük bir bölümünün kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Sonuçta, daha sonra seminifer tübül lümenine bırakılan olgun spermatozoonlar oluşur (Kierszenbaum A. L, 2006).

Spermiyogenez 3 evreye ayrılır: Golgi Fazı, Spermatid sitoplazması, nükleusun yakınında yer alan belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest

ribozomlar ve düz endoplazma retikulumu tübüllerini içerir. Proakrozomal grandiler olarak adlandırılan küçük PAS-pozitif granüller golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek membranla sınırlı bir **akrozomal vezikülün** içinde yer alan tek bir **akrozomal granülü** oluştururlar. Sentriyoller göç ederek oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden nükleusa doğru göç ederken hareket ettikçe aksonemal bileşenleri çevresine sarar (Kierszenbaum A. L, 2006).

Akrozomal faz, akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra **akrozom** adını alır. Akrozom, hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı lüidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür. Bu enzimlerin, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Spermatozoonlar bir oositle karşılaştığında, akrozomun dış membranı birçok bölgede spermatozoonun plazma membranı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin hücre dışına boşalmasını sağlar. Bu işlem **akrozomal reaksiyon** olarak bilinir ve döllenmenin ilk basamaklarından biridir (Kierszenbaum A. L, 2006). Spermiyogenezin bu fazı sırasında, spermatid seminifer tübülün tabanına doğru yönelir ve aksonem İnmene doğru uzanır. Ayrıca, nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek **flagellumu** oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal kısmı etrafında toplanarak **orta parça** adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge, spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur. Mitokondrilerin bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ile ilgili ve yüksek enerji tüketimi olan bölgelerde yoğunlaşmasının bir başka örneğidir. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve **dinein** denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur (Kierszenbaum A. L, 2006).

Maturasyon(Olgunlaşma) Fazı, geriye kalan artık sitoplâzma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine salınırlar (Kierszenbaum A. L, 2006).

1.7. İn Vitro Fertilizasyon(IVF)

1.7.1. IVF Tarihi

Hayvan üreme hücreleri kullanılması ile yapılan ilk IVF çalışmaları Shenk (1878) ve Long (1912) tarafından yayınlanmıştır. Fakat Shenk ve Long'un raporları, patojen aktivasyonunda sıcaklık değişiminin rolü 1936'ya kadar tanımlanmamış olduğundan IVF ile ilgili yayınları şüpheli bir değere sahiptir. Buna ek olarak fertilizasyonu tanımlamada da oldukça hatalı parametreler kullanılmıştır (Clarke, 2006; Nazlı Hayırlı, 2011). Sperm kapasitesinin ile ilgili bilgiler ilk olarak Colin Austin ve M.C. Chang tarafından bağımsız olarak tanımlanması IVF çalışmalarında modern bir çağın başlanmasına neden olmuştur. Bu işlemi takiben Austin ve Bishop (1958) spermin zona pellusidaya penetre olmasından önce oluşan akrozom reaksiyonu hakkındaki ilk bulguları yayınlamıştır. Kapasite olmuş sperm kullanılarak ilk başarılı IVF denemesi Yanagimachi ve Gang (1963) tarafından yapılmıştır.

IVF teknikleri tıp alanında başarılı bir şekilde ilk olarak 1978 yılında Temmuz ayında İngiltere'de Luise Brown adı verilen Süper Bebek olarak Dünyaya duyurulan bebeğin doğumudur. Yakın geçmişte ise, 1981 yılında ABD'de bulunan Jones Kliniğinde IVF yöntemiyle dünyaya getirilen Elizbet Comeau isimindeki tüp bebeğin doğal yolla döllenmesi ile 2010 yılında sağlıklı doğum yapması, bu tekniğin insanlarda yardımcı üreme teknikleri kapsamında daha yaygın olarak kullanılmasının yolunu açmıştır (Akkoç T, 2013).

1.7.2 Deneysel IVF

IVF yani vücut dışında döllenme, dışıdan alınan olgun oosit ile aynı türe ait erkekten alınan olgun spermatozoonun laboratuvar ortamında in vivo mikro çevre koşullarına uygun in vitro mikro çevre koşulları oluşturularak bir araya getirilmesiyle sağlanan bir fertilizasyon yöntemidir. YÜT yöntemlerinden biri olan IVF yöntemi infertilite tanısı konmuş bireylerde kullanılan bir yöntemdir. IVF uygulamaları ilk olarak tubal hasarı olan çiftlere yardım amaçlı olarak kullanılmak için geliştirilmiş olsa da günümüzde pek çok tüp bebek yöntemi için kullanılmaktadır (Akkoç T, 2013).

Memeli hayvanlarda döllenmeyi etkileyen birtakım olumsuzlukların ortaya çıkmasıyla sağlıklı döl alınması ve gebelik oranlarının yükseltilmesi yönünde in vitro fertilizasyon alanında birbirini takip eden bir çok çalışma gerçekleştirilmiş ve bu konuda ilerlemeler sağlanmıştır. Tarımsal biyoteknoloji alanında çiftlik hayvanları üzerinde gerçekleştirilen yardımcı üreme tekniklerinin uygulanabilirliği insanlar üzerindeki uygulamalar kadar başarılı olmasa da laboratuvar hayvanları üzerinde gerçekleştirilen ar-ge çalışmaları ile yeni tekniklerin ve protokollerin oluşturulması yardımcı üreme teknikleri kapsamında büyük destek vermektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda bu alanda ortaya çıkarılan yeni teknolojilerden başarılı sonuçların alınabilmesi için öncelikle klinisyen, veteriner ve embriyoloğun işbirliği ve uyumuna bağlı olmaktadır. IVF tekniğinin uygulanmasındaki temel prensip, belirli olgunluğa ve kapasitasyona ulaşmış düzgün, doğrusal hareket edebilen motil spermatazoa ile olgunluğa ulaşmış metafaz II safhasında bekleyen oositin uygun ortam ve zaman periyodunda bir araya getirilmesidir (Akkoç T, 2013).

Kemiriciler, insan IVF yeni uygulama protokolleri, embriyo toksisitelerinin belirlenmesi, deneysel tüm çalışmalar gibi insan oositleri ile gerçekleştirilemeyecek tüm araştırmalar için çok iyi bir kaynaktır. Ancak fare, sıçan, tavşan, kobay gibi her bir kemiricinin süperovulasyonuna verdiği farklı yanıtlar söz konusudur. Ayrıca herbir türün ayrı soyları da farklı yanıtlar vererek bu farklılığı artırmaktadır. Mayoz, dişi germ hücresi olan oositin kromozom sayısını yarıya indirgeyerek haploid sayıda kromozoma sahip yavru hücrelerin oluşumuyla sonlanan, özelleşmiş bir hücre bölünmesidir. İnsan oositinde mayoz bölünme intrauterin dönemin 4. ayında başlar ancak follükül hücrelerince salgılanan OMI nedeniyle puberteye kadar profaz I'in diploten evresinde beklemede kalır (Kuyucu Y. ve Tap Ö. 2009).

Puberteden sonra gonadotropinlerin (Özellikle de LH) etkisiyle mayoz bölünmede ilerleme başlar. Ovulasyondan önce mayoz I tamamlanır ve 2. mayoz bölünme başlar. Mayoz II'nin metafaz evresinde iken ovulasyon gerçekleşir. Mayoz bölünmedeki bu ikinci duraksama fertilizasyon oluncaya kadar devam eder ancak fertilizasyonun gerçekleşmesi ile mayoz bölünme tamamlanabilir. Pek çok araştırmacı oosit maturasyonunu, oositin mayoz bölünme sırasında profaz I evresinden metafaz II evresine kadar olan olaylar zinciri olarak kabul etmektedir. Olgunlaşma süreci nükleer ve sitoplazmik maturasyon olarak

incelenmektedir (Kuyucu Y. ve Tap Ö. 2009). Nükleer maturasyonun başlaması için LH tetikleyici bir role sahiptir, ancak maturasyonun devamı için başta östrojen olmak üzere steroidlere de ihtiyaç bulunmaktadır (Ertzeid G., Storeng R., 2001). Profaz I aşamasında oosit bekleme halindeyken henüz yıkılmamış hücre çekirdeğine germinal vezikül denir. Oosit maturasyonunda meydana gelen ilk olay LH uyarısı ile gerçekleşen germinal vezikülün yıkılmasıdır. Ardından kromozom yoğunlaşması ve iğ iplikçiklerinin oluşumu homolog kromozomların metafaz plağı üzerinde gerçekleşir. Metafaz I den sonra anafaz I ve telofaz I gerçekleşir ve sonunda asimetrik bölünme ile sekonder oosit ve I. Polar cisimcik oluşur. Bu evreden sonra sekonder oosit II mayoz bölünmenin metafaz safhasına doğru ilerler ve metafaz II de bölünmesi durur. Sperm'in oosit içerisine penetrasyonu ile oositin II mayoz bölünmesi tamamlanır. Birinci polar cismin oluşmasıyla birlikte perivitellin boşluk genişler ve şekillenir. Mitokondriyonların sayısı artar ve yapısal değişimleri oluşur. Golgi komplekslerinden kortikal granül salınmasıyla birlikte ooplazma granüllü bir hal alır. Başlangıçta merkezi olarak yer alan mitokondriyonlar oositin gelişimi ile birlikte periferal bir konuma sahip olmaktadır. Mitokondriyonların, sitoplazmik maturasyonda anahtar rolü üstlendikleri bilinmektedir. Hücre içi metabolik olaylarda, hücre farklılaşmasında ve hücre proliferasyonunda mitokondriyonlar etkin rol oynamaktadırlar (Anwar A, Moussa MD 2002).

Fertilizasyon öncesi epididimisinde sperm maturasyonu ve dişi üreme kanallarında sperm kapasitasyonu olarak 2 olay meydana gelir. Testisten salınan ve epididim kanalına giren sperm sirkuler harekete sahiptir. Sperm,epididimise geçip ve epididimisin kuyruk veya kuyruğa yakın bölgesinde depolanmayı içeren 2 haftalık olgunlaşma sürecinden sonra fertilizasyon için gerekli olan ileri hareketini kazanır. Ejakulasyondan sonra, sperm uterusu kapasitasyon sürecine girer ve tuba uterina kanalında bulunan ovumun fertilizasyonunu gerçekleştirir. Fertilizasyon sırasında 3 ana olay meydana gelir. Bunlar sırasıyla: Akrozom reaksiyonu, Zona pellusidanın bir glikoproteini olan ZP3'e sperm bağlanması ve Sperm-oosit füzyonudur (Kierszenbaum A. L, 2006).

Oosite yaklaştığında ve Ca^{+} varlığında sperm plazma membranı dış akrozomal membranla kaynaşır. Bu olay akrozom reaksiyonu olarak adlandırılır. Membran füzyonuyla oluşan küçük acıklıklar hidrolitik enzimlerin salınımını kolaylaştırır. Akrozomun ekvatoryal bölgesi membranların kaynaşması sürecine katılmaz

(Kierszenbaum A. L, 2006).

Özet olarak fertilizasyonda birinci bariyer olarak oositin korona radiatası oluşturur ve bu kısım spermmin baş kısmındaki hyaluronidaz enzimi ve sperm kuyruğunun hareketi yardımıyla geçilir. İkinci engel ise oositin ZP'dasıdır. Hareketli sperm ZP'danın ZP₃ reseptörüne bağlanır, intraselluler iyon ve PH'nin yükselmesi ile akrozom enzimlerinin salınmasına neden olur; ZP ile bileşir ve yapısını değiştirir. Üçüncü bariyer ise oositin membrane (oolemma)'dır. Birleşme sonrası sperm oosit membranını geçer ve oosit membranı depolarize olur. Ca⁺⁺ hücre içinde çoğalır ve kortikal reaksiyon gerçekleşir. Reseptörlerin hidrolizi sonucu zona pellusidanın düzenlenmesinin değişimine neden olur. Dördüncü ve son kısım ise fertilizasyon bu üç bariyer sperm tarafından aşıldığında oositin mayoz II (metafaz II)'si tamamlanır. DNA sentezi ve her iki pronukleusun kılıf kaybı olur, kromozomlar karışır ve zigot (46 kromozom.) oluşur (Kierszenbaum A. L, 2006). Bu olay sonucunda yarıklanma başlar.

1.8. Mezenkimal Kök Hücreler

MKH erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları ve genel olarak “destek hücresi” özelliğinde olmalarından dolayı MKH'lerin tıbbın bir çok alanında kullanılması olasılıklarından dolayı temel tıp ve klinik çalışmalarında kullanılabilirler (Conget, P.A., Minguell, J.J. ,1999). Günümüzde rejeneratif tıbbın önemli bir bölümünü oluşturan mezenkimal kök hücreler laboratuvar koşullarında elde edilen hücrelerin petri kapları içerisinde üretilmesi ile gerçekleşmektedir. Birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli dayanıklı hücrelerdir (Çelebi B, 2007). Salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeniyle içinde buldukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar (Diefenderfer, D.L. ve ark. 2003). Doku mikroçevresinin önemli bileşenleri olmaları ve çoğunlukla immün sistem üzerine baskılayıcı özellik taşımalarından dolayı büyük ilgi uyandırmaktadırlar (Dominici, M.ve ark. 2001).

Mezenkimal kök hücrelerin elde edildikleri dokularda çok az sayıda olmalarından dolayı in vitro hücre kültür ortamında çoğaltılmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum hücrelerin kültür ortamında pasajlanmaları sonucu maruz kaldıkları çeşitli uyarılar ve faktörlerin etkisiyle fenotipik, immünojenik ve diğer biyolojik özelliklerinde farklılıklara

yol açmaktadır (Tuli, R. ve ark. 2003). Bu morfolojik durum kök hücrelerin temel bilim araştırmalarında ve klinik kullanımdaki en önemli dezavantajıdır. Mezenkimal kök hücreler ile yapılan temel araştırmaların tamamına yakın bir kısmında in vitro kültür ortamında geliştirilen hücreler kullanıldığı için, detaylı çalışılmış da olsa, bu hücrelerin tanımlanmış özelliklerinin in vivo özelliklerini yansıtmaktan oldukça uzak olduğu bilinmektedir. Bu durum özellikle klinik uygulamalar için dezavantaj oluşturmaktadır. Kültür ortamında pasajlanarak çoğaltılmaya bağlı hücre yaşlanması, sitogenetik bozukluk ve düşük de olsa malign transformasyon riski bulunmaktadır. Aynı zamanda klinik kullanıma uygun kalitede hücre geliştirilmesi için uluslararası kabul edilen akreditasyon koşullarına uygun hücre işleme laboratuvarlarını oluşturmadaki zorluklar, bu hücrelerin klinikte yaygın kullanımına engel teşkil etmektedir (Tae, S.K. ve ark. 2006). Diğer taraftan, özellikle 2000’li yılların ortalarından beri giderek artan, ancak halen az sayıdaki MKH klinik uygulamalarında hücre kullanımına bağlı ciddi olumsuzluklar bildirilmemiştir.

1.8.1. MKH Tanımlama

MKH’ler bağ dokunun ana hücreleridir. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilir (Sekiya, I. ve ark. 2004). Bunun yanı sıra tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler (Minguell, J.J. ve ark. 2001). Bu hücreler ilk kez 1 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, fetal buzağı serumu (FCS) kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. Yıllar sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan pluripotent kök hücreler olduğu, her üç germyaprağından köken alan hücrelere farklılaşma yeteneği bulunduğu ortaya konmuştur. Önceleri, CFU-F (Colony forming unit fibroblast) ve “Kemik iliği stromal fibroblast”ları denilen bu hücreler daha sonra mezenkimal kök/ stromal hücre olarak tanımlanmışlardır (Gregory, C.A ve ark. 2005).

Kök hücreler, olog veya allojenik olabilir ve sistemik yolla veya lokal olarak uygulanabilirler (Şahin, F. ve ark 2005). Araştırmacılar arasında, mezenkimal kök

hücrelerin tipik özelliklerini tanımlamada bazen çelişkiler yaşanmaktadır. Birçok laboratuvar, birbirinden çok da önemli farklılıklar içermeyen protokolleri izleyerek MKH izolasyonu ve bu hücrelerin çoğaltılması, farklılaşmaya yönlendirilmesi için çeşitli metotlar kullanmaktadır. Farklı dokulardan morfolojik ve biyolojik olarak benzer özelliklere sahip MKH'ler izole edilebilmektedir. Ancak yine de hücrelerin farklılaşma ve immünomodulatuvar özellikleri, in vivo etkinliği gibi konularda hücrelerin geliştirildiği çevre koşullarına bağlı değişiklikler olduğu bildirilmektedir. Bu nedenlerden ötürü Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT, UHTD), hem temel araştırmalar hem de pre-klinik çalışmalar için insan MKH'lerini tanımlamada gerekli kriterleri önermiştir. Bu hücrelerin, UHTD tarafından, "kök hücre" olarak isimlendirilmek yerine "mezenkimal stromal hücre" veya "multipotent mezenkimal stromal hücre/ MSC" olarak adlandırılmaları önerilmiştir. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalarda, hücrelerin, konnektif dokular yanında endodermal ve ektodermal kökenli farklı hücrelere dönüşebilme özelliklerinin de gösterilmiş olması, bu hücrelerin halen birçok araştırmacı tarafından "MKH" olarak bahsedilmesine neden olmaktadır. MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; Plastik yüzeye yapışması (plastik adherens), stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir (Silva, W.A.Jr ve ark. 2003).

1.8.2.MKH Kaynakları

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH'ler için ana kaynak sayılmaktadır. Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök/projenitör hücreler bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücreye karşı ortalama 2 ile 100 arasında değişen sayıda MKH mevcut olduğu gösterilmiştir (Colter, C.D. ve ark 2001). Kemik iliği dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Solid dokulardan hücre izolasyonunda enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Kemik/ periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovial sıvı, hatta periferik kandan da adezyon özellikleri nedeniyle ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür (Alhadlaq, A and Mao, J.J. 2004). Mezenkimal kök hücrelerin, elde edildikleri dokudan bağımsız olarak plastik

doku kültür kaplarına yapışabilme, fibroblastoid morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşabilme ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi birçok özellikleri vardır. Bu özellikler büyük ölçüde benzerlik gösterir. Ancak farklılaşma kapasitesi ve fonksiyonel özelliklerinde, köken alınan doku tipine göre bazı değişiklikler olabildiği de gösterilmiştir. Buldukları mikroçevreye ve organizmada ihtiyaç duyulma haline bağlı olarak, MKH'lerin biyolojik özellikleri ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler olduğu da gösterilmiştir. Bununla ilişkili olarak da spesifik bir dokunun onarımı için, o bölgeden elde edilen kök hücrelerin kullanımının avantajları olacağı gündeme gelmiştir.(Hwang SJ ve ark. 2014; Koc, O and Lazarus, H. 2001).

Periferik kanda MKH varlığı ise tartışmalıdır. Periferik kanda osteojenik farklılaşma yeteneği olan nonhematopoetik ve MKH karakterinde hücreler olduğu gösterilmiştir. Özellikle ağır hasar olan durumlarda, kemik kırığı, multiorgan yetmezliği hallerinde periferik kandan MKH izole edildiği gösterilmiştir (Zou J ve ark. 2014). Mezenkimal kök hücrelerle yapılan çalışmalar hep in vitro olduğundan, hücrelerin dokularda yerleşimi, yuvaları/ niş (niche) bölgeleri detaylı incelenmemiştir; yine de özellikle son zamanlardaki çalışmalarda, hücrelerin dokularda perisitler gibi perivasküler yerleşimde olduğu, komşu hücrelerin olgunlaşma, farklılaşma ya da sessiz kalma gibi hücresel fonksiyonlarını koordine ettikleri bildirilmiştir (Farini A ve ark. 2014).

1.8.3.Fiziksel Özellikler Ve In Vitro Çoğaltılma

MKH'ler, kemik iliği de dahil olmak üzere dokularda çok az sayıda bulunmaktadır. Ayrıca adeziv özelliklerine bağlı olarak buldukları dokulardan yeterli sayıda elde edilmelerinde zorluklar vardır. Gerek klinik uygulama, gerekse temel bilim araştırmalarında yeterli hücre sayılarına ulaşabilmek için in vitro ortamda çoğaltılmaları gerekmektedir. Bu hücrelerin in vitro çoğaltılmaya elverişli, dayanıklı hücreler oldukları, kültürde proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerini korudukları bilinmektedir. Kültür ortamında çoğaltılan MKH'ler ışık veya faz kontrast mikroskopi ile incelendiğinde hücrelerin iğ şeklinde olduğu ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oluşturdukları dikkati çekmektedir. Hücreler, düşük konsantrasyonlarda kültür edildiğinde koloni formasyonuna meyil ederken, daha yüksek hücre yoğunluğunda ise koloni oluşturmak yerine yanyana dizilmiş hücre grupları halinde çoğaldıkları gözlenmektedir (Zou J ve ark. 2014).

1.9 AMAÇ

Bu çalışmamızda sıçanlardaki in vitro fertilizasyon modelinde kök hücre faktörleri olarak bilinen niş uygulamasının germ hücreleri ile fertilizasyon sürecine etkilerini araştırdık. Günümüzde artan bir şekilde sorun haline gelen çocuk sahibi olamama durumu, geliştirilen yeni tekniklerle aşılmaya çalışılmaktadır. Bu tekniklerin önemli bir tanesi fertilizasyonun labratuar koşullarında sağlandığı in vitro fertilizasyondur. İn vitro fertilizasyon başarı oranı maalesef hala % 30 civarındadır. Bu başarının artırılması için değişik besiyeri, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi etkenler ile sonuç elde edilmeye çalışılmaktadır. Kök hücreler organizmanın kendi bünyesinde bulundurduğu, kolayca elde edilen ve faktörler aracılığı ile farklılaştırılabilen öncül hücrelerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerin kendilerinin dışında salgıladığı faktörler ile niş denilen bir mikro çevre oluşturarak özellikle kanser hücrelerinde olmak üzere diğer hücreleri olumlu yönde etkiledikleri bilinmektedir. Bu çalışmada sıçanlardan toplanacak oositler ve spermlerin kök hücrenin beklediği besiyerinde muamele edilerek germ hücre yaşam sürecine, kalitesine ve fertilizasyon ile ilişkisine katkısı saptandı. Böylece kaliteli germ hücreleri ile daha başarılı bir embriyo gelişimi saptanmaya çalışıldı.

2. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Etik Kurulundan 27/11/2013 tarihli 77.637.435-71 numaralı etik kurul onayı alınarak yapıldı. Bu çalışmada sıçanlar Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi tarafından temin edildi.

Çalışmada erişkin, daha önce çiftleşmemiş ve deneye girmemiş, 230-280 gr. ağırlığında, 20 adet Wistar albino dişi ve 10 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 25°C oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda, ad-libitum olarak beslenerek; stres ve gürültüden izole bir şekilde çalışmaya alındılar.

Deneye başlanmadan önce bir sıçanın kemik iliğinden alınan MKH'ler kültür ortamında petri kaplarında kültüre edilip kültür ortamında dördüncü pasaja kadar üretildiler. Bu kök hücreler dördüncü pasaja ulaştıklarında tissue culture labtek'teki hücrelerimiz Stro-1 ve CD90 antikorları ile pozitif boyanarak bunların MKH oldukları doğrulanmıştır. Alfa-MEM besiyerinin bu hücrelerde üç gün bekletilmesi ile kemik iliği mezenkimal kök hücre niş besiyeri elde edildi ve 50 ml'lik tüplere alınarak -20°C de saklandı.

Dişi sıçanlar herhangi bir deney uygulanmadan önce vajinal smear örneklerine bakılarak proöstrüs, östrüs, metaöstrüs ve diöstrüs olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Deney gruplarındaki dişi sıçanlar Süperovulasyon uygulanmamış (SO-) ve Süperovulasyon uygulanmış Süperovulasyon (SO+) grubu olarak iki gruba ayrıldı. Bu gruplar kendi içerisinde Alfa-MEM Besiyeri (AMBY), İnsan Tubal Sıvı Besiyeri (İTSBY) ve Single Step Besiyeri (SSBY) ve Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Niş Besiyeri (KİMKHBY) olarak dörde ayrıldı. Deneyler, hem toplanan oositler ile spermeler ve ayrıca fertilizasyonları için gerçekleştirildi.

2.1. Vajinal Yayma Preperat Hazırlanması ve Grupların Oluşturulması

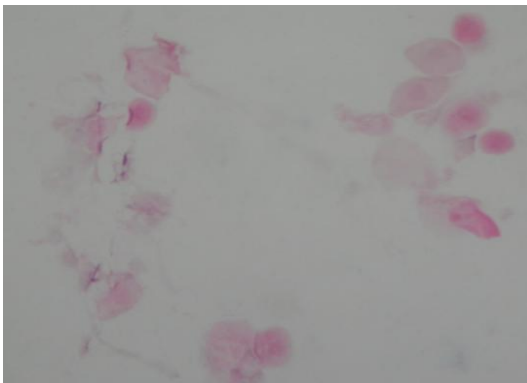
Sıçanlardan vaginal yayma preperatı, kulak çubukları yardımı ile vaginal sürüntü yapılarak alındı. Alınan sürüntü lama düzgün bir şekilde yayılarak %70'lik alkol ile 1 dk. Süreyle tespit edilmiş ardından Hematoksilende 1 dk bekletilip musluk suyu içeren kabta yıkanmıştır. Daha sonra örnekler 1 dk Eozin solüsyonu içerisinde 1 dk bekletildikten sonra

musluk suyu ile yıkanan örnekler kurumaya bırakılmış daha sonra lamel ile kapatılarak, mikroskop altında incelenerek östrus grupların ayrılması sağlanmıştır. Yaymanın ayrı ayrı bulunan keratinleşmiş süperfisiyal hücrelerden oluştuğu, gruplar halinde şekillendikleri preparatlar Östrus grubu olarak belirlendi.

Proöstrus: Yaymanın pembe-mor renkte olduğu, intermedier hücrelerin yoğun, parabazal hücrelerin ve mukusun nadir olduğu ve lökositlerin gözlenmediği preparatlar **Proöstrus grubu** olarak belirlendi. **Östrus:** Yaymanın ayrı ayrı bulunan keratinleşmiş süperfisiyal hücrelerden oluştuğu, gruplar halinde şekillendikleri preparatlar **Östrus grubu** olarak belirlendi. **Metöstrus:** Metöstrus fazında, bir kısmında sitoplazmik vakuollerin yer aldığı sıkıca paketlenmiş çok sayıda nükleuslu epitel hücresi ve çok sayıda artmış nötrofil gözlenen grup **Metöstrus grubu** olarak belirlendi. **Diöstrus:** Yaygın olarak lökositlerin ve aralarında parabazal ve intermedier hücrelerin izlendiği preparatlar **Diöstrus grubu** olarak belirlendi.

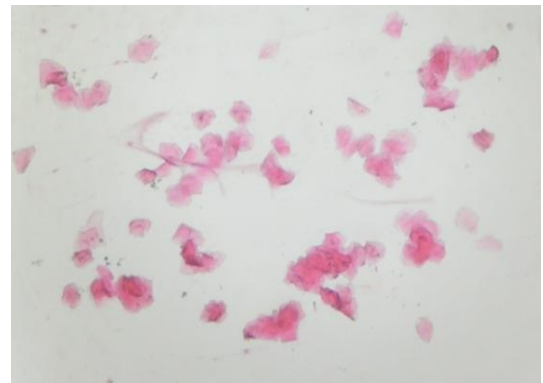
Sıçan siklusunda süreler seksüel siklus için 4-5 gün olup, proöstrüs ve östrus 12 saat, metaöstrüs 20 saat ve disöstrus 57 saattir. Dişi sıçanların puberte dönemleri doğdukları günden yaklaşık 40.-60. günden sonra başlar. Ortalama ağırlıkları 200-275 g olup gebelik süreleri 20 ila 22 gündür. Bir seferde ortalama 9 yavru verebilirler fakat doğurdıkları yavru sayısı 1 ila 20 yavru arasındadır. Yavru sıçanların ise ortalama ağırlıkları 5-6 g olarak bilinir (Evirgen G, 2013).

Proöstrus Grubu(x100)



Parlak renkte ve mukusun nadiren izlendiği, keratinleşmemiş intermediyer hücrelerin predominant ve parabazal hücrelerin sık görülmez ve lökositlerin bulunmaz

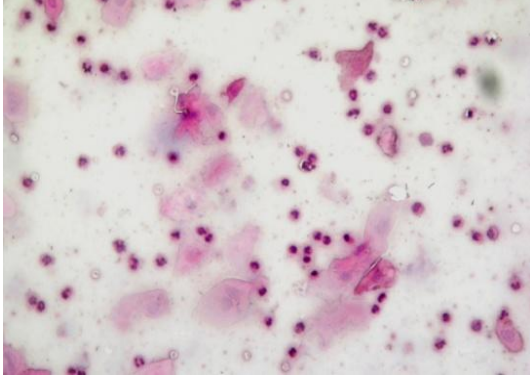
Östrüs Grubu(x100)



Keratinleşmiş süperfisiyal hücrelerden gruplar oluşturur. Bu hücreler çekirdeksiz olup kümeler şeklinde

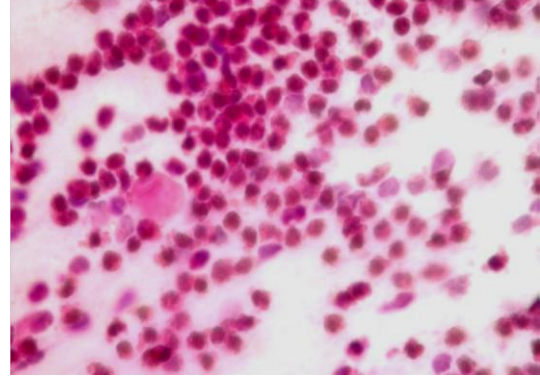
bulunurlar.

Metaöstrüs Grubu(x100)



Az sayıda keratinleşmiş süperfisiyal hücreler ve çok sayıda lökosit

Diöstrüs Grubu (x200)



Bol miktarda lökositlerin gözleendiği, çok az miktarda parabazal ve intermediyer hücreler

Resim. 2.1.1. Sıçan menstueal siklus görüntüleri.

2.2. Örneklem

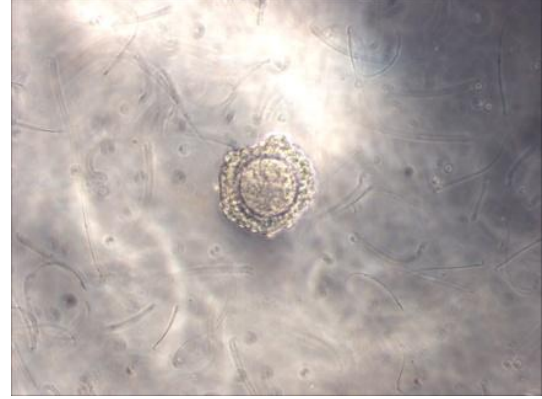
Süperovulasyon yapılan gruba da Folicular Stimulating Hormone (FSH, Pregon, Organon) ve Human Coryonic Gonadotropin (HCG, Pregnyl, Organon) verildi. Birinci gruptaki dişi sıçanlardan 10 tanesine hiçbir süperovulasyon işlemi yapılmayacaktır. İkinci grubundaki 10 sıçana 25 IU FSH uygulaması yapıldıktan 48 saat sonra 20 IU HCG ile süperovulasyon yapılmıştır. HCG enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanlar eter ile anestezi edildikten sonra servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldü ve ovaryumları steril pens ve makas yardımı ile çıkartılarak tüp içerisindeki RPMI (Biochrom 0844B) besiyeri içerisine kondu. Oositleri inceleyebilmek için, tuba uterinaları ve ovaryumları kültür kaplarına (No. 1016 FALCON petri dishes) kondu ve tekrar RPMI besiyeri ile yıkandı. RPMI besiyeri içerisindeki ovaryumlar ve tuba uterinalar oosit toplanması için insülin enjektörü yardımı ile parçalandı. Parçalanmış ovaryum ve tuba uterina örnekleri dış ortama alınıp stereomikroskop (Olympus SZX12, şehir, ülke) altında inceleme yapıp cam pasteur pipeti (İsolab 225 mm) yardımı ile toplanır. OKK tuba uterina dışına çıktı. Pastör pipeti yardımıyla oosit kumulus kompleksleri toplandı. İlk önce Wolf ve ark. (1988) oosit morfolojisi için inceleme sistemine göre incelendi. Bu sisteme göre 1. derece (A) olarak sınıflanan OKK olgunlaşmamış, 2. derece olarak sınıflanan OKK olgunluğa yakın ya da

olgunluk öncesi oositler, 3. derece olarak sınıflanan OKK olgun, 4. derece olarak sınıflanan OKK dejenere olarak kabul edildi (**Tablo 2.2.1**).



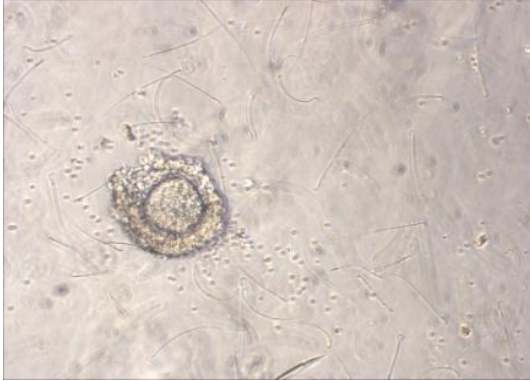
1.Derece (A),

Seyrek ya da bulunmayan kumulus ooforus hücreleri ve 1-3 tabaka korona radiata hücreleri (x200).



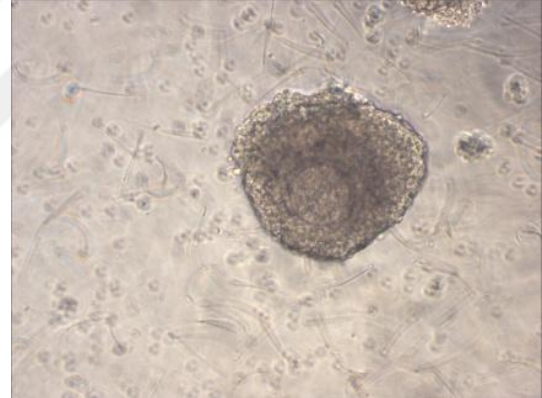
2. Derece (B)

Yoğun kumulus ooforus hücreleri ve sıkı paketlenmiş korona radiata hücreleri(x100).



3.Derece (C)

Genişlemiş, yumak şeklinde kumulus ooforus hücreleri ve genişlemiş korona hücreleri(x100).



4.Derece(D)

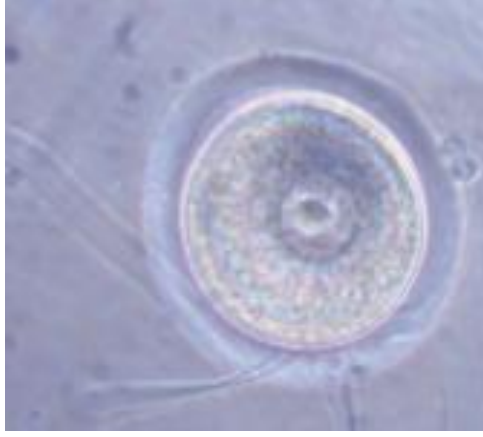
Genişlemiş, seyrek kumulus ooforus hücreleri ve genişlemiş, genellikle kısmen yok olmuş korona radiata hücreleri (x100).

Tablo.2.2.1. Wolf ve arkadaşlarının (1988) oosit-kumulus kompleksi için inceleme sistemi.

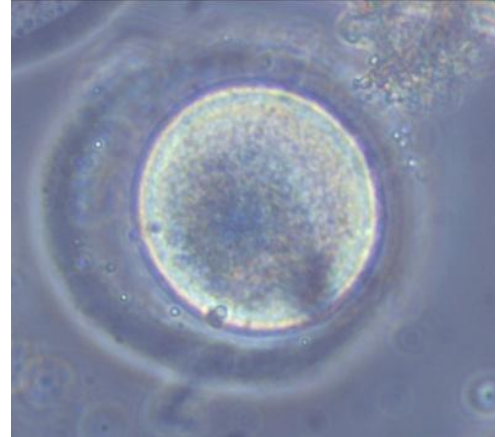
Süperovulasyon yapılmayan gruptaki sıçanlara östrüs bakıldı ve östrüs dönemindeki sıçan eter yardımı ile anestezi edildi. Anestezi edilen bu sıçan servikal dislokasyon

yöntemi ile öldürüldü ve karın batımı kesilerek ovaryumları çıkartıldı ve RPMI besiyeri içerisine kondu. Beş adet sıçanın bir ovaryumu histolojik inceleme yapılabilmesi için %10'luk formaldehid'in içerisine atıldı. Hücre kültürü ortamında steril laminar flow içerisine alınan bu ovaryumlar kabin içerisinde bir petri kabına aktarıldı. Daha sonrasında bu ovaryumlar steril PPT enjektörü ile parçalandı ve mikroskop altına alınarak parçalanmış alan tarandı. Parçalanmamış foliküller ise mikroskop altında PPT enjektörü ile parçalanarak içerisindeki oositler çıkartıldı. Taranan petri alanında görülen oositler daha önceden sterilize edilmiş cam pasteur pipeti yardımı ile toplanarak daha önceden küçük petri kaplarında damlalar şeklinde tutarak gazladığımız İTSBY , SSBY, AMBY ve KİMKHBY'ne alınarak kültüre edildi.

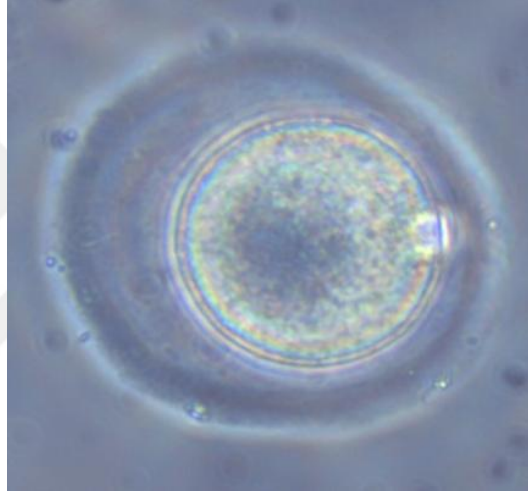
Elde edilen oositlerin sayısı ve olgunluğunun değerlendirilmesi inverted mikroskop (Olympus) ile yapıldı. Oositlerin olgunluğu polar cisimciğin incelenmesine göre yapıldı. Polar cisimciğin saptanması oositin Metafaz II (MII) olduğunu ortaya koydu. Polar cisimciğin olmadığı durumlarda oositin sitoplâzmasındaki değişiklikler incelendi. GV görüldüğü durumlarda P1 oosit olarak kabul edildi. GV görülmediği durumlarda ise Metafaz I (MI) oosit olarak kabul edildi (**Resim 2.1.1**). Resimler Inverted mikroskoba bağlı bulunan CCD (Charged Coupled Device) kamera sistemi ile çekildi.



PROFAZ I OOSİT



METAFAZ I OOSİT



METAFAZ II OOSİT

Resim 2.2.1. Sıçanlardan toplanan profaz I, metafaz I ve metafaz II oosit örnekleri,

IVF işlemini gerçekleştirmek amacıyla birinci ve ikinci gruplarda kullanılan erişkin erkek sıçanlar eter yardımı ile anestezi edildi. Anestezi edilen erkek sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldü. Bu erkek sıçanların karın batımları kesildi ve testisler skrotum içerisinden çıkartıldı. Çıkarılan testisler steril makas yardımı ile kesildi ve steril bir pens ile 50 ml'lik tüp içerisindeki RPMI kültür besiyeri içerisine alındı.

2.3. Östrüs Grubuna Ait Over Örneklerinin Histolojik Değerlendirilmesi

Vajinal smear yöntemi ile östrüs döneminde olduğu belirlenen sıçanlar eter yardımı ile anestezi edildi. Anestezi edilen sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile

öldürüldü. Öldürülen sıçanların sağ ve sol ovaryumları çıkartılarak %10'luk formaldehid (Tablo 2.3.1.1) içerisinde 24-48 saat bekletilerek fiske edildi. Doku örnekleri, rutin ışık mikroskopi parafin doku takibi yöntemi ile takip edilerek; derecesi giderek artan alkol serileri ile dehidratasyon işlemini takiben, ksilen ile şeffaflaştırılarak parafine gömüldü.

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
A. TESPİT	% 10 FORMALİN	24-48 SAAT
	AKAR SU	16 SAAT
B. DEHİDRATASYON	% 60 ALKOL	½ SAAT
	% 70 ALKOL	½ SAAT
	% 80 ALKOL	½ SAAT
	% 95 ALKOL	½ SAAT
	% 100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C. ŞEFFAFLAŞTIRMA	% 100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
	ALKOL:KSİLEN (1:1)	½ SAAT
	KSİLEN I	1 SAAT
	KSİLEN II	1 SAAT
D. İNFİLTRASYON	KSİLEN-PARAFİN (1:1)	½ SAAT
	PARAFİN I	1 SAAT
	PARAFİN II	1 SAAT
E. GÖMME	PARAFİN	

Tablo 2.3.1.1 Parafin doku takip protokolü (Evirgen G, 2013).

2.4. Histokimyasal Bulgular

2.4.1. Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama

5 µm. kalınlıkta alınan kesitler bir gece öncesinden 60°C etüve konup deparafinize edildikten sonra, 1 saat ksilene konularak kimyasal deparafinizasyon işlemi uygulandı. Derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek suya getirilen kesitler yaklaşık 5 dk akarsu altında bekletildikten sonra hematoksilen solüsyonu ile 5 dakika boyandı. Asit-alkol içerisine bir kere batırılıp çıkarılan kesitler 5 dk kadar akar sıda bekletilir. Daha sonrasında bu kesitler eozin boyası ile 3 dakika boyandı. Kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilen içine alındı (Tablo 2.4.1.1). Ksilen içinde 30 dakika bekletilen kesitler entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskop altında (Olympus BX-40) incelendi ve fotoğrafları çekildi.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	% 60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	% 80 ALKOL	1 DAKİKA
	% 95 ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA VEYA ETÜVDE	
	KSİLEN	1 SAAT
KAPAMA	ENTELEAN	

Tablo 2.4.1.1. H-E boyama protokolü (Evirgen G, 2013).

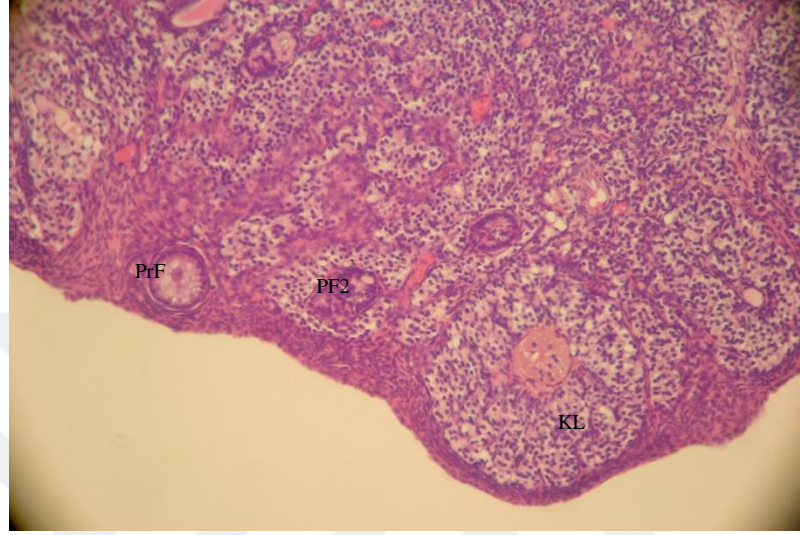
2.5.Kontrollü Ovaryum Hiperstimülasyon (KOH) Protokolü

Kontrollü ovaryan stimülasyon oluşturma protokolüne göre; 25 IU FSH (Foliküler Stimulating Hormone) intramuskuler (i.m) yolla enjekte edildikten 48 saat sonra 20 IU HCG (Human koryonik gonadotropin) enjekte ettik. Çalışmalarda deney hayvanının cinsine göre tercih edilen protokolün de değiştiğini görmekteyiz. Bu yüzden bazı çalışmalarda farklı dozajlarda stimülasyon protokolleri uygulanmıştır. Bu protokole göre ilk gün deney gruplarında bulunan hayvanlara 25 IU/0,2ml/rat dozunda FSH verildi. FSH uygulamasından 48 saat sonra ovulasyon için 20 IU/0,1ml/rat olacak şekilde HCG enjekte edildi. HCG enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanlar eter yardımı ile anestezi edildikten sonra servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülüp ovaryumları çıkartılarak oositler hücre kültürü ortamında toplandı.

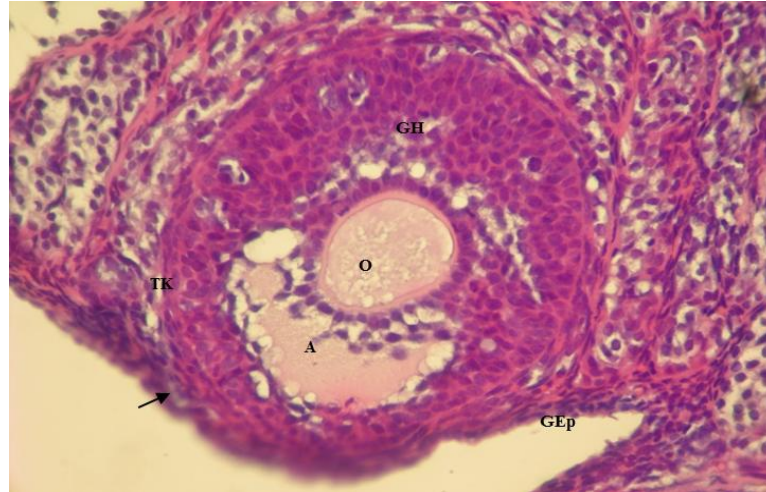
2.6. Folikül Sayımı ve Tanımlaması

Çalışmada sayımı hedeflenen primordiyal ve primer foliküller aşağıdaki kriterler çerçevesinde sayıldı. Primer oositi çevreleyen tek tabaka yassı granüloza hücrelerinin gözlendiği foliküller **Primordiyal folikül** olarak (**Resim 2.6.1**), primer oositi çevreleyen bir tane bile yassı hücre içermeyen tek tabaka kübik granüloza hücrelerinin gözlendiği foliküller ise **Primer folikül** (**Resim 2.6.1**) olarak tanımlandı. Antrum var olan, oositin etrafı korona radiata hücreleri ile çevrelenmiş olan folikül **Sekonder Folikül** (**Resim**

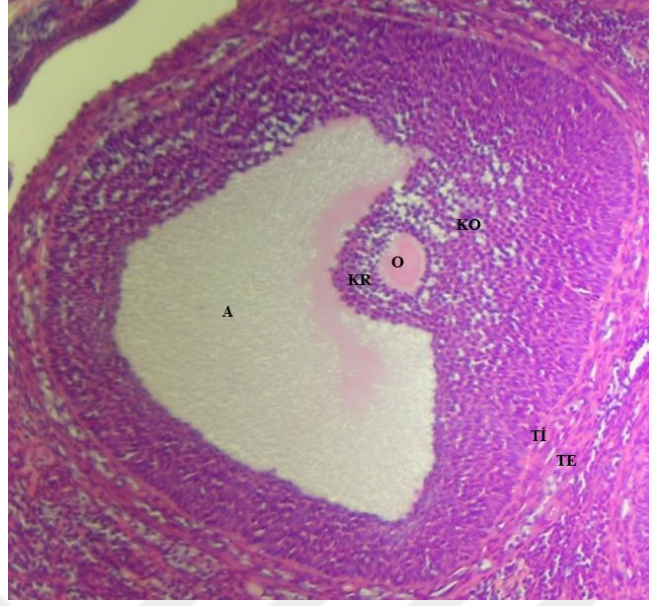
2.6.2), antum gelişmiş, oositin etrafı korona radiara ile çevrenmiş ve kumulus oosforus adı verilen granüloza hücrelerinden oluşan bir tepecik tarafından tutulan oositin bulunduğu folikül ise **Tersiyer (Graff) Folikül (Resim 2.6.3)** olarak adlandırılır.



Resim. 2.6.1. Primordiyal ve primer folikül; F: Tek katlı yassı epitelle çevrili primordiyal folikül: PrF, Tek katlı kübik epitelle çevrili primer folikül:PF1, Tek katlı prizmatik epitelle döşeli ileri gelişmiş primer folikül:PF2, KL: Korpus Luteum, H-E X200 objektif



Resim 2.6.2. Sekonder folikül; KR: Korona Radiata, O: Oosit, TE: Teka Eksterna, Tİ: Teka İnterna, A: Antrum, H-E x400



Resim 2.6.3. Tersiyer (graff) folikül; KR: Korona Radiata, KO:Kumulus Ooforus, O: Oosit, TE: Teka Eksterna, Tİ: Teka İterna, A: Antrum, H-E x400

2.7. Oosit, Sperm Ve Embriyo Kültürü

Bu çalışmada dişi sıçanlardan östrüs dönemlerine bakılarak östrüs çıkan sıçanlardan alınan ovaryum örnekleri (**Resim 2.7.1**) mikroskop altında steril cam pasteur pipeti ile ilk olarak toplanıp petri kapları içerisinde bulunan çeşitli besiyeri damlalarının içerisinde konarak grupların farklılıkları gözlemlendi. Süperovulasyon yapılmayan gruptaki sıçanlara östrüs bakıldı ve östrüs dönemindeki sıçan eter yardımı ile anestezi edildi. Anestezi edilen bu sıçan servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldü ve karın batını kesilerek ovaryumları çıkartıldı ve RPMI besiyeri içerisinde kondu. Hücre kültürü ortamında steril laminar flow içerisinde alınan bu ovaryumlar kabin içerisinde bir petri kabına aktarıldı. Daha sonrasında bu ovaryumlar steril PPT enjektörü ile parçalandı ve mikroskop altına alınarak parçalanmış alan tarandı. Parçalanmamış foliküller ise mikroskop altında PPT enjektörü ile parçalanarak içerisindeki oositler çıkartıldı. Taranan petri alanında görülen oositler daha önceden sterilize edilmiş cam pasteur pipeti yardımı ile toplanarak daha önceden hüçük petri kaplarında damlalar şeklinde tutarak gazladığımız İTSBY, SSBY, AMBY ve KİMKHBY alınarak kültüre edildi.

Deney hayvanları laboratuvarından alınan bir erişkin erkek sıçan eter yardımı ile anestezi edildi ve laboratuvar koşullarında servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldü. Öldürülen erkek sıçanın testisleri çıkartıldı (**Resim 2.7.2**) ve %10'luk fetal bovin serum içeren (FBS) RPMI besiyeri içerisine atıldı. Hücre kültürü ortamına alınan bu besiyeri içerisinde testis örnekleri laminar air flow kabini içerisinde bir petri kabına alındı. Petri kabındaki testislerin etrafındaki fazla yağ kısmı ayıklandı. Temiz besiyeri ortamına alınan bu testisler bistüri ucu yardımı ile epididimislerinin uç kısımları kesilerek testis sıvazlandı. Daha sonrasında 1000 ml'lik pipet yardımı ile besiyeridaki spermier 15 ml'lik tüp içerisine toplandı ve 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmındaki spermier alınarak lam üzerine yayıldı ve sayım yapıldı. Spermier görüldükten sonra 15'lik tüp içerisindeki spermier pipet yardımı ile toplanıp oositlerin bulunduğu damlaların içerisine 30 µl sperm verildi (Ort. 1000 sperm).



Resim 2.7.1. Ovaryum örneklerinin in vivo alınışı ve oosit eldesi (O:Ovaryum, U:Uterus, TU: Tuba Uterina.)



Resim 2.7.2. Erkek sıçandaki testis görüntüleri(T: Testis, E: Epididimis)

2.8. IVF Protokolü

2.8.1. İnseminasyon

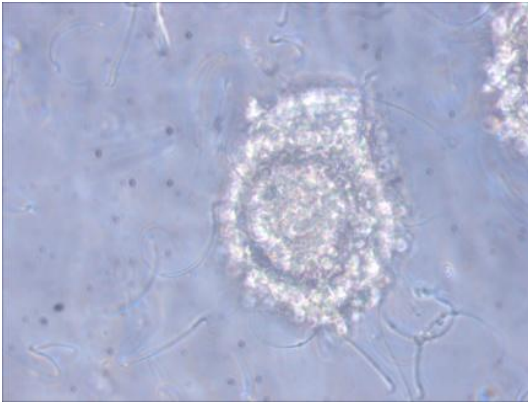
İTSBY, SSBY, KİMKHBY ve AMBY petri kabına 50 µl olacak şekilde petri kabına konup bir gece öncesinden inkübatörde bırakılarak gazlandı. besiyerlerinin üzerini kaplayacak şekilde mineral oil (İrvine Scientific, 9305) ile örtüldü. Her bir kuyucukta 4-13 (ort.) oosit bulunan besiyerleri içerisine ml' deki sperm sayısı 1 milyon olacak şekilde, pipet ile oosit başına 10µl sperm koyuldu. İnkübatörde kapasite edilen spermiler oosit başına bu oranlarda verilmek üzere hesaplanır.

2.8.2. Zigotlar

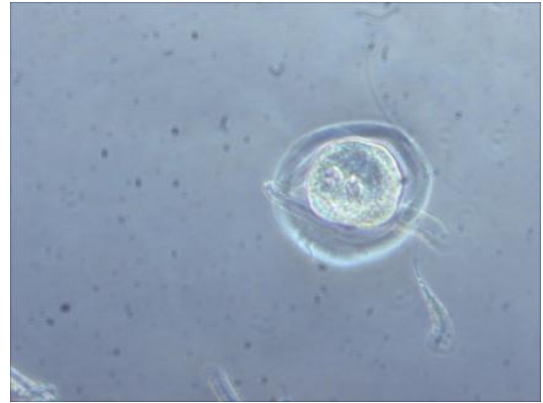
Döllenme inseminasyondan 48 saat sonra kontrol edildi ve sitoplazmada iki pronükleus, perivitellin aralıkta iki polar body bulunan zigot döllenmiş kabul edildi. Bu aşamada zigotlar dikkatlice fertilizasyon besiyerlerinden alınıp bir gün önce hazırlanıp gazlanmış olan embriyo klivaj (embriyo bölünme) besiyerine aktarıldı.

2.8.3. Embriyo Kültürü

Zigotlar embriyo gelişimini incelemek amacıyla 9. güne kadar inkübe edildi. Embriyolar üçüncü günde dört, dördüncü günde ortalama sekiz hücreli aşamaya gelir **(Resim 2.8.3.1).**



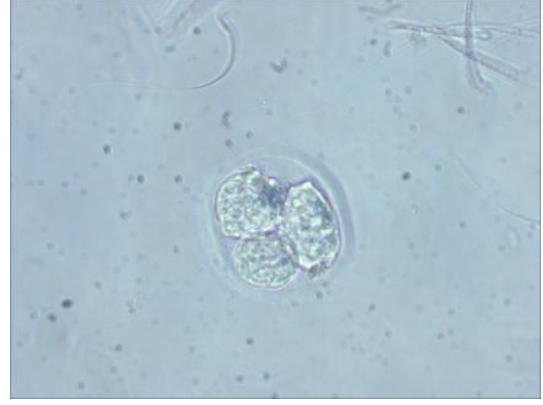
A.Sperm Oosit İçerisine Girişi x200



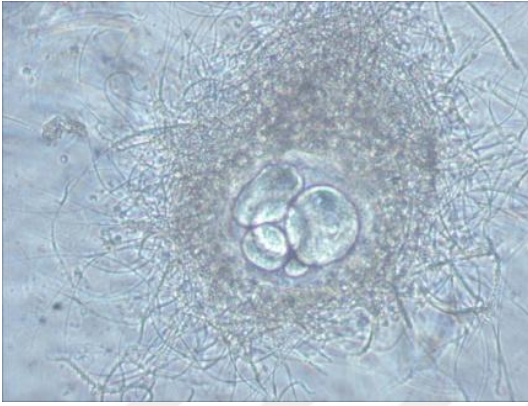
B.İki Pronükleus Karşı Karşıya x200



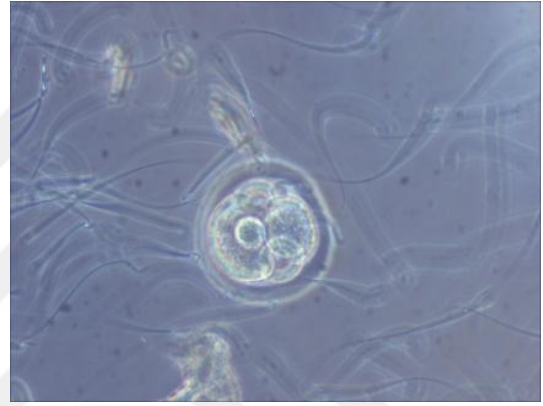
C.2 Hücreli Embriyo x200



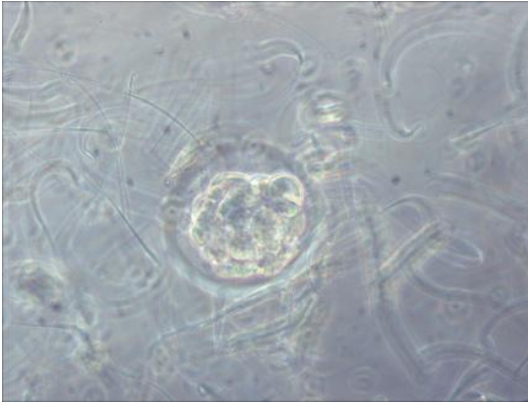
D.4 Hücreli Embriyoya Giden x200



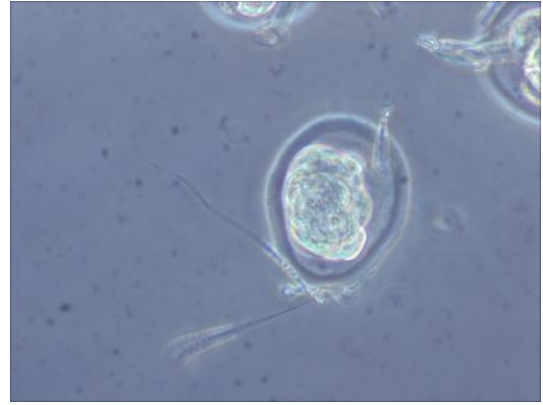
E.8 Hücreli Embriyoya Giden x200



F. Compaction Evresi x200



G. Morula Evresi x200



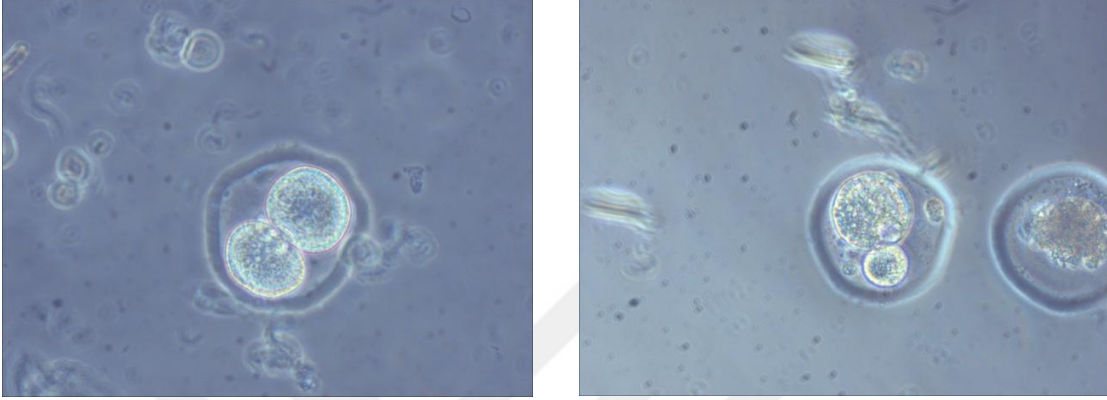
H. Blastosistte Giden x200

Resim 2.8.3.1. Embriyoların çeşitli embriyonik fazlardaki görüntüleri

2.9. Embriyo Morfolojisinin Belirlenmesi

Embriyo kalitesi; blastomerlerin sayısı, büyüklüğü, perivitellin aralıktaki sitoplazmik fragmantasyonların büyüklüğü ve miktarına göre değerlendirildi. Grade A embriyo (iyi kalite embriyo); blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte, fragmantasyonu olmayan veya

%20' nin altında olan, 2. gün 4 blastomer, 3. gün 8 blastomer içeren embriyolardır (**Resim 2.9.1**). Grade B embriyo; Grade A' nın dışında kalan, blastomerleri eşit büyüklükte olmayan, fragmantasyonu %20' den fazla olan, 2. gün 4 hücrenin altında 3.gün 8 hücrenin altında blastomere sahip olan embriyolardır (**Resim 2.9.1**).



Grade A 2 hücreli embriyo(X200)

Grade B 2 hücreli embriyo(X200)

Resim 2.9.1. Grade A ve Grade B embriyoların görüntüleri

2.10. Mezenkimal Kök Hücrelerin Fonksiyonel Tanımlanması

2.10.1. Belirteçlerin İmmunohistokimyasal Yolla Gösterilmesi

İmmünofenotipleme hücrelerin yüzeyinde veya hücrelerin içerisinde antijenik yapıda olan proteinlerin, floresein izotiyosiyanat (FITC) ve fikoeritrin/PE) gibi floresan boya ile (flokrom) işaretlenmiş özgün monoklonal antikolarla inkübe edilerek bu antikolarla bağlanması esasına dayanır. Taşıdıkları antijenik yapının özelliğine göre farklı florokromlarla işaretlenen hücreler akım sitometrisinde bir basınç altında akarken lazer ışınlarına maruz kalırlar. Hücrelerin üzerine bağlanan floresanla konjuge edilmiş monoklonal antikolar, lazer ışınını absorbe ederek, üzerindeki flokromun özelliğine göre farklı dalga boylarında ışınlar saçarlar. Her hücreden saçılan ışınlar, çoklu dedektörler yardımı ile belirlenir ve elektrik enerjisine çevrilen bilgiler, bilgisayar ortamına aktarılarak analiz edilir. (Desmond A. 2001)

2.10.2 Kemik İliği Stromal Kök Hücre Kültürü

Yakın akraba olan hayvanlardan alınan kök hücreler farklılaştırılarak PPD enjektör yardımı ile yakın akraba KİSKH izolasyonu için 10 mg/kg ksilazin+ 50 mg/kg ketamin anestezisi altında, sağ bacağı antiseptik solüsyon ile temizlendikten sonra, sağ tibia eklem yerlerinden ayrılarak çıkarılmıştır. Steril kabin içinde tekrar alkole batırılan tibia epifizlerinden kesilerek basınçla uygulanan besiyeri ile alınan hücreler kültür işlemine alınmıştır. Hücreler farklı besiyerlerine alınıp falkon tüpleri ile 100 rpm'de 5 dakika iki defa santrifüj edildikten sonra her bir 25 mm kapta aynı sayıda olmak üzere % 80 BY ve %20 FBS olan karışım içinde %5'lik CO₂'li etüve koyularak inkübasyona bırakılmıştır. KİMKH için 3 günlük beklemenin sonunda yapışmayan hücreler uzaklaştırılarak kapta kalan hücrelerin kültürüne devam edilmiş bir grup hücre farklılaştırma besiyerinde farklılaştırılırken bir grup hücre pasajlanıp tekrardan flasklar içerisine konup üremesi beklenerek, yaşlanması izlenmiştir (Aghaloo TL. ve ark. 2010). Semikonfluent aşamada faz contrast mikroskop ile en iyi olgulaşan ve en uygun oldukları düşünülen besiyerindeki hücreler hayvanlara transplante edilmiştir. Bir grup hücre in vivo yaşantısını takip amaçlı işaretlenerek transplante edilmiş ve in vivo olarak incelenmiştir. Hayvan gruplarının overleri belirli günlerde çıkarılarak parafin doku takibinden sonra immünohistokimyasal boyamalar yapılarak hücrelerin akıbeti hakkında bilgi sahibi olmaya çalışılmıştır.

2.10.3. Kök Hücre Tanımlaması için STRO-1 ile CD44 İmmunohistokimyası

Alınan örnekler immünohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilecektir. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletilecektir. Dakopen (İnvitrogen, 726603017) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulanacaktır. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edilecektir. Bloklama solüsyonu (İnvitrogen,

1153384) dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar CD90 ve Stro-1 ile bir gece inkübe edilecektir. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan örnekler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (İnvitrogen, 1153384) ile 30'ar dakika boyanacaktır. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (İnvitrogen, 10187237) ile 5 dk boyanacaktır. Mayer's hematoksilen (ScyTek ,14674) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma besiyeri (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatılacaktır. İmmunohistokimyasal değerlendirme incelenerek zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilecektir.

2.11. Fertilizasyon Kriterleri Ve Oosit Olgunlaşması

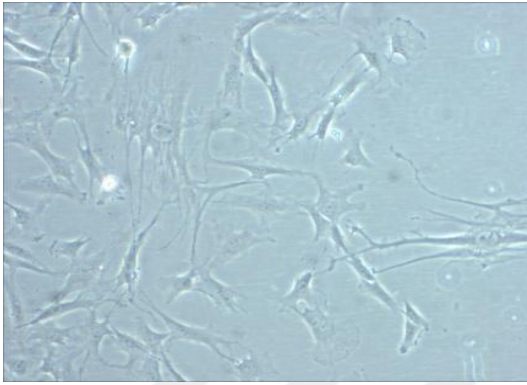
İnsan IVF metodlarını geliştirmek ve günümüzde IVF başarı oranını artırmak için kemiriciler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar için sıçan, fare, kobay, tavşan gibi birçok kemirgen ve memeli kullanılmaktadır. Laboratuvar koşullarında 10 adet dişi sıçana östrüs bakıldıktan sonra 48 saat ara ile FSH ve HCG verildi. HCG verildikten 48 saat sonra süperovulasyon yapılmış sıçanlarımız eter yardımı ile anestezi edildikten sonra hücre kültürü ortamında ovaryumları çıkartıldı, RPMI besiyeri içerisine konarak burada PPT enjektörü yardımı ile hücre kültürü içerisinde folikülleri parçalandı. Parçalanma sonucunda ovaryumdaki foliküller içerisinde bulunan oositler kültür kabına dağıldı ve bu oositler steril cam pasteur pipetleri yardımı ile toplanarak daha önceden hazırlanmış ve bir gece öncesinden inkübatörde bekletilerek gazlanmış İTSBY, SSBY, AMBY ve KİMKHBY içerisine eşit miktarda olacak şekilde konmuştur. Aynı işlem süperovulasyon yapılmayan gruptaki sıçanlara da uygulandı. Toplanan oositlerin üzerine erkek sıçanların epididimislerinden toplanan spermiler eklendi ve 0, 3, 6 ve 9. günlerde incelenerek fertilizasyon kriterleri araştırıldı.

Fertilizasyonun yanı sıra bu çalışmamızda oosit maturasyonu ve oosit yaşam süresi de incelendi. Sıçan ovaryumundan toplanan PI, MI ve MII oositlerinin maturasyonu, yaşam süreci, oosit kalitesi ve fertilizasyon oranı hesaplandı.

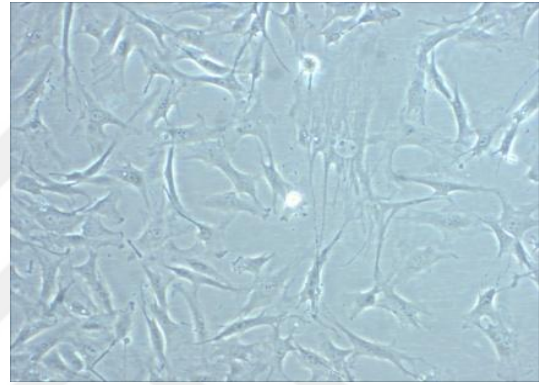
3.BULGULAR

3.1. KİMKH Tanımlanması

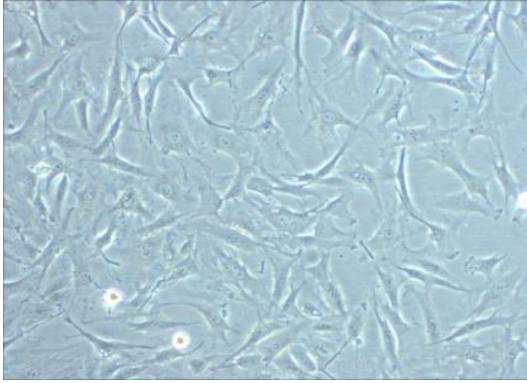
Hücre kültürü laboratuvar koşulları altında sıçan tibia ve femur bölgesinden toplanan KİMKH besiyeri ortamında konfluent oluncaya kadar kültüre edildi. Hücreler dördüncü pasaja kadar pasajlama işlemi yapıldıktan sonra farklılaşmaya en uygun hale geldi (**Resim 3.1.1**).



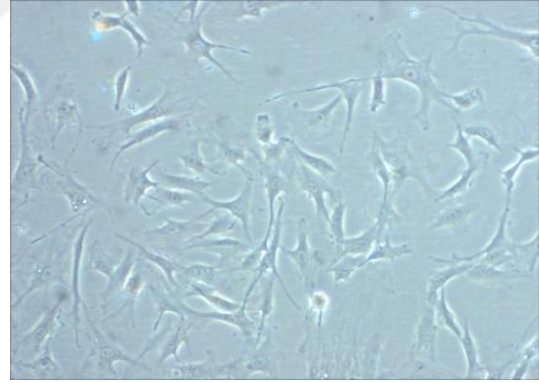
A. KİMKH Pasaj 4 x100



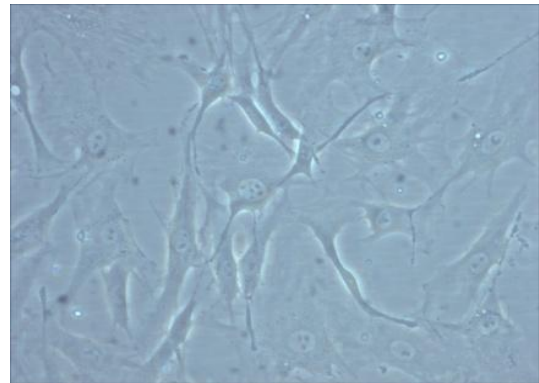
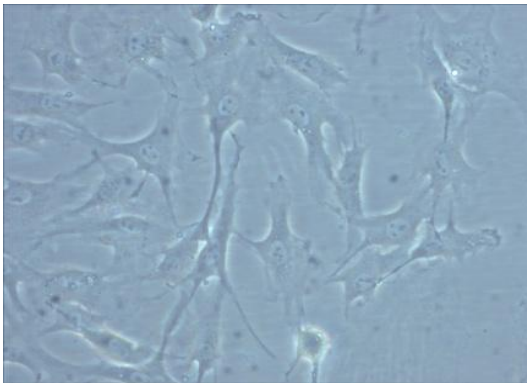
B. KİMKH Pasaj 4 x100



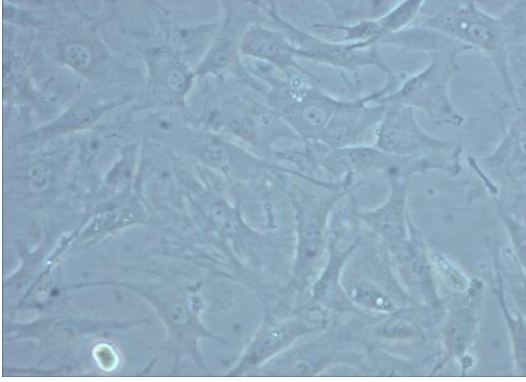
A. KİMKH Pasaj 4 x100



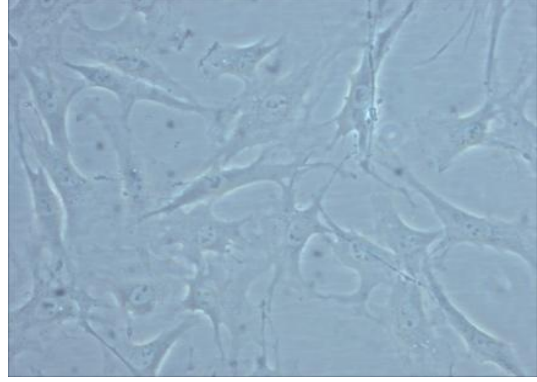
B. KİMKH Pasaj 4 x100



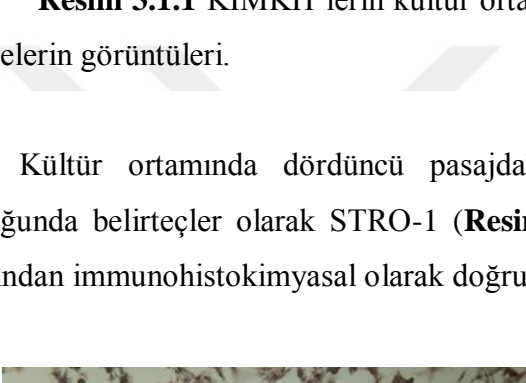
C. KİMKH Pasaj 4 x200



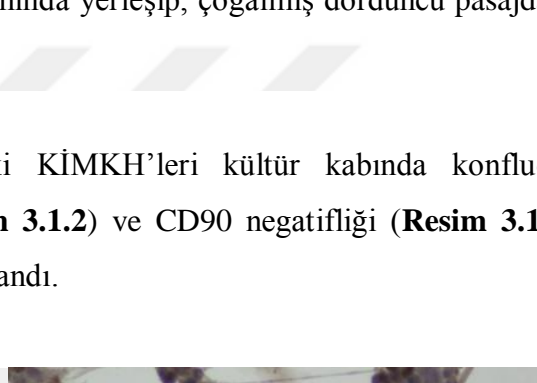
D. KİMKH Pasaj 4 x200



E. KİMKH Pasaj 4 x200

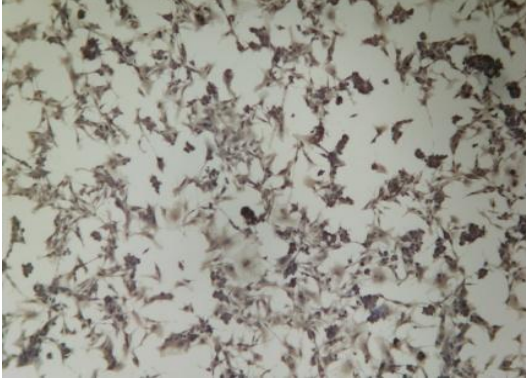


F. KİMKH Pasaj 4 x200

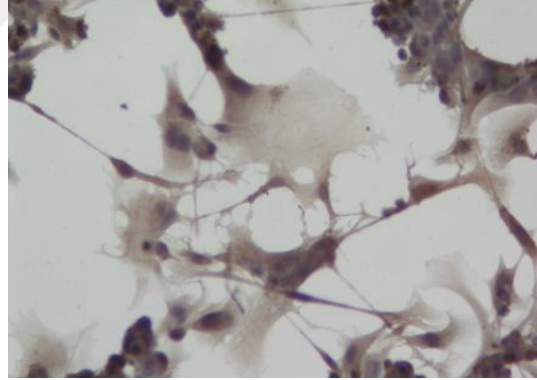


Resim 3.1.1 KİMKH'lerin kültür ortamında yerleşip, çoğalmış dördüncü pasajdaki hücrelerin görüntüleri.

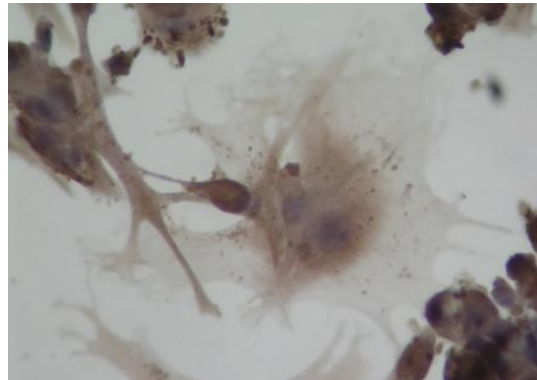
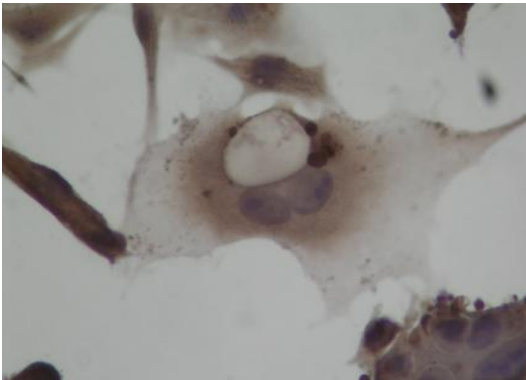
Kültür ortamında dördüncü pasajdaki KİMKH'leri kültür kabında konfluent olduğunda belirteçler olarak STRO-1 (**Resim 3.1.2**) ve CD90 negatifliği (**Resim 3.1.3**) açısından immunohistokimyasal olarak doğrulandı.



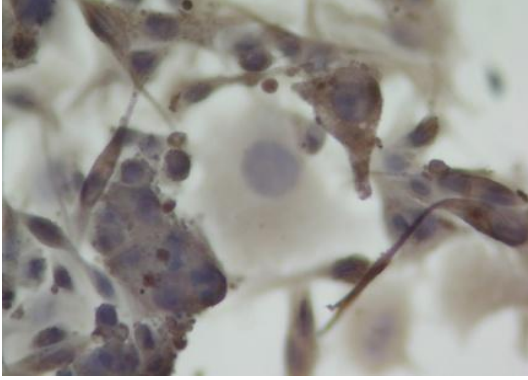
A. KİMKH Stro-1 x40



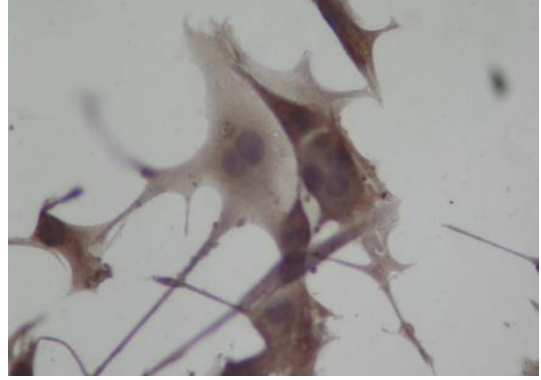
B. KİMKH Stro-1 x100



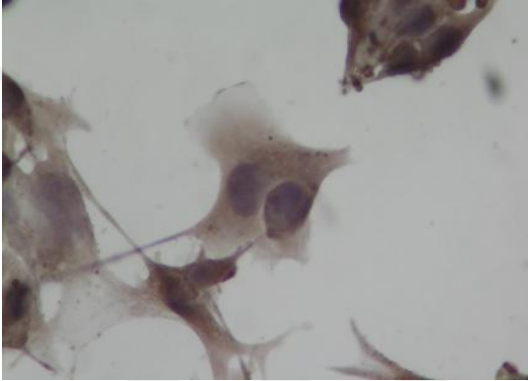
C. KİMKH Stro-1 x400



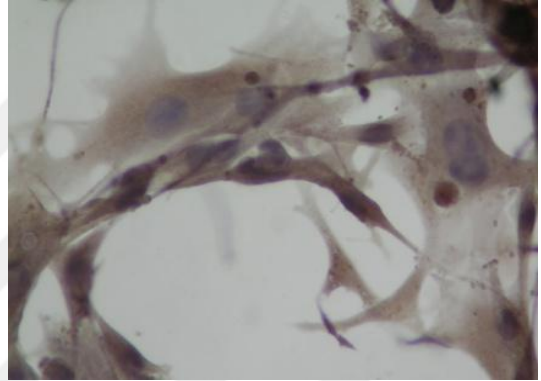
D. KİMKH Stro-1 x400



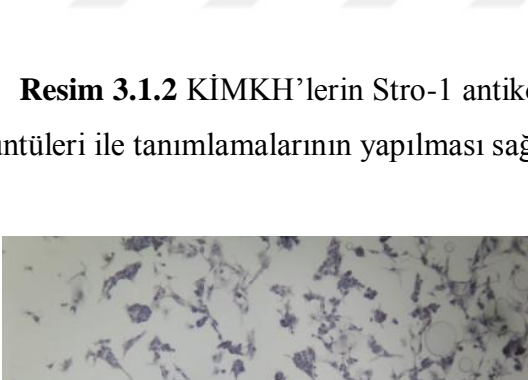
E. KİMKH Stro-1 x400



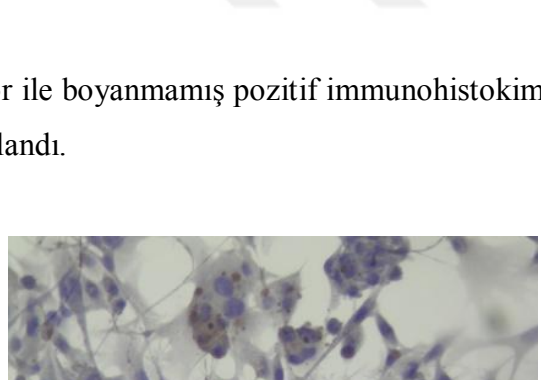
F. KİMKH Stro-1 x400



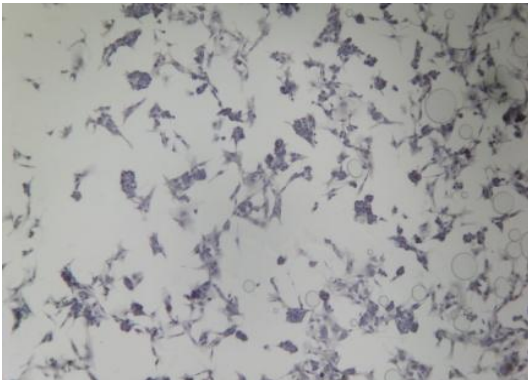
G. KİMKH Stro-1 x400



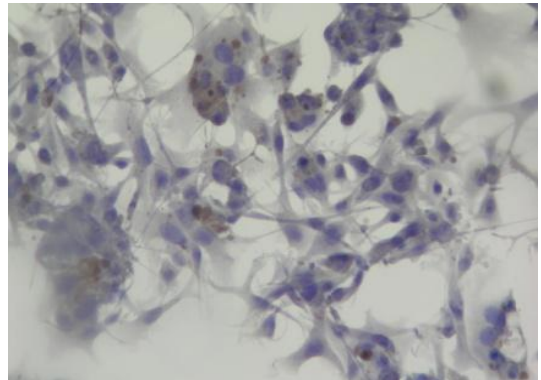
H. KİMKH Stro-1 x400



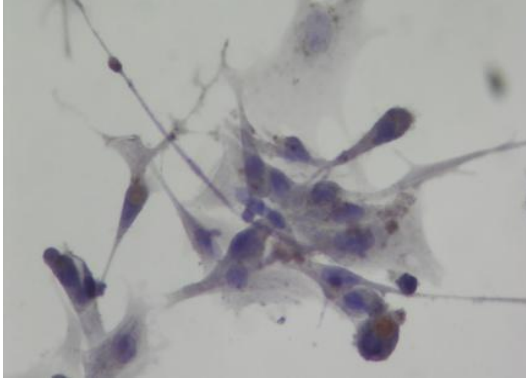
Resim 3.1.2 KİMKH'lerin Stro-1 antikor ile boyanmamış pozitif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı.



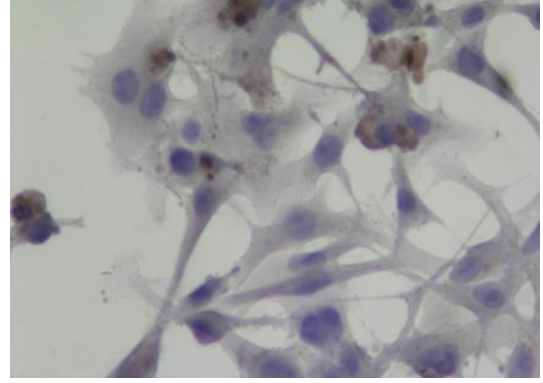
A. KİMKH CD90 x40



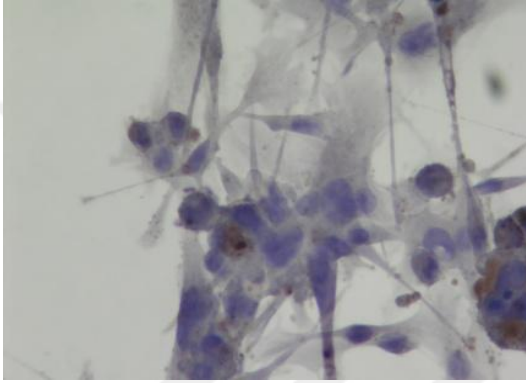
B. KİMKH CD90 x100



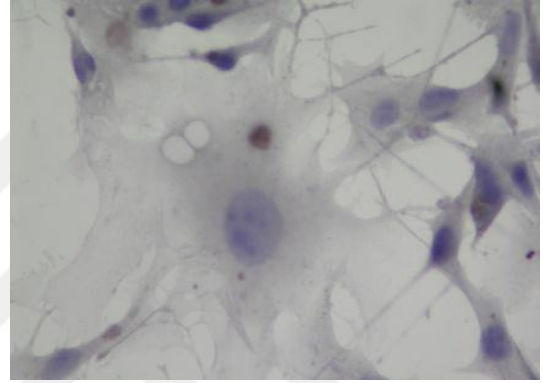
C. KMKH CD90 x400



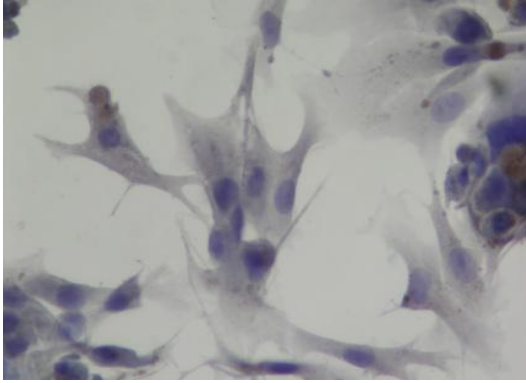
D. KMKH CD90 x400



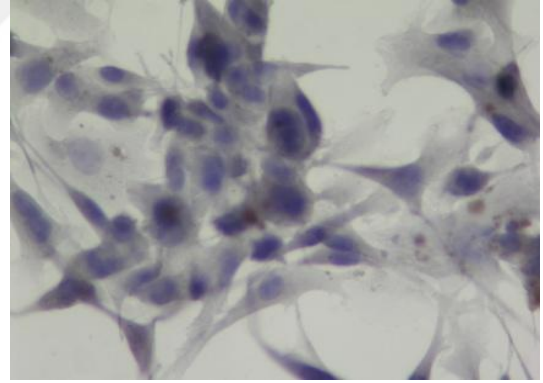
E. KMKH CD90 x400



F. KMKH CD90 x400



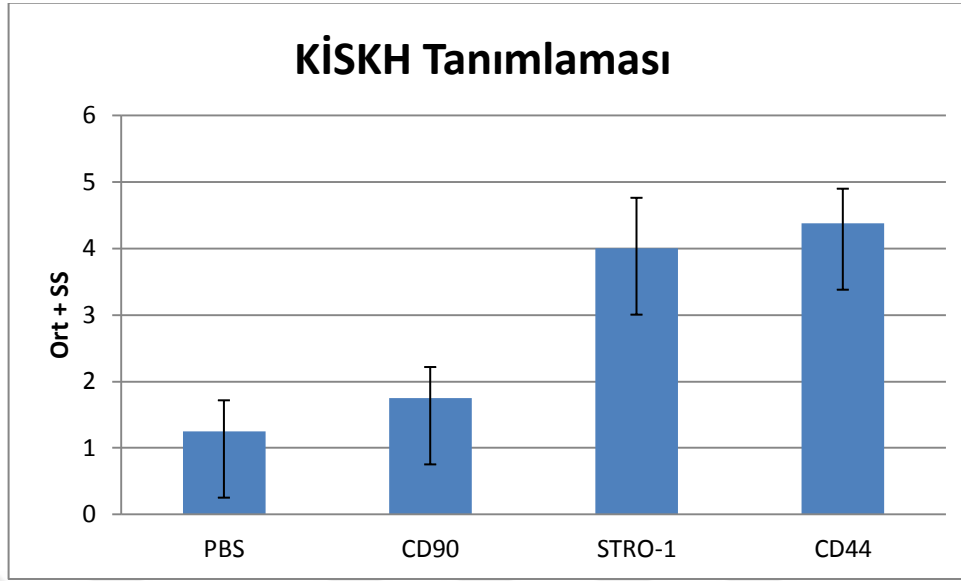
G. KMKH CD90 x400



H. KMKH CD90 x400

Resim 3.1.3 KMKH CD90 antikor ile boyanmamış negatif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı.

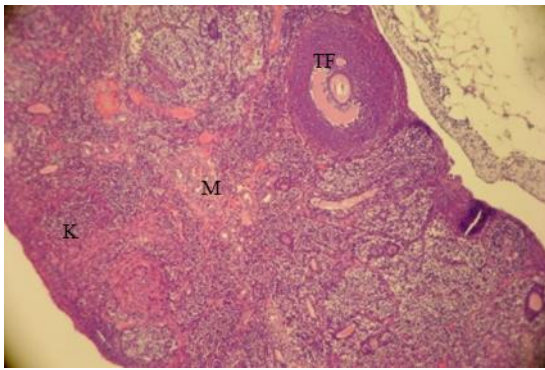
Hücrelerin boyanmaları üzerinden yapılan skollama ile büyük çoğunluğunun mezenkimal kök hücre oldukları işaretlenerek gösterildi (**Tablo 3.1.1**).



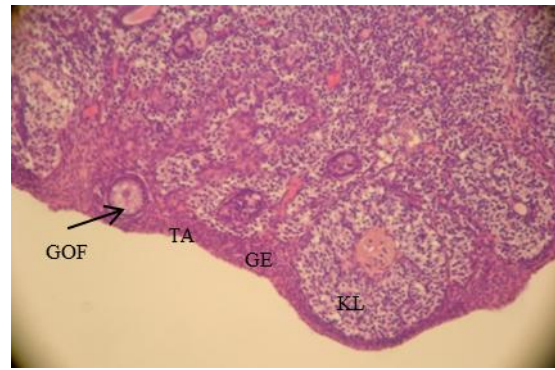
Tablo 3.1.1. KİMKH CD90, CD44 ve Stro-1 tanımlanmasının skora ile analizinde hücrelerimizin tanımlamaları doğrulandı.

3.2. Süperovulasyon Yapılmamış Ovaryumdaki Hücre Durumu

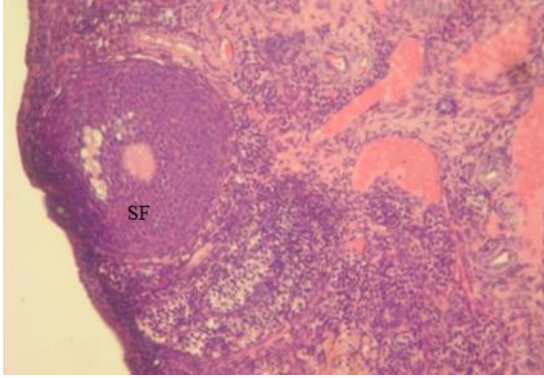
Herhangi bir süperovulasyon işlemi uygulanmadan alınan dişi sıçanlardan östrüs siklusunda olanlar sakrifiye edilerek alınan ovaryum dokularının bir tanesi oosit toplanması ve bu oositlerin maturasyonu açısından değerlendirildi. Diğeri rutin histokimya işlemi sonrasında kesitleri alınarak H-E ile boyandı ve oositlerin görüntüleri incelendi (Resim 3.2.1).



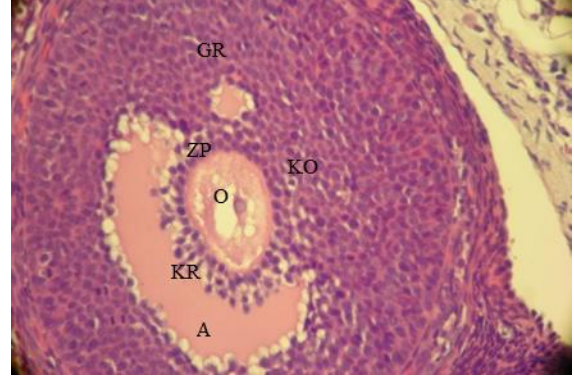
A. Over H-E Fotoğrafları x200



B. Over H-E Fotoğrafları x200



C. Over H-E Fotoğrafları x200

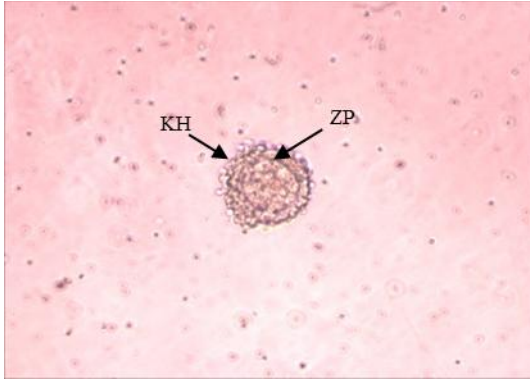


D. Over H-E Fotoğrafları x400

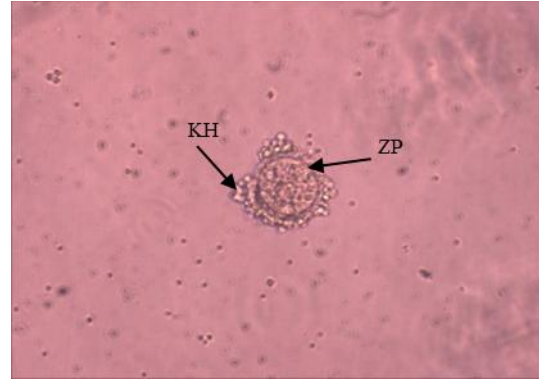
Resim 3.2.1 Östrus siklusunda olan sıçan ovaryum alınan kesitlerin görüntüleri. Kortekste yer alan gelişen folliküller ve antral follikül izlenmektedir. K: Korteks, M: Medulla, TA: Tunika Albuginea, GE: Germinal Epitel, GOF: Gelişmekte olan folliküller, A: Antrum, KL: Korpus luteum, O: Oosit, KR: Korona Radiyata, KO: Kumulus ooforus, ZP: Zona pellusida GR: Granuloza hücreleri, T: Teka hücreleri, K: Korteks, M: Medulla, SF: Sekonder Folikül, TF: Tersiyer Folikül; H-E

3.3. Oosit Eldesi ve Olgunlaşması

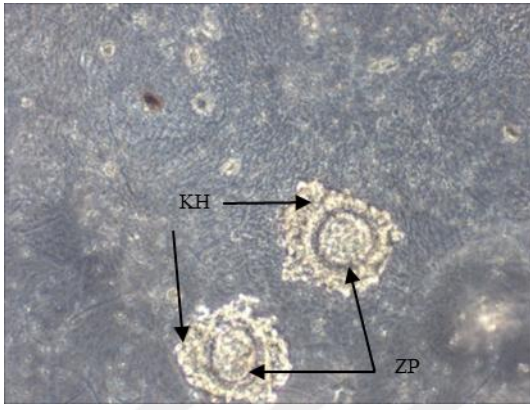
Oositler sıçan ovaryum ve tuba uterinalardan toplanarak etrafındaki kumulus hücreleri ile değerlendirildi. Östrüs bakıldıktan sonra östrüs siklusuna ait dişi sıçanlar eter yardımı ile anestezi edildikten sonra sakrifiye edilerek ovaryumları çıkartıldı. Çıkartılan ovaryumları 50 ml'lik tüp içerisindeki RPMI besiyerine konuldu ve hücre kültürü ortamında bu ovaryumlar PPT enjektörü yardımı ile laminar flow altında parçalanarak oositleri açığa çıkartıldı ve steril cam pasteur pipeti ile hücre kültürü dış ortamında oositler toplandı ve bir gece öncesinden inkübatörde gazladığımız İTSBY, SSBY, AMBY ve KİMKHBY içerisine eşit sayıda olacak şekilde oositler aktarıldı ve kültüre edildi. Toplanan oositler daha önceden hazırladığımız besiyerleri içerisine aynı evrede ve özellikteki 6 ile 10 arasında eşit sayıda olacak şekilde konuldu. Bu besiyerleri içerisindeki oositler 2 günde bir tekrardan steril cam pasteur pipeti ile toplanarak taze besiyeri içerisine alındı. Oositlerin gazlanmış besiyerlerinde 0, 3, 6 ve 9. günlerde morfolojik incelemeleri yapıldı (**Resim.3.3.1**)



A. Oosit AMBYx100



B. Oosit SSBY x100



C. Oosit İTSBY x100



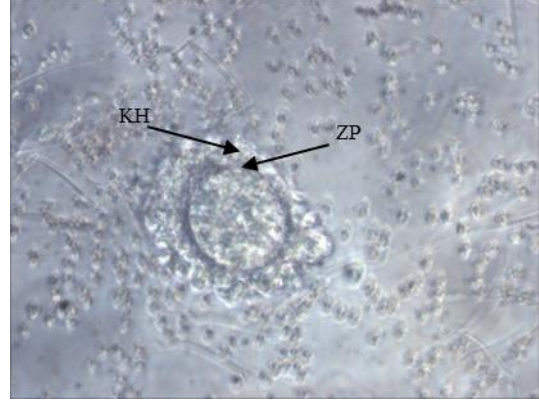
D. Oosit KİMKHBY x100

Resim 3.3.1 Oositlerin x100'lük büyütmedeki morfolojik görüntüleri. Birinci günün sonunda KİMKHBY'deki oositlerin etrafındaki kumulus hücrelerinin kültür kabına yapıştıkları gözlemlendi. KH: Kumulus Hücreleri, ZP: Zona Pellusida X100

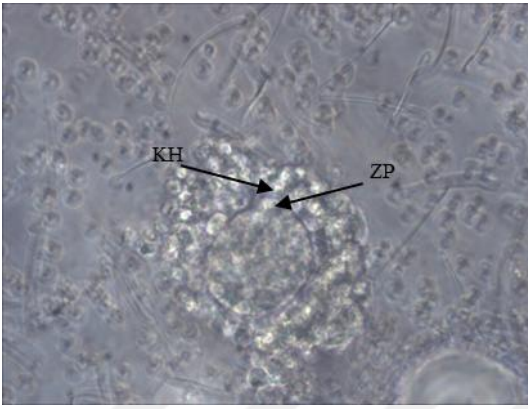
Alınan oositlerin BY uygulamalarından etkilenmeleri bakıldığında en iyi morfolojinin KİMKHBY uygulaması ile gerçekleştiği saptandı (**Resim 3.3.2**).



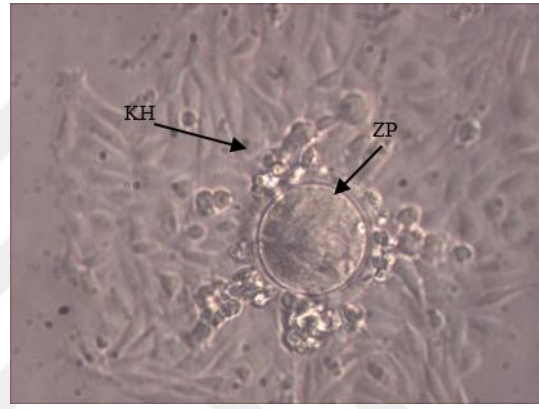
E. Oosit, AMBY x200



F. Oosit, SSBY x200



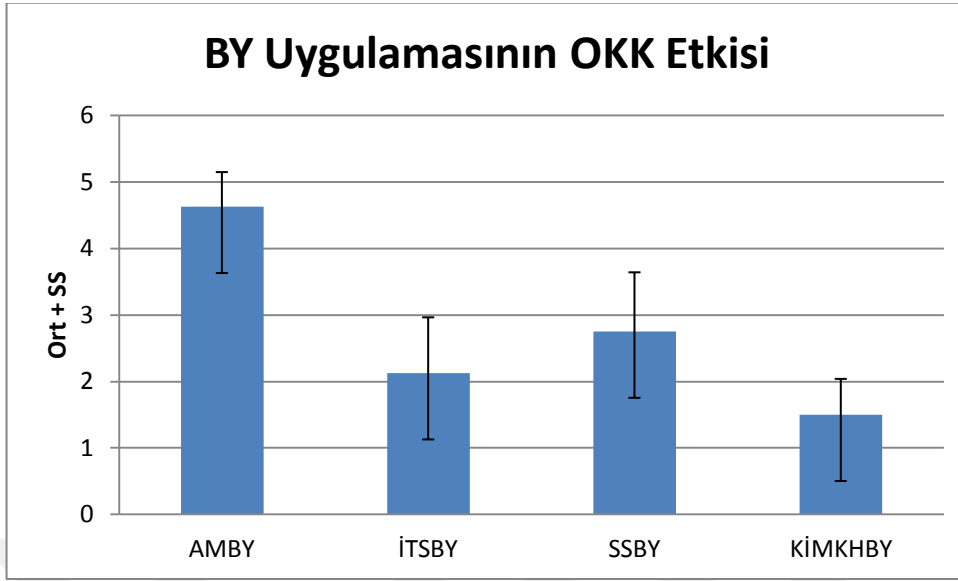
G. Oosit, İTSBY x200



H. Oosit, KİM KH x200

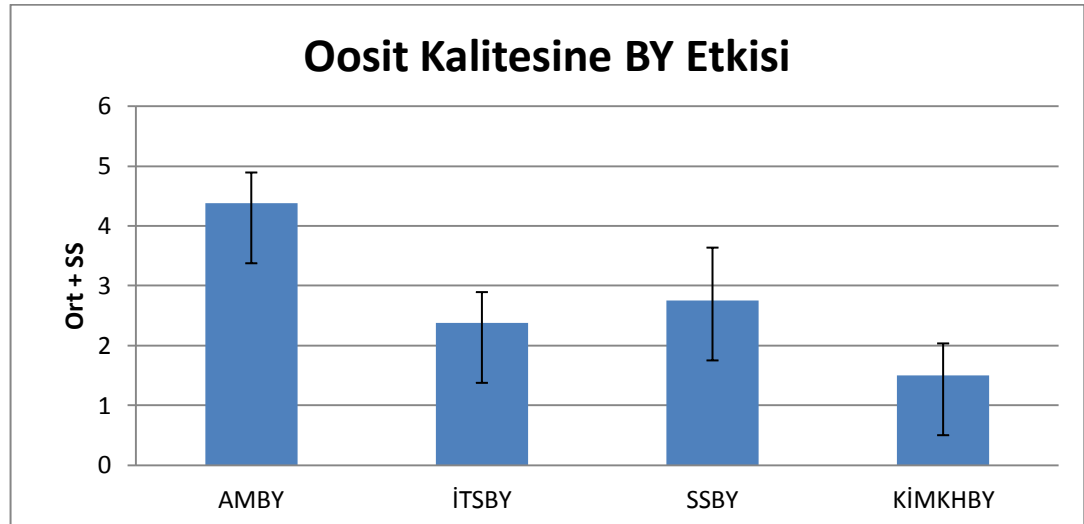
Resim 3.3.2 Oositlerin x200'lük büyütmedeki morfolojik görüntüleri. 1. günün sonunda KİM KHB Y'deki oositin sağlıklı ve matür bir halde gözlemlendi. KH: Kumulus Hücreleri, ZP: Zona Pellusida X200

Kullanılan besiyerlerine göre zaman içerisindeki bozulmaları +1 en iyi olan ile en kötü olan +5 arasında skorlanarak değerlendirildi. Süperovulasyon yapılmayan gruptan alınan hücrelerle yapılan deneylerde besiyeri olarak en iyi KİM KH ve en kötü AMBY olduğu saptandı (**Tablo 3.3.1**).



Tablo 3.3.1. BY uygulamasının OKK üzerine etkileri. Yapılan incelemede BY uygulamasının OKK üzerine anlamlı bir şekilde olumlu etki gösterdiği görüldü (+1 En az bozunma; +5 en çok bozunma).

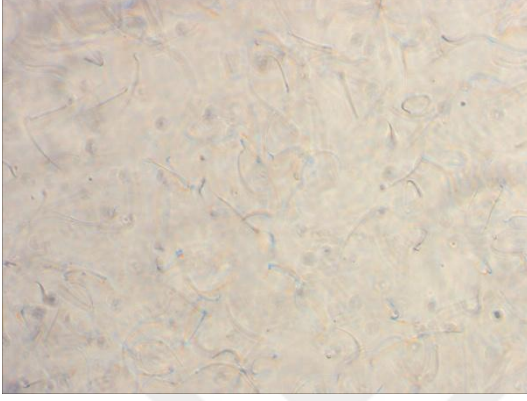
Oositlerin 3 ile 9 arasında zamana bağlı oluşan değişikliklerin incelenmesi ile bozunmaya karşı en koruyucu olan BY uygulamasının KİMKHBY olduğu görüldü (**Tablo 3.3.2**).



Tablo 3.3.2. AMBY, SSBY, İTSBY, KİMKHBY'lerine bırakılmış oositlerin üç ile dokuz gün arasındaki zaman içerisindeki besiyerlerindeki dejenerasyonlarının değerlendirilmesi (+1 En az bozunma; +5 en çok bozunma).

3.4. Sperm Eldesi ve Olgunlaşması

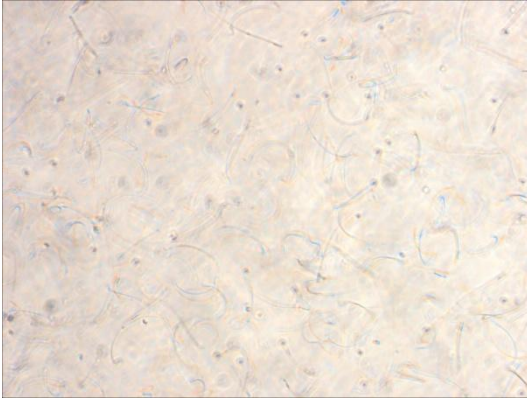
Spermier epididimin uç kısmının kesilmesinden sonra sıvazlanarak alındı ve Thoma lamı üzerinde sayımları yapıldı. Örneklerden elde edilen spermier $5 \times 10^6 \pm 4 \times 10^6$ sayısında olacak şekilde kültür kaplarına bırakıldı (**Resim 3.4.1**).



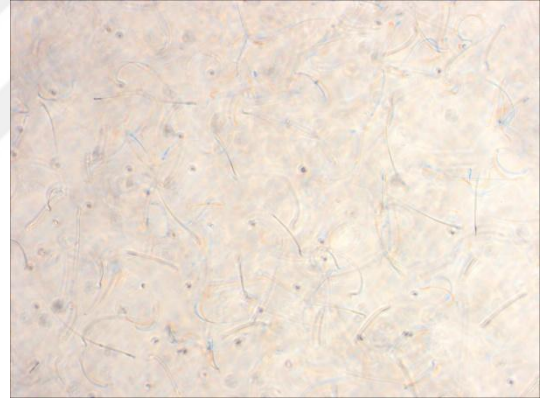
A. AMBY Sperm x100



B. SSBY Sperm x100



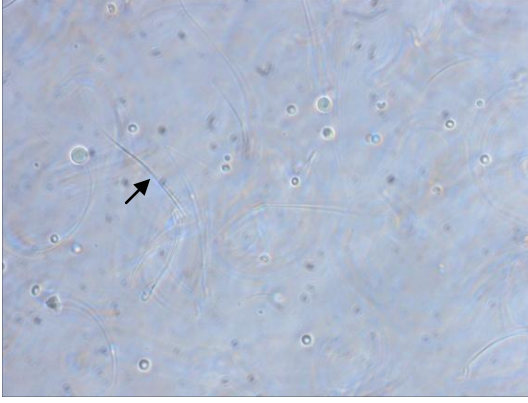
C. İTSBY Sperm x100



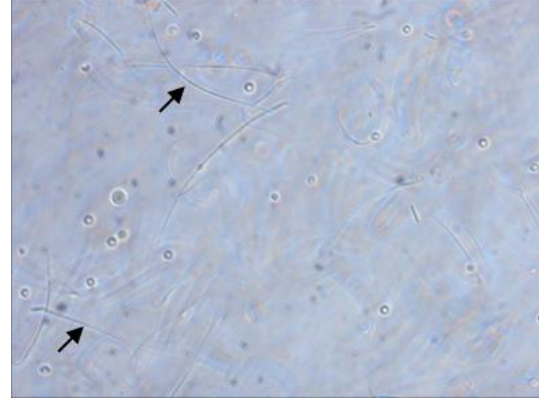
D. KİMKHBY Sperm x100

Resim 3.4.1 Spermierin x100'lük büyütmedeki morfolojik görüntüleri. AMBY'deki spermierde 30 dk sonra baş kısımlarından birbirlerine yapıştığı görüldü x100.

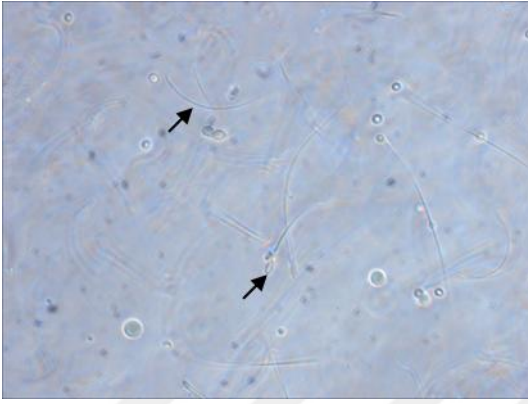
Alınan spermierin BY uygulamalarından etkilenmeleri bakıldığında en iyi morfolojinin KİMKHBY uygulaması ile gerçekleştiği saptandı (**Resim 3.4.2**).



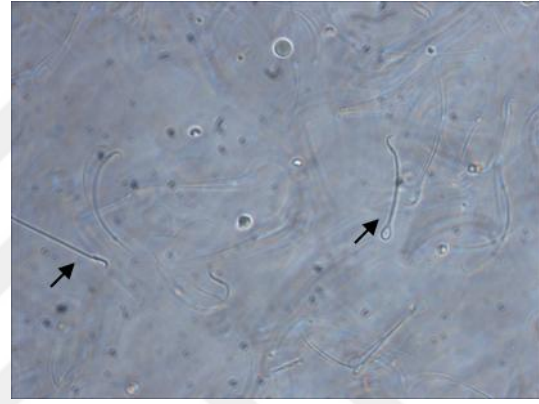
A. Sperm, AMBY x200



B. Sperm, SSBY x200



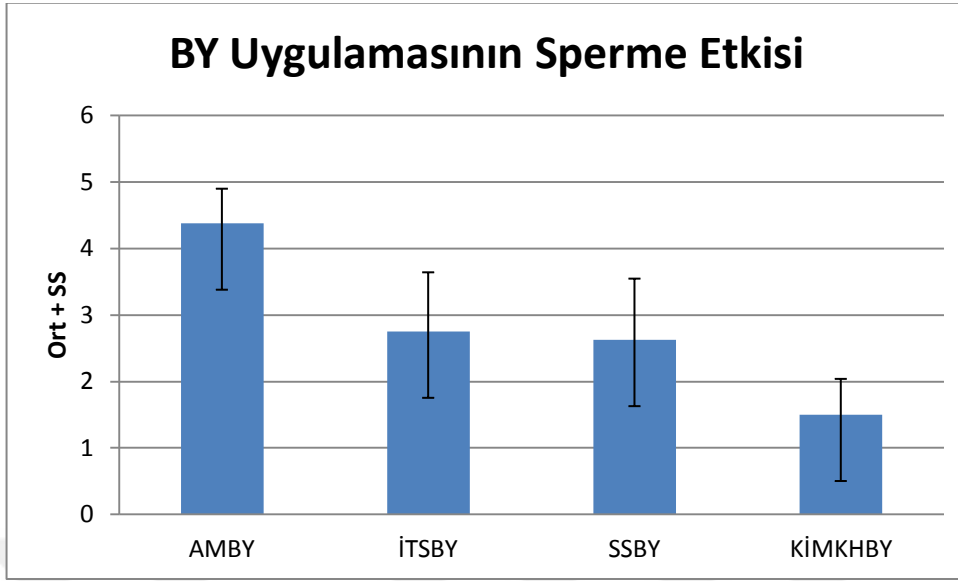
C. Sperm, İTSBY x200



D. Sperm, KİMKHBY x200

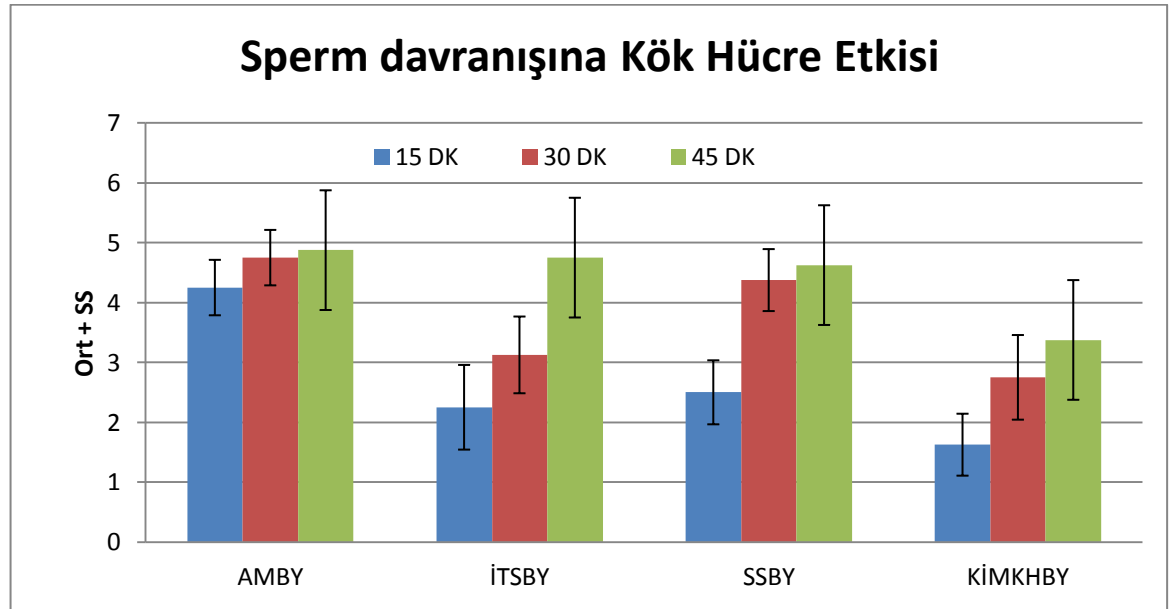
Resim 3.4.2 Spermilerin çeşitli besiyerlerindeki morfolojik görüntüleri. Spermier konulduktan yaklaşık 45 dk sonra KİMKHBY'deli spermilerin bir kısmının hareketlerine devam ettiği, diğer besiyerlerideki spermilerin hareket yeteneklerini kaybettiği görüldü. Besiyerlerindeki spermilerde 45 dk sonra morfolojik açıdan bir farklılık görülmedi (Okla gösterilen sperm örnekleridir.) x200

Kullanılan besiyerlerine göre zaman içerisindeki bozulmaları +1 en iyi olan ile en kötü olan +5 arasında skorlanarak değerlendirildi. Sperm üzerine BY etkisi olarak bakıldığında en iyi KİMKH ve en kötü AMBY olduğu saptandı (**Tablo 3.4.1**).



Tablo 3.4.1. BY uygulamasının sperm üzerine etkileri. BY uygulamasının sperm üzerine etkisi incelendiğinde KİMKHBY anlamlı bir şekilde olumlu etki gösterdiği en iyinin +1 ve en kötünün +5 olduğu skorlama ile görüldü.

Spermilerin zaman içerisindeki bozunmaları incelendiğinde en iyi korumanın yine KİMKHBY ile gerçekleştiği morfolojik olarak ayırt edilemediği için hareketleri baz alınarak yapılan skorlama ile en iyinin +1 ve en kötünün +5 olarak gösterildi (**Tablo 3.4.2**).



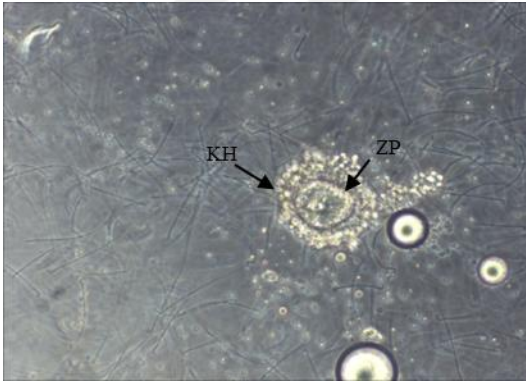
Tablo 3.4.2. AMBY, SSBY, İTSBY ve KİMKHBY ile muameleye bırakılan spermilerin BY içerisindeki dejenerasyonları değerlendirilmesi (+1: en az bozunma; +5: en çok bozunma olarak yapıldı).

3.5 Süperovulasyon Yapılmayan Sıçanlardan Alınan Oositlerin Kültür Ortamında Sperm İle Birlikteliğine Besiyeri Etkisi.

Sıçanların daha önceki oosit eldesine benzer şekilde işlemleri yapıldı. Östrüs bakıldıktan ovaryumları çıkartılarak 50 ml'lik falkon tüpler içerisindeki RPMIBY ile mauamele edildi. Hücre kültürü ortamında oositler toplandı ve bir gece öncesinden inkübatörde gazladığımız İTSBY, SSBY, AMBY ve KİMKBHY ne içerisine eşit sayıda olacak şekilde oositler aktarıldı ve üzerlerine eşit sayıda ortalama 1000 sperm thomada sayılarak kondu ve kültüre edildi. Oositlerin sperm ile birlikteliği için yapılan gözlemlerde, süperovulasyon yapılmayan gruptaki ovaryumlardan alınan oositler ile bırakılan spermilerin 12 saat boyunca gazlanmış İTSBY, SSBY, KİMKBHY ve AMBY içerisine konularak 0, 3, 6, 9 ve 11. günlerde inceleme yapıldı.(Resim 3.5.1).

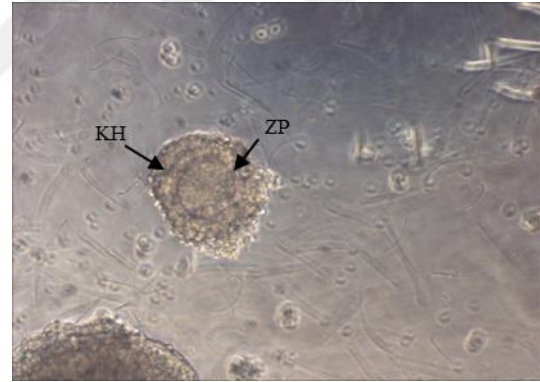
OOSİT YAŞAM SÜREÇLERİ

AMBY-G0- X 100



Oositin düzgün yuvarlak yapısı etrafında kumulus hücreleri görülmekte ve etrafındaki spermier izlendi.

SSBY-G0- X 100



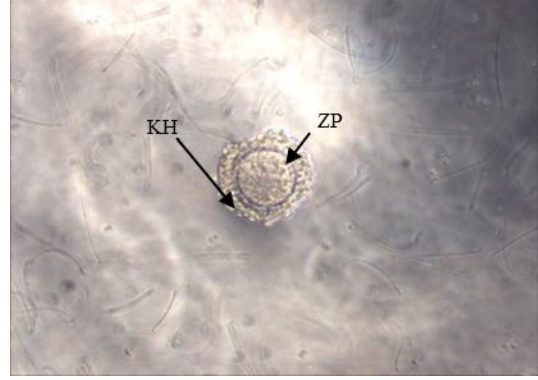
Oositin düzgün yuvarlak yapısı etrafında kumulus hücreleri görülmekte ve etrafındaki spermier izlendi.

İTSBY-G0- X 100



Oositin düzgün yuvarlak yapısı etrafında kumulus hücreleri görülmekte ve etrafındaki spermler izlendi

KİMKHBY-G0- X 100



Oositin düzgün yuvarlak yapısı etrafında kumulus hücreleri görülmekte ve etrafındaki spermler izlendi

Resim 3.5.1. Kültür ortamında oositlerin değişik BY etkisinde 100'lük mikroskopik büyütmedeki görüntüleri. Değişik kalitelerde oositler ve özellikle KİMKHBY grubunda daha hareketli spermler izlendi (ZP: Zona Pellusida, KH: Kumulus Hücreleri, SP: Sperm).

Süperovulasyon yapılmamış ovaryumlardan toplanan oositler İTSBY, SSBY, AMBY ve KİMKHBY içeren besiyerleri içerisine sperm örnekleri ile birlikte konulup inkübe edildikten sonra belli zaman aralıklarında BY etkisi açısından incelendi. Her 2 günde bir bu oositlerin bulunduğu besiyerleri değiştirildi. Üç gün sonra yapılan yapılan incelemede İTSBY ve SSBY besiyerileri içerisinde bulunan fertilize olmayan oositlerin Üçüncü günün sonunda dejenere olduğu gözlemlendi (**Resim 3.5.2** ve **Resim 3.5.3**). Bunun sebebini Profaz I halindeki olan oositlerin Metafaz II'ye geçememesi olduğu düşündürdü. AMBY içerisinde bulunan oositlerin Üçüncü günün sonunda yapılan incelemede sağlıklı ve matür bir halde olduğu gözlemlendi (**Resim3.5.2** ve **Resim 3.5.3**). Üçüncü günün sonunda yapılan incelemede KİMKHBY içerisinde bulunan oositlerden bir tanesinde fertilizasyonun gerçekleştiği gözlemlendi. Üçüncü günün sonunda bu embriyonun 2 hücreli aşamada olduğu gözlemlendi (**Resim 3.5.4**). Daha sonrasında bu embriyo ağız pipeti yardımı ile temiz bir KİMKHBY içerisine alındı ve günlük olarak takibi yapıldı. Ancak arreste giren hücrenin dejenere olduğu izlendi.

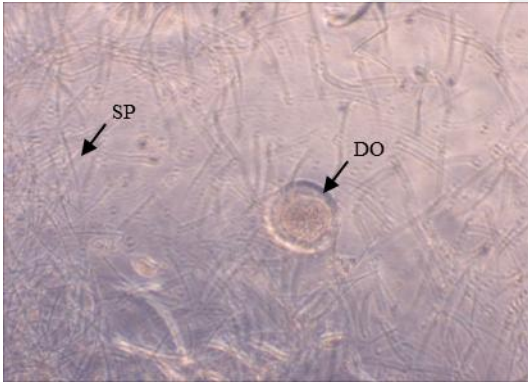
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G3- X 100



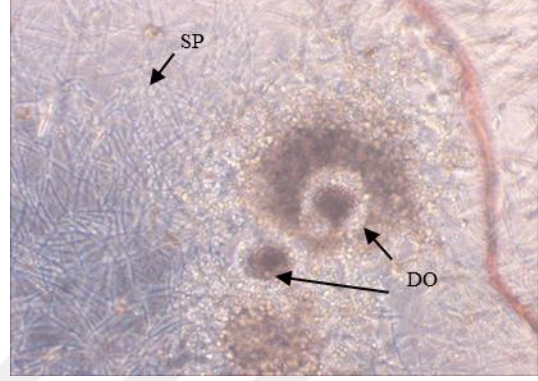
Oositin düzgün yuvarlak yapısı etrafında kumulus hücreleri görülmektedir

İTSBY-G3- X 100



Oositin dejenere olduğunu ve oosit iç ortamının karardığını görülmektedir.

SSBY-G3- X 100



Oositin dejenere olduğu ve etrafındaki kumulus hücrelerinin dağıldığı görülmektedir

KİMKHBY-G3- X 100



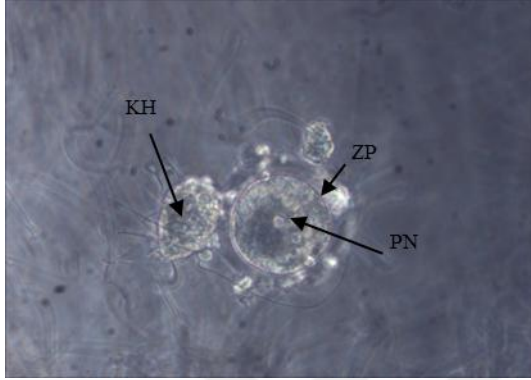
Döllenenmiş oositlerin profaz I 'den metafaz II 'ye geçtiği görülmektedir.

Resim 3.5.2. Üçüncü günde kültür ortamında oositlerin değişik by etkisinde 100'lük mikroskopik büyütmedeki görüntüleri. KİMKHBY uygulamasında oositin bir tanesinin dejenere olduğunu diğer oositin ise sağlıklı olduğu görülmektedir. Üçüncü günün sonunda SSBY ve İTSBY'deki oositler dejenere olmaya yakın olduğu gözlemlendi (DO: Dejenere Oosit, O: Oosit, SP: Sperm).

Üçüncü günün sonunda 2 hücreli aşamada olduğu gözlenen embriyonun büyük büyütmede (x200) yapılan gözlemlerinde morfolojik yapının detayları izlenebildi (**Resim 3.5.3**).

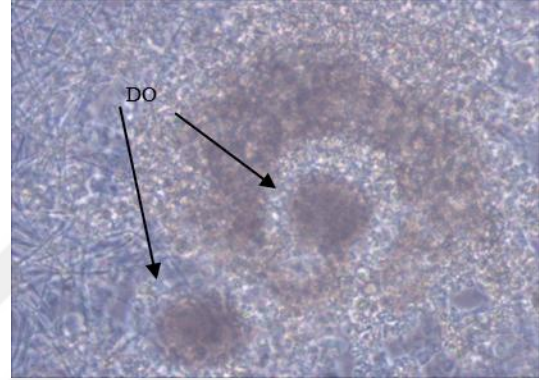
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G3- X 200



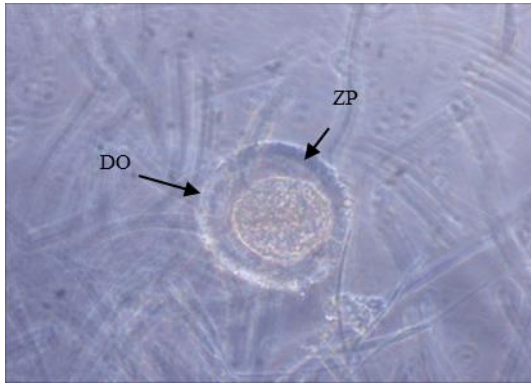
Bir oositin düzgün yuvarlak yapısı etrafında kumulus hücreleri görülmekte olup bu oositin PI aşamasında olduğu görüldü.

SSBY-G3- X 200



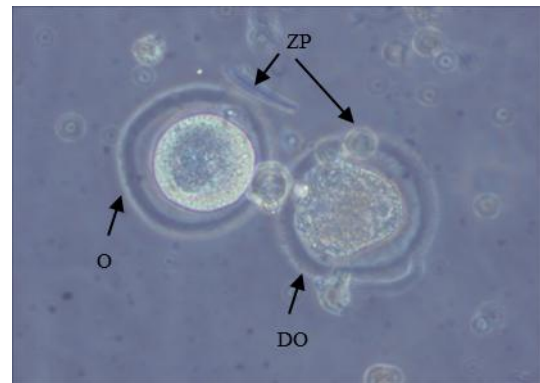
Oositin dejenere olduğunu ve etrafındaki kumulus hücrelerinin dağıldığı görülmektedir.

İTSBY-G3- X 200



Oositin dejenere olduğunu ve oosit iç ortamının karardığını görülmektedir.

KİMKHBY-G3- X 200



Fertilize olmamış oositin Profaz I aşamasından Metafaz II aşamaya geçtiği görülmektedir.

Resim 3.5.3. Kültür ortamında oositlerin değişik by etkisinde 200'lük mikroskopik büyütmedeki görüntüleri. KİMKHBY'de fertilize olmayan oositlerden birinin dejenerasyona yakın olduğunu, diğer oositin ise sağlıklı olduğunu görmekteyiz (PN:

Pronükleus, DO: Dejenere Oosit, KH: Kumulus Hücreleri, ZP: Zona Pellusida O: Oosit, SP: Sperm).

2 HÜCRELİ EMBRİYONUN ÇEŞİTLİ BÜYÜTMELERDEKİ GÖRÜNTÜLERİ

KİMKHBY-G3- X 100



Oositin 2 hücreli aşamada olduğu ve embriyo içerisindeki blastomerlerin sağlıklı oldukları görülmektedir

KİMKHBY-G3- X 200



Oositin 2 hücreli aşamada olduğu ve embriyo içerisindeki blastomerlerin sağlıklı oldukları görülmektedir

KİMKHBY-G3- X 400



Oositin 2 hücreli aşamada olduğu ve embriyo içerisindeki blastomerlerin sağlıklı oldukları görülmektedir

KİMKHBY-G3- X 400



Oositin 2 hücreli aşamada olduğu ve embriyo içerisindeki blastomerlerin sağlıklı oldukları görülmektedir

Resim 3.5.4. Kültür ortamında embriyonun x100'lük, x200'lük, x400'lük büyütmelelerdeki görüntüleri. İki hücreli embriyonun blastomerlerin detaylı görüntüleri

incelendiğinde sağlıklı yapıları ve morfolojileri izlendi (2E: 2 Hücreli Embriyo, ZP: Zona Pellusida, B: Blastomer).

Altıncı günün sonunda ise AMBY içerisinde bulunan oositlerin tümünün dejenere olduğu görüldü (**Resim 3.5.5**). Altıncı günün sonunda yapılan mikroskopik incelemede iki hücreli embriyonun KİMKHBY içerisinde sağlıklı olduğu fakat embriyo blastomerlerinin dejenere olmaya başladığı ve 4 hücreli aşamaya geçemediği görülmektedir (**Resim 3.5.6**).

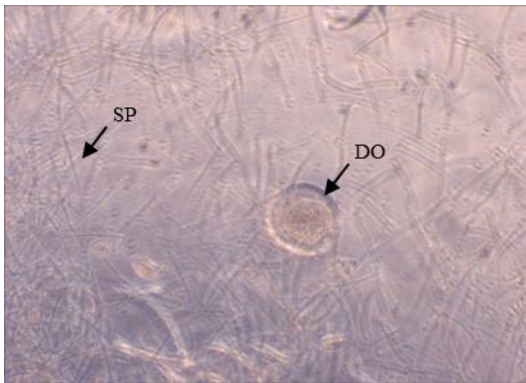
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G6- X 200



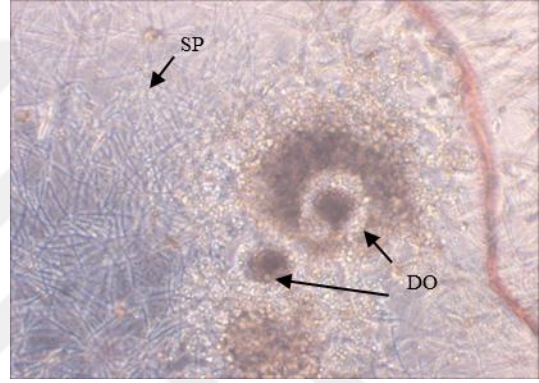
Oositin dejenere olduğunu ve oolemma'nın zona pellusida'dan ayrıldığı görülmektedir..

İTSBY-G6- X 100



İTSBY'de dejenere olan oositin dejenereasyonunun devam ettiği görülmektedir.

SSBY-G6- X 100



SSBY'deki dejenere oositin dejenereasyonunun devam ettiği ve kumulus hücrelerinin öldü.

KİMKHBY-G6- X 100



Oositin 2 hücreli aşamadan 3 hücreli aşamaya geçtiği görülmektedir. Fakat embriyo %20 dejenere dir.

Resim 3.5.5. Altıncı günde kültür ortamında oositlerin değişik by etkisinde 100'lük mikroskopik büyütmedeki görüntüleri. KİMKHBY'deki 2 hücreli embriyo'nun sağlıklı olduğunu fakat embriyonun blastomerlerinin %20'lik oranda fragmente olduğunu görmekteyiz (ZP: Zona Pellusida, DO:Dejenere Oosit, E:Embriyo).

ALTINCI GÜNDE İKİ HÜCRELİ EMBRİYONUN ÇEŞİTLİ BÜYÜTMELERDEKİ GÖRÜNTÜLERİ

KİMKHBY-G6- X 100



Embriyonun 2 hücreli aşamadan 3 hücreli aşamaya geçtiği görülmektedir. Fakat embriyo %20 fragmantasyon gözlenmektedir.

KİMKHBY-G6- X 200



Embriyonun 2 hücreli aşamadan 3 hücreli aşamaya geçtiği görülmektedir. Fakat embriyo %20 dejenere olduğu gözlenmektedir.

KİMKHBY-G6- X 200



Embriyonun 2 hücreli aşamadan 3 hücreli aşamaya geçtiği görülmektedir. Fakat embriyo %20 fragmantasyon gözlenmektedir.

KİMKHBY-G6- X 400



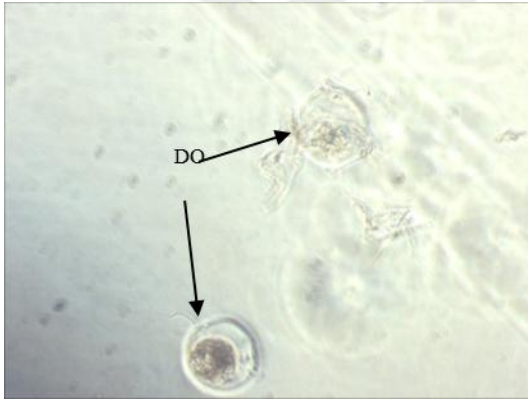
Embriyonun 2 hücreli aşamadan 3 hücreli aşamaya geçtiği görülmektedir. Fakat embriyo %20 fragmantasyon gözlenmektedir.

Resim 3.5.6. Altıncı günde KİMKBHY kültür ortamında embriyonun x100'lük, x200'lük, x400'lük büyütmelelerdeki görüntüleri. Altıncı günde embriyonun ayrıntılı olarak morfoloji ve kalitenin izlendi. KİMKBHY'deki embriyoun üç hücreli aşamada olduğu ve bu embriyonun blastomerlerinin dejenere olmaya başladığı gözlendi (3E: 3 Hücreli Embriyo, ZP:Zona Pellusida, B:Blastomer).

Dokuzuncu yapılan incelemede 2 hücreli embriyoda herhangi bölünme gözlenmemiştir. Bununla birlikte bu 2 hücreli embriyomuzun dejenere olduğunu gözlemledik. Ayrıca KİMKBHY'de bulunan oositlerimizin dejenere olduğunu gözlemledik (**Resim 3.5.7** ve **Resim 3.5.8**).

OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

KİMKBHY-G9- X 100



Oositin dejenere olduğunu ve blastomer'in karardığını ve bozunduğunu görmekteyiz

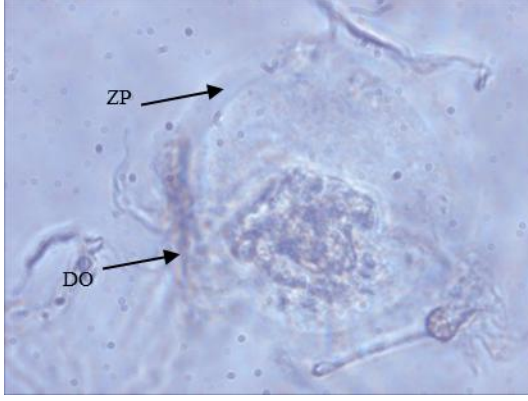
KİMKBHY-G9- X 400

KİMKBHY-G9- X 200



Oositin dejenere olduğunu ve etrafındaki kumulus hücrelerinin dağıldığı görülmektedir

KİMKBHY-G9- X 400



Oositin dejenere olduğunu ve oosit iç ortamının karardığını görülmektedir.



Oositin dejenere olduğunu ve oolemanın zona pellusidadan tamamen ayrıldığını görmekteyiz.

Resim 3.5.7. Dokuzuncu kültür ortamında oositlerin KİMKBHY etkisinde çeşitli mikroskopik büyütmedeki görüntüleri. KİMKBHY’de dokuzuncu günde oositin tamamen dejenere olduğunu gözlemledik (ZP: Zona Pelusida, DO: Dejenere Oosit).

DOKUZUNCU GÜNDE 2 HÜCRELİ EMBRİYONUN ÇEŞİTLİ BÜYÜTMELERDEKİ GÖRÜNTÜLERİ

KİMKBHY-G9- X 100

KİMKBHY-G9- X 200

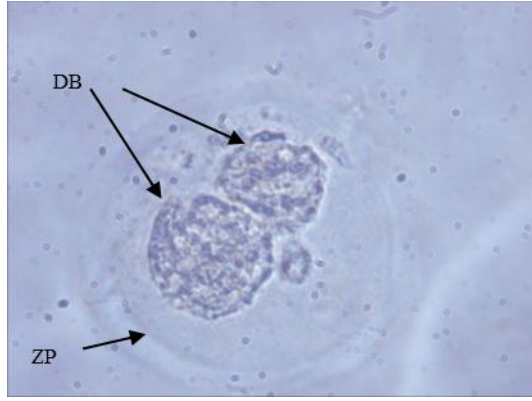


2 Hücreli embriyonun embriyonik gelişimi tamamlayamadığı ve dejenere olduğunu görmekteyiz



2 Hücreli embriyonun embriyonik gelişimi tamamlayamadığı ve dejenere olduğunu görmekteyiz

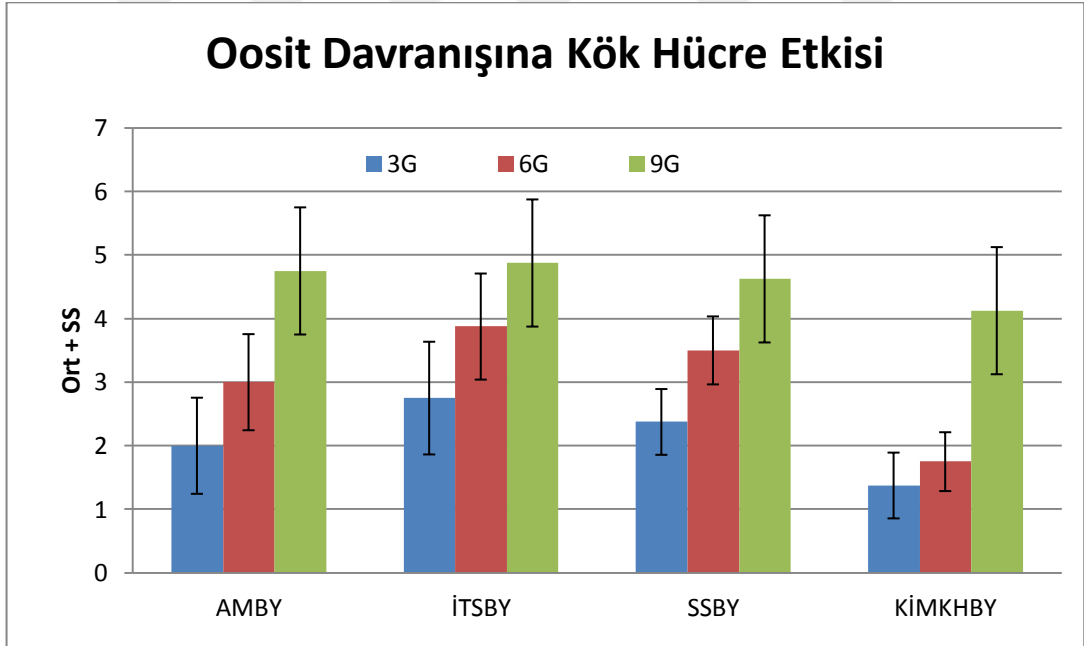
KİMKBHY-G9- X 400



2 Hücreli embriyonun embriyonik gelişimi tamamlayamadığı ve dejenere olduğunu görmekteyiz.

Resim 3.5.8. Dokuzuncu günde KİMKHBY kültür ortamında embriyonun x100'lük, x200'lük ve x400'lük büyütmelerdeki görüntüleri (DE: Dejenere Embriyo, ZP: Zona Pellusida, DB: Dejenere Blastomer).

Oositlerin sperm ile muamelesinin sonrasında fertilize olmaması durumunda 3 ile 9 arasında zamana bağlı oluşan değişikliklerin incelenmesi ile bozunmaya karşı en koruyucu olan BY uygulamasının KİMKHBY olduğu görüldü (**Tablo 3.5.2**).

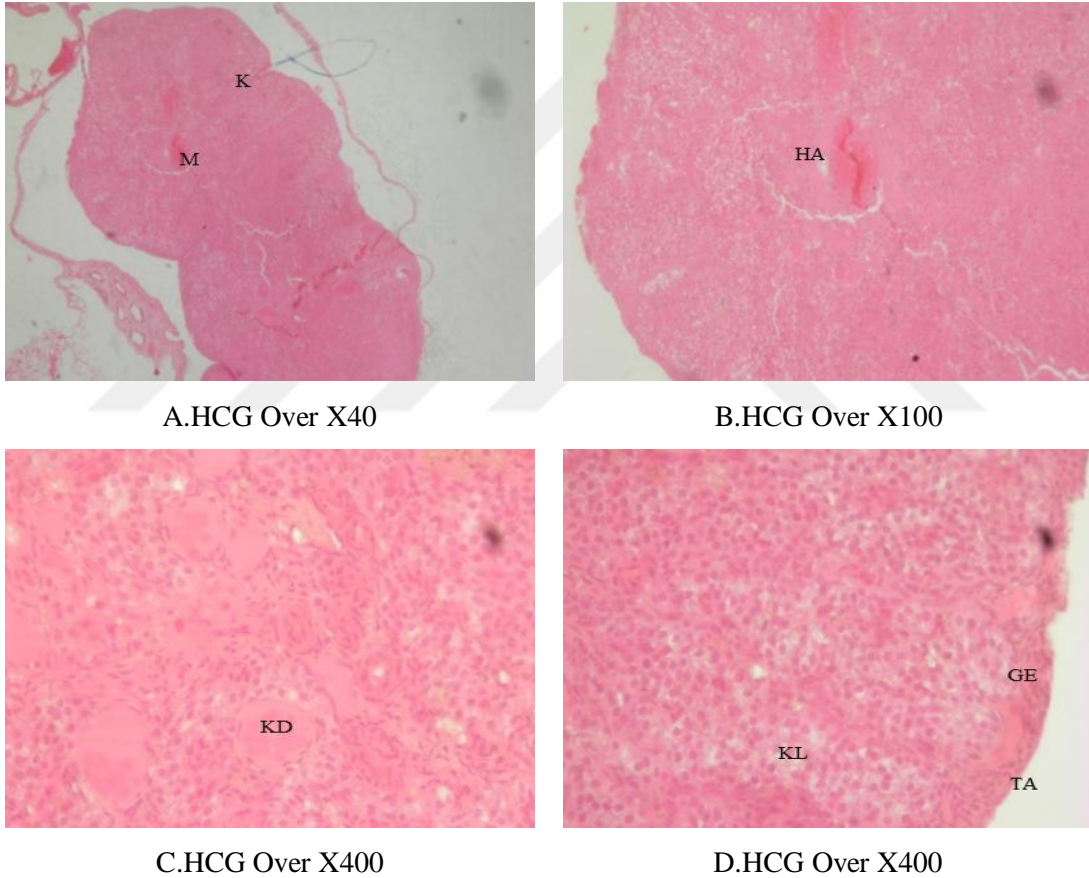


Tablo 3.5.2. Alfa-MEM Besiyeri (AMBY), Single Step Besiyeri (SSBY), İnsan Tubal SıvıBesiyeri (İTSBY), Kemik iliği Mezenkimal Kök Hücre Niş Besiyeri (KİMKHBY)'lerine bırakılmış oositlerin üç ile dokuz gün arasındaki zaman içerisindeki

besiyerlerindeki dejenerasyonlarının değerlendirilmesi (+1 En az Bozunma; +5 en çok bozunma).

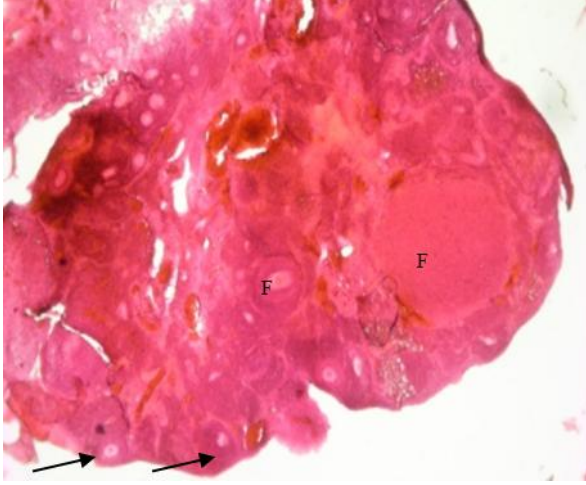
3.6. Süperovulasyon Grubu Ovaryumlarındaki Hücre Durumu

HCG uygulamalarının overde olan değişikliklerin yapılmayanlara göre folikül sayısının azaldığı ve ovaryum dokusu içerisinde hemoraji alanların arttığı gözlemlendi (**Resim 3.6.1**).

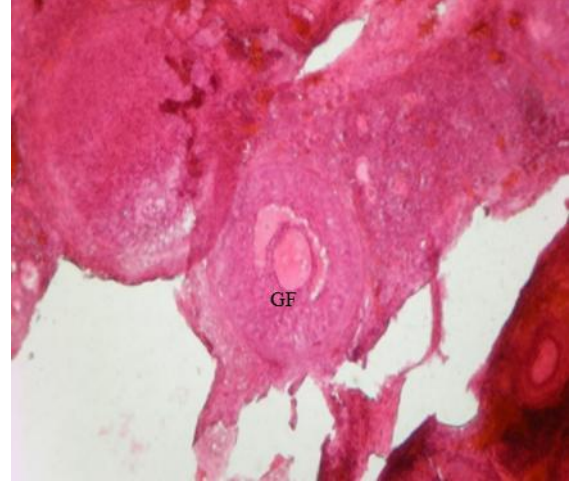


Resim 3.6.1. HCG verilmiş dişi sıçanların ovaryumlarından alınan 5µ'luk kesitlerin H-E boyalı görüntüleri (K: Korteks, M:Medulla, HA: Hemorajik Alan, KD: Kan Damarı, GE: Germinal Epitel, TA: Tunika Albuginea, KL: Korpus Luteum).

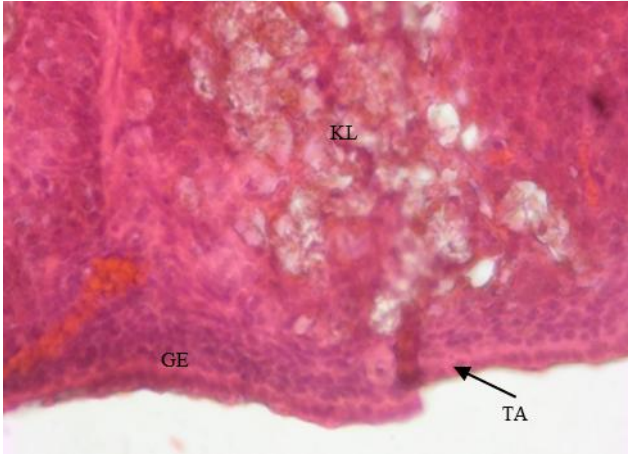
FSH + HCG uygulamaları ile SO+ örneklerde overde olan değişikliklerin yapılmayanlara göre ovaryumda folikül sayısının arttığı ve foliküllerinin çoğunun graff folikül olduğunu ve oositlerin ise büyük kısmının MII oosit olduğu saptandı (**Resim 3.5.2**).



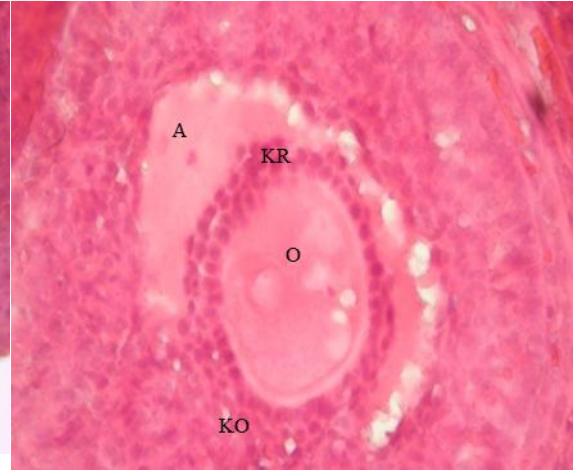
A. FSH+HCG Over X40



B. FSH+HCG Over X100



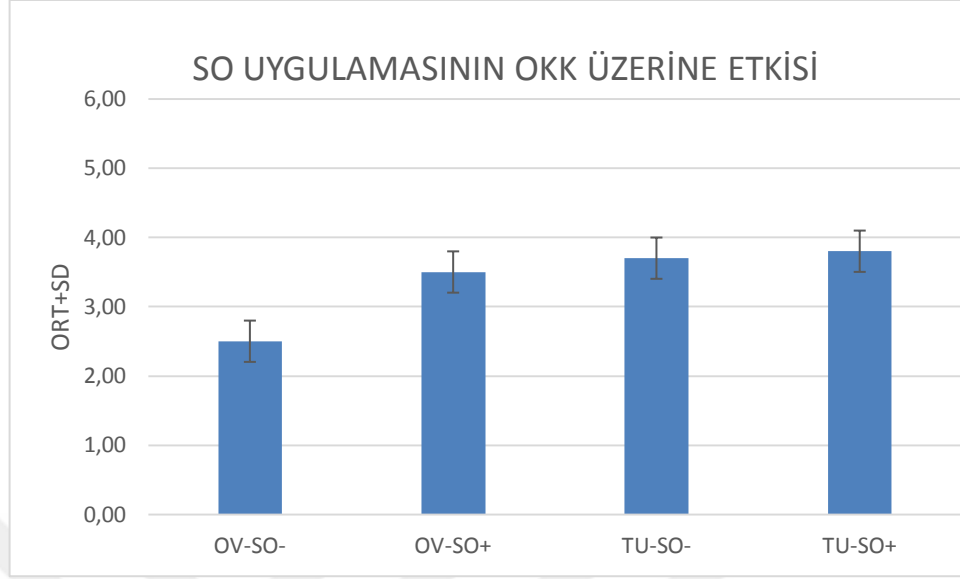
C. FSH+HCG Over X400



D. FSH+HCG Over X400

Resim 3.6.2. FSH ve HCG verilmiş dişi sıçanların ovaryumlarından alınan H-E boyalı görüntüleri. FAS ve HCG uygulanmış ovaryumlarda folikül sayılarının arttığı ve ovaryumda kanlanmanın meydana geldiği gözlemlendi (F: Folikül, Okla gösterinlerle primordiyal foliküller, GF: Graaf Folikül, KL:Korpus Luteum, O:Oosit, TA:Tunica Albuginea, GE:Germinal Epitel, KR:Korona Radiata, KO: Kumulus Ooforus, A:Antrum)

Süperovulasyon grubuna ait olan dişi sıçanların östrüs siklusunda olanlarına FSH ve HCG uygulamasından sonra alınan iki ovaryumdan bir tanesi oosit toplanması ve bu oositlerin maturasyonu açısından deneylerin yapılmasında kullanıldı. Diğer ovaryum ise OKK (**Tablo 3.6.1**) ve folikül sayısı açısından değerlendirildi. OKK için en uygun örnekleme Tubadan alınan SO+ grupta olduğu görüldü. Folikül sayısının SO+ örneklerde anlamlı bir şekilde arttığı izlendi.



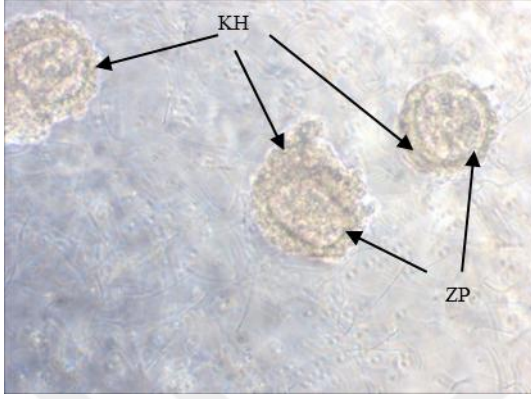
Tablo 3.6.1. Süperovulasyon uygulamasının OKK üzerine etkisini. Ovaryum (OV) ve Tuba Uterina (TU) örneklerinde süperovulasyon (SO) olup olmadığına göre alınan sonuçlarında TU-SO+ örneklerinde olduğu gözlemlendi.

3.7. Süperovulasyon Grubuna Ait Oosit ve Sperm Eldesi ve Tanımlanması

SO sonrası toplanan oositlerin bir gece boyunca inkübatörde gazladığımız İTSBY, SSBY, AMBY ve KİMKHBY uygulamalarına alınarak kültüre edildi ve sperm ile muamemele edildi . Sperm verildikten sonra oosit ve spermilerin mikroskop altında fotoğrafları çekildi ve hem küçük (**Resim 3.7.2**) hem de büyük büyütmede (**Resim 3.7.1**) görüntüleri alındı.

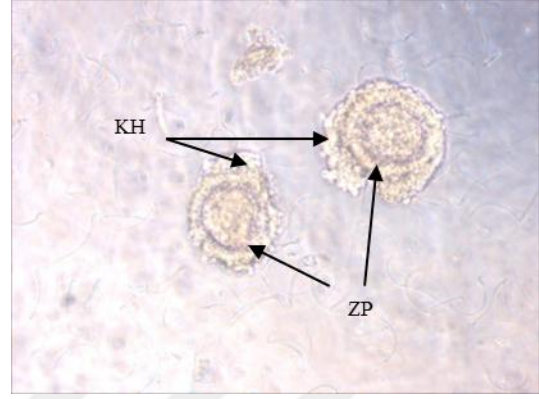
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G0- X 100



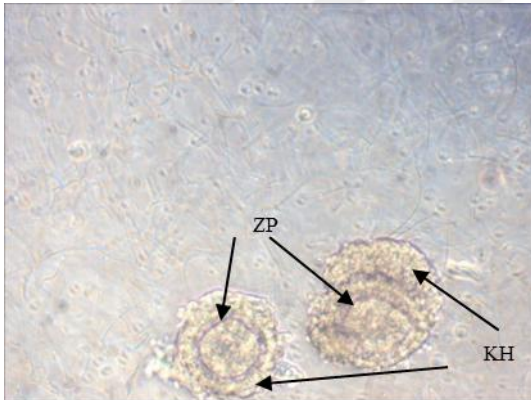
Oositin sağlıklı bir şekilde besiyerinden bulunmaktadır. Morfolojik açıdan besiyerleri arasında herhangi bir fark gözlenmedi

SSBY-G0- X 100



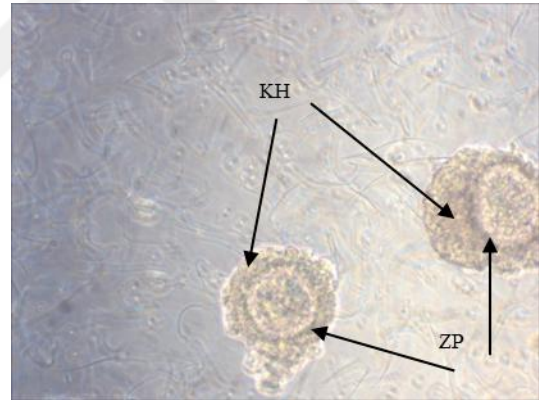
Oositin sağlıklı bir şekilde besiyerinden bulunmaktadır. Morfolojik açıdan besiyerleri arasında herhangi bir fark gözlenmedi

İTSBY-G0- X 100



Oositin sağlıklı bir şekilde besiyerinden bulunmaktadır. Morfolojik açıdan besiyerleri arasında herhangi bir fark gözlenmedi

KİMKHBY-G0-X 100

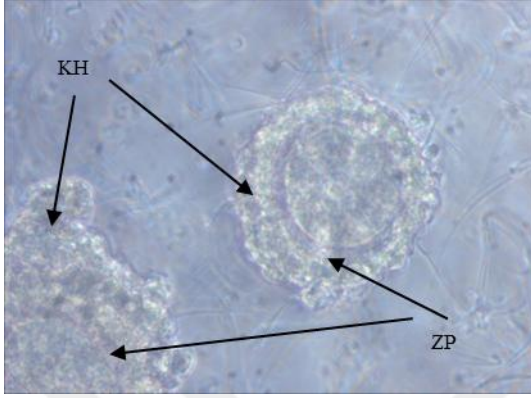


Oositin sağlıklı bir şekilde besiyerinden bulunmaktadır. Morfolojik açıdan besiyerleri arasında herhangi bir fark gözlenmedi

Resim 3.7.1. SO+ ovaryumdan toplanan oositlerin sıfırıncı günde kültür ortamında x100'lük büyütmedeki görüntüleri. Sıfırıncı günde 4 farklı besiyerine konulan oosit ve spermelerde morfolojik açıdan fark gözlenmedi (KH:Kumulus Hücreleri, ZP:Zona Pellusida) .

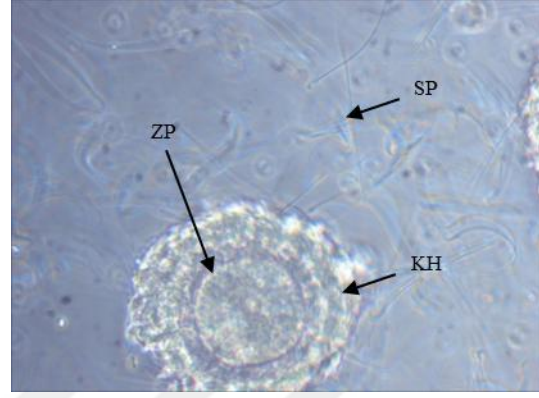
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G0- X 200



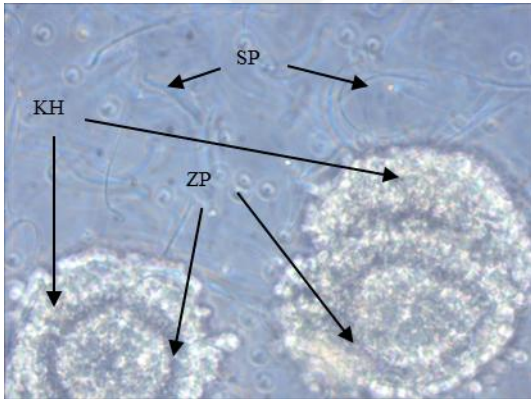
Oositin sağlıklı bir şekilde besiyerinden bulunmaktadır.

SSBY-G0- X 200



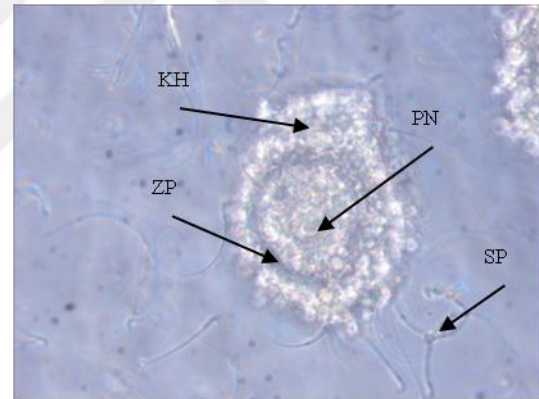
Oositin sağlıklı bir şekilde besiyerinden bulunmaktadır.

İTSBY-G0- X 200



Oositin sağlıklı bir şekilde besiyerinden bulunmaktadır.

KİMKHBY -G0- X 200



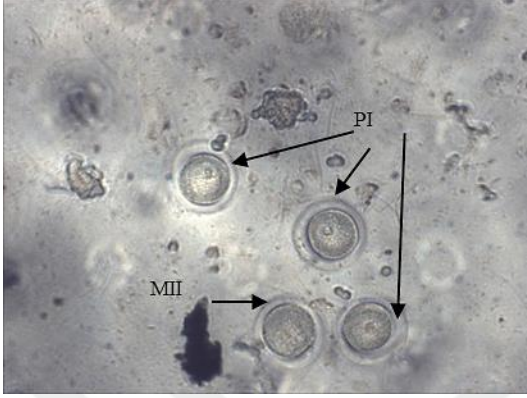
Oositin sağlıklı bir şekilde besiyerinden bulunmaktadır.

Resim 3.7.2. SO+ ovaryumdan toplanan oositlerin sıfıncı günde kültür ortamında x200'lük büyütmedeki görüntüleri. Sıfıncı günde sperm ve oositlerin morfoloji herhangi bir değişiklik gözlenmedi (KH: Kumulus Hücreleri, ZP: Zona Pellusida, SP: Sperm, PN: Pronükleus) .

3 gün sonra yapılan incelemede KİMKHBY içerisine konulan Profaz 1 oositlerin Metafaz II 'ye olgunlaştığı görüldü (**Resim 3.7.3**).

OOSİT GÖRÜNTÜLERİ

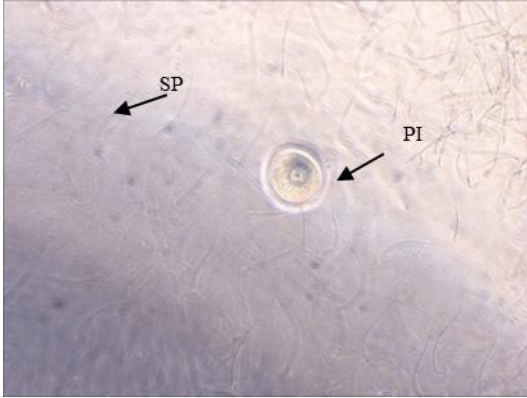
AMBY-G3- X100



SSBY-G3- X100



İTSBY-G3- X100



KİMKHBY -G3-X100



Resim 3.7.3. Kültür ortamında fertilize olmamış oositlerin x100'lük büyütmedeki görüntüleri. Üçüncü günün sonunda yapılan incelemede AMBY'deki oositlerin olgunlaşmadığını ve PI aşamasında kaldığı gözlemlendi. KİMKHBY'de bulunan PI oositlerin MII aşamasına geçtiği görüldü (PI: Profaz I Oosit, MII: Metafaz II Oosit).

AMBY'deki oositleride fertilizasyon gözlenmedi (**Resim 3.7.4**).

OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G3- X100



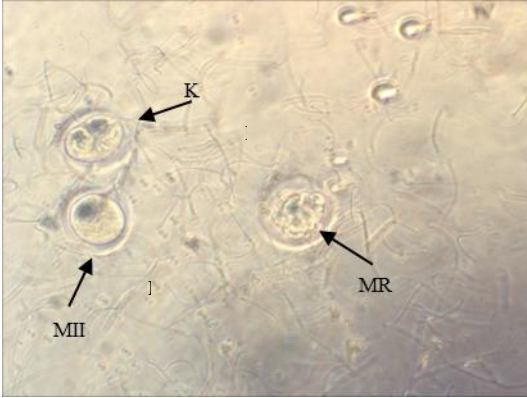
Alfa-MEM Besiyeri içerisinde fertilize olmamış Metafaz I oosit sağlıklı bir şekilde görmekteyiz

SSBY-G3- X100



Oositin 3. Günün sonunda fertilize olduğunu ve 4 hücreli aşamaya geçtiğini görmekteyiz.

İTSBY-G3- X100



Oositin fertilize olduğunu ve bir oositin morula aşasında ve diğer oositin ise klivajda olduğunu görmekteyiz .

KİMKHBY –G3-X100



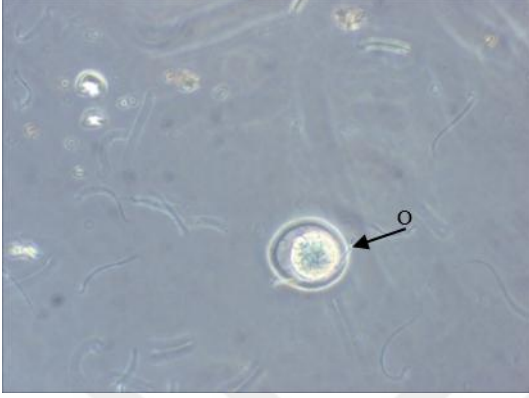
Oositin fertilize olduğunu ve 3 hücreli aşamaya doğru geçmekte olduğunu görmekteyiz

Resim 3.7.4. Üçüncü günde kültür ortamında oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri. AMBY'deki oositlerde fertilizasyon gözlenmedi. Üçüncü günün sonunda KİMKHBY'deki bir oositin fertilize olduğu ve 4 hücreli aşamada olduğu gösterildi. İTSBY'deki bir oosit ise üçüncü günde morula safhasında olduğu görüldü (4E: 4 Hücreli Embriyo, 3E: 3 Hücreli Embriyo, SP: Sperm, MII: Metafaz II Oosit, O: oosit, MR: Morula, K: Klivajdaki Embriyo) .

KİMKHBY, SSBY ve HTF besiyerindeki oositlerin fertilize olduğu görüldü (**Resim 3.7.4** ve **Resim 3.7.5**).

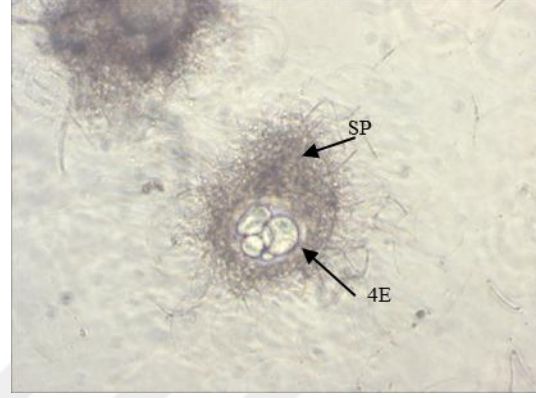
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G3- X100



Alfa-MEM Besiyeri içerisinde bulunan Metafaz I oosit sağlıklı bir şekilde görmekteyiz

SSBY-G3- X100



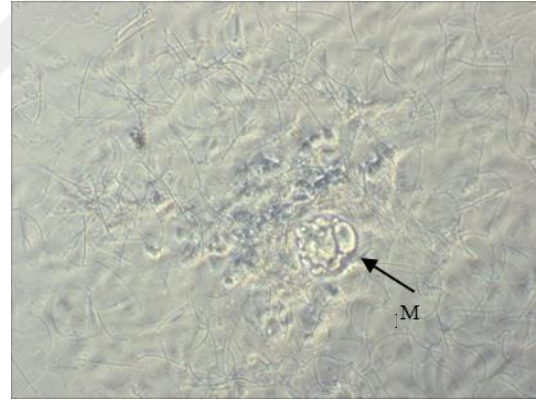
Oositin 3. Günün sonunda fertilize olduğunu ve 4 hücreli aşamaya geçtiğini görmekteyiz.

İTSBY-G3- X100



Oositin fertilize olduğunu ve bir oositin “compaction” aşamasında olduğunu görmekteyiz.

KİMKHBY –G3-X100



Oositin fertilize olduğunu ve “morula” aşamasında olduğunu görmekteyiz

Resim 3.7.5. Üçüncü günde kültür ortamında çeşitli oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri. Üçüncü günün sonunda İTSBY'de bir oositin fertilize olduğu ve compaction aşamasına geçtiği görüldü. KİMKHBY'deki bir oositin fertilize olduğu ve embriyonun morula aşamasına geçtiği görüldü (4E: 4 Hücreli Embriyo, O: oosit, MR: Morula, C: Compaction aşamasındaki embriyo) .

Süperovulasyon yapılan hayvanlardan toplanan 96 oosit her bir besiyerine eşit olacak şekilde dağıtıldı ve sonuç olarak 3. Günün sonunda yapılan incelemede 39 oositin fertilize olduğu gözlemlendi. Bu fertilize oositlerin bir kısmı **Resim 3.7.6** ile gösterildi. Fertilize olmayan oositler ise **Resim 3.7.3** ile gösterildi.

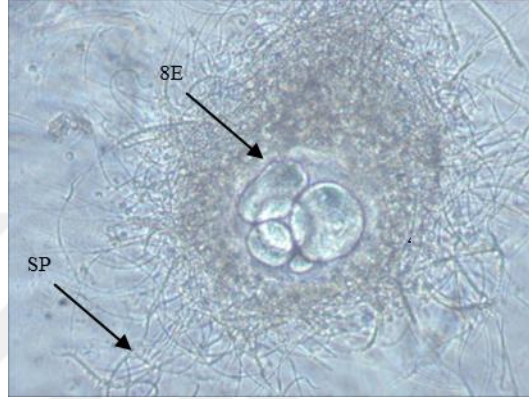
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G3- X200



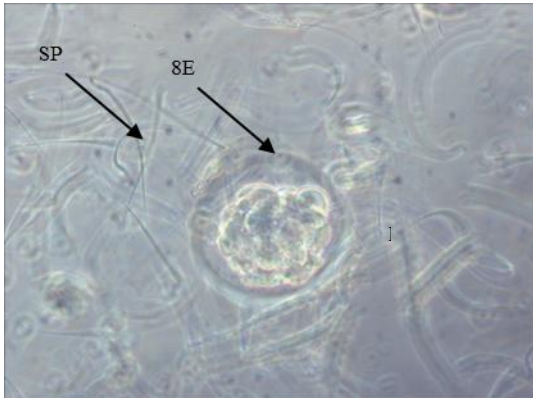
Alfa-MEM Besiyeri içerisinde bulunan Metafaz I oosit sağlıklı bir şekilde görülmektedir.

SSBY-G3- X200



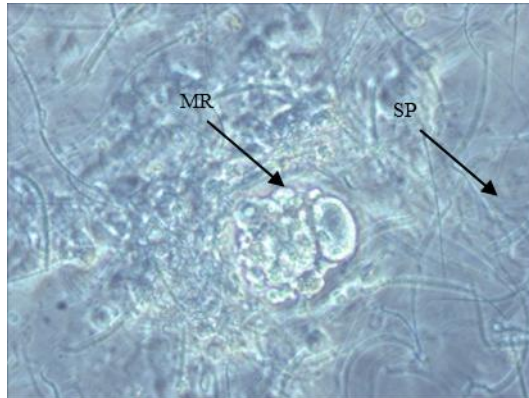
Oositin 3. Günün sonunda fertilize olduğunu ve 8 hücreli aşamaya geçtiğini görülmektedir.

İTSBY-G3- X200



Oositin fertilize olduğunu ve bir oositin morula aşamasında ve diğer oositin ise klivajda olduğunu görülmektedir.

KİMKHBY -G3-X200



Oositin fertilize olduğunu ve “morula” aşamasında olduğunu görülmektedir. Fakat embriyoda %40 fragmente olduğunu görülmektedir..

Resim 3.7.6. Üçüncü günde kültür ortamında oosit ve embriyoların x200'lük büyütmedeki görüntüleri. KİMKHBY'de morula aşamasındaki embriyonun %40 oranında

fragmante olduğunu görüldü. İTSBY’de morula aşamasındaki embriyonun ise sağlıklı olduğu görüldü (4E: 4 Hücreli Embriyo, O: oosit, MR: Morula).

BY etkisinin fertilizasyon oranına katkısı **Tablo 3.7.1 ile** gösterildi.

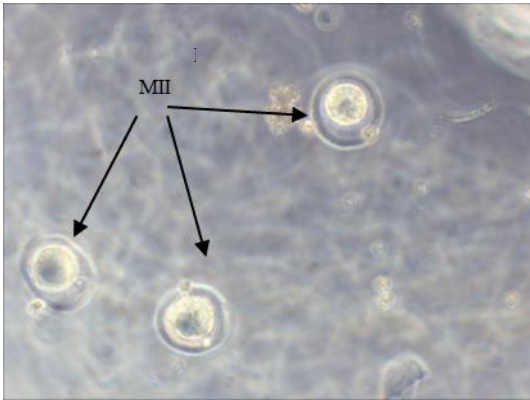
Tablo 3.7.1	İTSBY	SSBY	AMBY	KİMKHBY
Besiyerlerindeki Oosit Miktarı	24	24	24	24
Fertilize Oosit Sayısı	13	12	0	14
Dejenere Oosit Sayısı	6	7	12	6
Sağlıklı Profaz I Oosit	3	2	4	1
Sağlıklı Metafaz II Oosit	3	4	9	4

Tablo 3.7.1. Süperovulasyon Yapılmış Dişi Sıçanlardan Toplanan Oositlerin Fertilizasyon Oranı, Profaz I Ve Metafaz II Oosit Miktarları Ve Dejenere Oosit Miktarları.

Altıncı günün sonunda yapılan incelemede İTSBY’deki oosti ve embriyoların sağlıklı olduğu gözlemlendi. İTSBY’deki oositlerin %20’lik kısmında dejenerasyon gözlemlendi (**Resim 3.7.7**).

OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

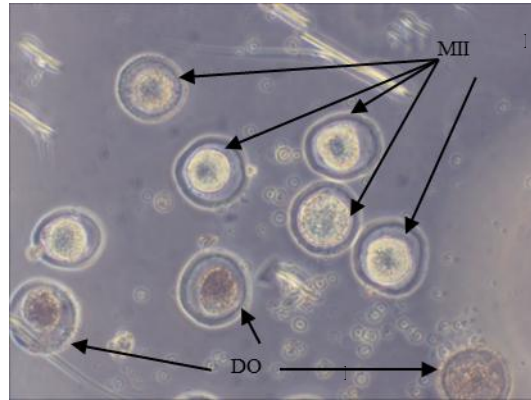
AMBY-G6- X100



Alfa-MEM Besiyeri içerisinde bulunan Metafaz I oosit sağlıklı bir şekilde görülmektedir

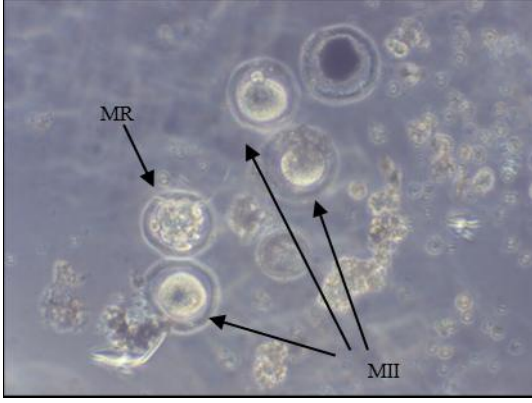
İTSBY-G6- X100

SSBY-G6- X100

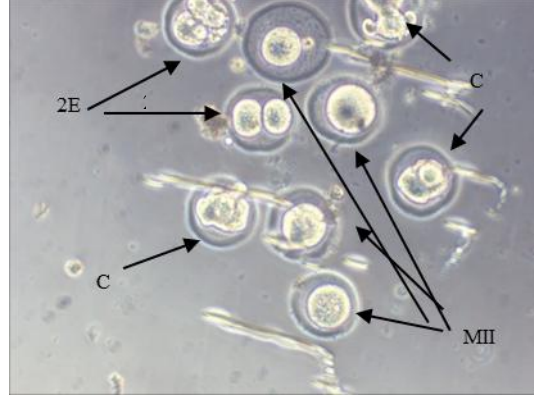


6. Günde bulunan oositlerin bir kısmının dejenere olduğunu görmekteyiz.

KİMKHBY –G6-X100



Morula aşamasındaki embriyonun sağlıklı olduğu görülmektedir. Oositlerin %80'i sağlıklı olarak gözlenmiştir.



Altıncı günün sonunda embriyoların ve oositlerin sağlıklı olduğu görülmektedir.

Resim 3.7.7. Altıncı günde kültür ortamında oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri. Altıncı günde AMBY içerisindeki oositlerin sağlıklı olduğu görüldü. KİMKBHY'de 2 oositin dejenere olduğu ve diğer oositlerin sağlıklı olduğu görülürken, İTSBY'nde 4 dejenere , SSBY'de ise 3 dejenere oosit görüldü (2E: 2 hücreli embriyo, MR: Morula, MII: Metafaz II, DO: Dejenere Oosit, C: Compaction).

Aynı zamanda oositlerin %20'sinin dejenere olduğu gözlemlendi. KİMKBHY'de bulunan oositlerin Altıncı günün sonunda büyük bir kısmının sağlıklı olduğunu gözlemledik. KİMKBHY'deki embriyoların ise yaşamlarına devam ettiğini fakat embriyoların bazılarının fragmente yapıda olduğunu gözlemledik. Bu bize KİMKBHY'nin oosit maturasyonu ve kültürü açısından uygun ortam olduğunu göstermiştir (**Resim 3.7.8**).

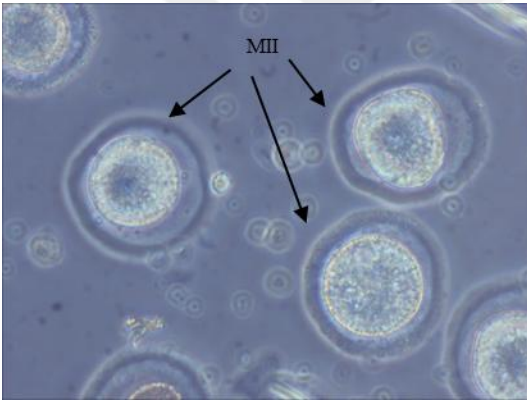
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G6- X200



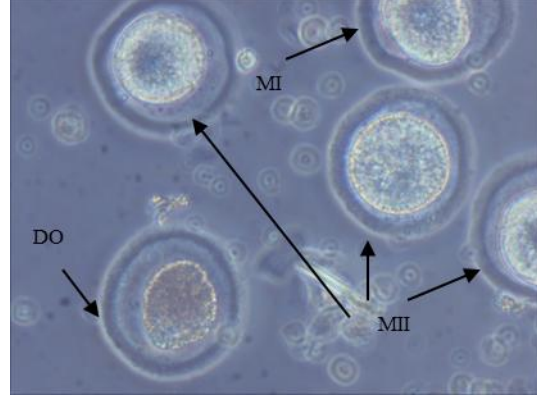
AMBY içerisinde bulunan Metafaz I oosit sağlıklı bir şekilde görmekteyiz

İTSBY-G6- X200



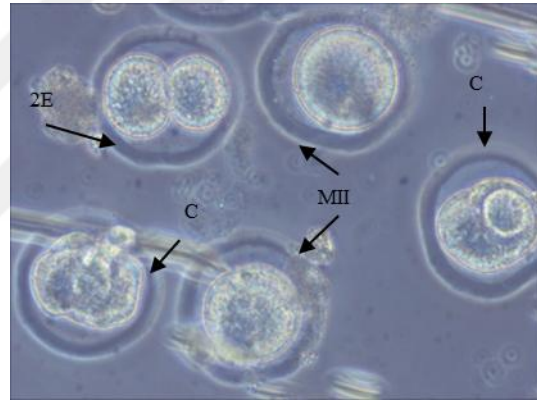
Altıncı günde embriyo ve oositlerin sağlıklı olduğu görülmektedir.

SSBY-G6- X200



Altıncı günde bulunan oositlerin bir kısmının dejenere olduğunu görmekteyiz.

KİMKHBY –G6-X200



Altıncı günün sonunda embriyoların ve oositlerin sağlıklı olduğu görülmektedir.

Resim 3.7.8. Altıncı günde kültür ortamında oosit ve embriyoların x200'lük büyütmedeki görüntüleri. SSBY'deki incelemede ise embriyoların sağlıklı olduğu fakat %80 oranında fragmantasyonun meydana geldiği gözlenmektedir. Aynı zamanda embriyo kültürü ve fertilizasyon açısından da uygun bir ortam olarak gözlenmektedir. Fakat KİMKHBY'deki oosit ve embriyolarda bir dejenerasyon gözlenmemektedir (2E: 2 hücreli embriyo, MII: Metafaz II, DO: Dejenere Oosit, C: Compaction).

Altıncı günün sonunda İTSBY ve SSBY'de bulunan embriyoların sağlıklı olduğu gözlenmiştir. Altıncı günün sonunda AMBY uygulanan oositlerin yarısının dejenere

olduğunu gözlemledik. Bu bize AMBY'nin embriyo kültürü ve gelişimi, oosit kültürü ve gelişimi için uygun olmadığını göstermektedir. (**Resim 3.7.9**).

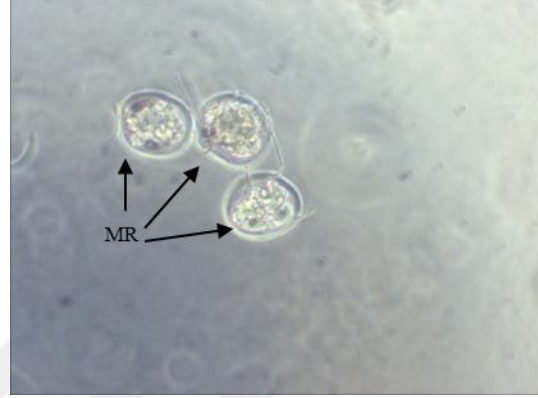
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G6- X100



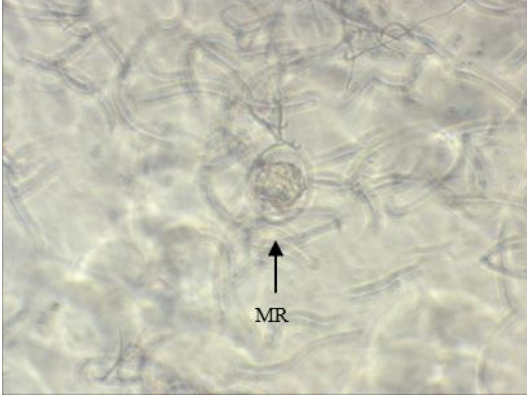
AMBY içerisinde bulunan Metafaz II oosit sağlıklı bir şekilde görmekteyiz

SSBY-G6- X100



Altıncı günde bulunan embriyoların %80 oranında fragmante olduğunu görmekteyiz

İTSBY-G6- X100



Morula aşamasındaki embriyonun sağlıklı olduğu görülmektedir.

KİMKHBY –G6-X100



Altıncı günün sonunda embriyolarda %60 fragmentasyon ve oositlerin sağlıklı olduğu görülmektedir.

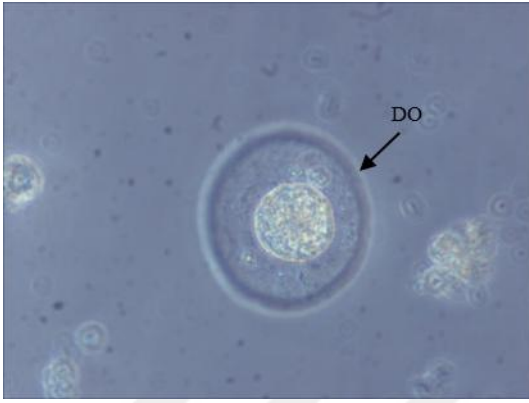
Resim 3.7.9. Altıncı günde kültür ortamında çeşitli oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri. SSBY'deki 4 ve 8 hücreli embriyolar altıncı günde morula safhasına geçtiği görüldü. İTSBY'de bulunan morula safhasındaki embriyo altıncı günde de morula safhasında görülmektedir (MR: Morula aşamasındaki embriyo, 8E: 8 hücreli

embriyo, C: Compaction aşamasındaki embriyo, MII: Metafaz II oosit, DO: Dejenere Oosit)

Dokuzuncu Günde yapılan incelemede AMBY içesindeki oositlerin tümünün dejenere olduğu görülmektedir. Ayrıca SSBY ve İTSBY'deki oosit ve embriyoların dejenere olduğu sadece SSBY uygulamasında 1 adet oositin sağlıklı olduğu görülmektedir. KİMKHBY'de bulunan oosit ve embriyoların dejenere olduğunu ve sadece bir oositin sağlıklı olduğu görülmektedir (**Resim 3.7.10**).

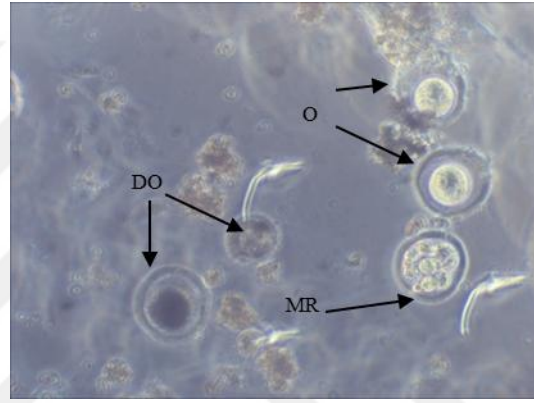
OOSİT YAŞAMA SÜREÇLERİ

AMBY-G9- X200



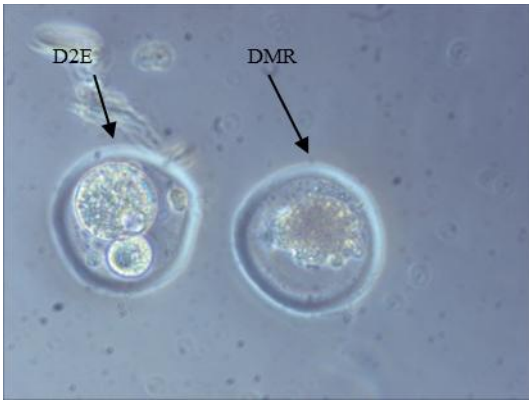
AMBY içerisinde bulunan metafaz I oosit'in dejenere olduğunu görmekteyiz

SSBY-G9- X100



Altıncı günde bulunan oositlerin büyük bir kısmının dokuzuncu günde dejenere haldeydi.

İTSBY-G9- X200



Dokuzuncu Günde Morula aşamasındaki embriyonun dejenere olmuş ve 2 hücreli embriyonun da dejenere olduğu görülmektedir. Oositler dejenere haldedir.

KİMKHBY -G9-X100



Dokuzuncu günün sonunda embriyoların ve oositlerin çoğunun dejenere olduğu görülmektedir.

Resim 3.7.10. Dokuzuncu günde kültür ortamında oosit ve embriyoların x100'lük büyütmedeki görüntüleri. Dokuzuncu günde SSBY ve İTSBY'deki embriyoların tümü dejenere olduğu görüldü. SSBY'deki oositlerden ise sadece dört tanesinin sağlıklı olduğu görüldü. İTSBY'deki oositlerin ise üç tanesi sağlıklı olduğu görüldü. AMBY'deki oositlerin bir tanesi sağlıklı olduğu görülmüştür. KİMKBHY'deki oositlerden 9 tanesi sağlıklı görülürken embriyolardan 3 tanesinin compaction aşamasında areste kaldığı gözlemlendi (MR: Morula aşamasındaki embriyo, D2E: Dejenere 2 hücreli embriyo, DC: Dejenere compaction aşamasındaki embriyo, MII: Metafaz II oosit, DO: Dejenere Oosit, O: Oosit, DMR: Dejenere Morula aşamasındaki embriyo).

Oositlerin sperm ile uygulamasının ardından fertilize olmadıklarında dejenere olmalarına BY etkisinin incelenmesinde yine en anlamlı olumlu etkinin KİMKBHY ile gerçekleştiği saptandı (**Tablo 3.7.2.**).

Tablo 3.7.2	AMBY	SSBY	İTSBY	KİMKBHY
OOSİT SAYISI				
0. GÜN	14	15	16	17
3. GÜN	11	13	15	16
6. GÜN	9	10	11	14
9. GÜN	1	4	3	9
11. GÜN	0	1	0	3

Tablo 3.7.2. Oositlerin AMBY, KİMKBHY, SSBY, İTSBY'de 0, 3, 6, 9 ve 11. günlerdeki yaşama süreçleri ve besiyerlerinin oosit yaşam süreçlerine etkisi.

Oositlerin sperm ile uygulamasının ardından fertilize olmadıklarında dejenere olmalarına BY etkisinin incelenmesinde embriyo kalitesi açısından süperovulasyon yapılmayan gruba göre karşılaştırıldı ve yine en anlamlı olumlu etkinin KİMKBHY ile gerçekleştiği saptandı (**Tablo 3.7.3.**).

Tablo 3.7.3.	Metafaz II (MII) Oosit	Metafaz I (MI) Oosit	Profaz I (PI) Oosit	Toplam
SO+ (FSH+HCG, n=10)	48 oosit (%50)	26 oosit (Ort. %27)	22 oosit (ort. %23)	96
SO- (n=10)	20 oosit (%20)	25 oosit (ort. %41.6)	15 oosit (%25)	60

Tablo 3.7.3. Oosit olgunluğunun gruplara göre yüzde dağılımı.



4. TARTIŞMA

İnfertilite günümüzde gittikçe artan bir problem olup insanların çocuk sahibi olamaması kaliteli bir yaşam ve toplumsal huzur açısından önemli sorunlara neden olmaktadır. İnfertilitede görülen önemli problemlerden bir tanesi oosit, sperm, embriyonun yaşam, kalite ve olgunlaşmasının sorunlu olması ve ürünün oluşması için yeterli olamamasıdır. Bu amaçla değişik besiyerleri geliştirilmeye çalışılmakta ve ciddi başarılarla elde edilmektedir. Ancak tüm bunlara rağmen başarı oranı hala %30'lar civarındadır. Kök hücreler son günlerin popüler konuları olup, kendileri ve salgıladıkları faktörlerle sağlığın değişik konularında kullanılmaya başlamış ve sadece hizmet etmekle görevli bu hücrelerin bir zarar vermedikleri de ortaya konmuştur. Bu çalışmada kök hücrenin diğer hücreler için olabilecek faydaları üreme hücreleri için kullanılmak istenmiş ve salgıladıkları faktörler niş ortamı olarak değerlendirilip besiyerlerine eklenmiştir. Sonuçlarımız kök hücrenin niş etkisinin üreme hücreleri ve embriyo için olumlu etkiler yarattığını göstermekte ve infertilitede kullanılacaklarını düşündürmektedir.

Oosit toplama sonucu elde edilen İVF öncesi örneklerde KİMKHBY uygulamasının olgunlaşma ve yaşam kalitesine olumlu katkı sağladığı görüldü. Ayrıca zaman bağımlı bozunmalarında yine olumlu katkının sağlandığı anlaşıldı. Süperovulasyon uygulandığında daha fazla oosit eldesi ve kalitenin arttırılması sağlandı. Bu durumda KİMKHBY uygulamasının olumlu etkileri daha belirgin olarak izlendi. Önceden yapılmış benzer bir çalışmada MKH'lerin salgıladıkları bazı faktörlerin mayoz olgunlaşmasında ve embriyo gelişimde etkili olabileceği düşüncesi incelenmiş ve kumulus hücreleri ile birlikte folikül gelişimi ve oosit olgunlaşmasındaki etkileri ortaya konmuştur. Oosit olgunlaşmasının etkilenmesi in vitro fertilizasyon sonrası blastosist formasyonunun oluşması ile ortaya konmuş ve kök hücrelerin beklemiş besiyerlerinde (conditional medium) germinal vezikül evre düzeyinde incelenmiştir. Beklemiş besiyeri DMEM, AMEM ve İTSBY ile karşılaştırılmış ve her bir besiyerinde 120 oosit ile yapılan çalışmada tubal sıvının 4 katı besiyerlerinde yaklaşık 2 katı olgunlaşma oranı elde edilmiştir. Daha da önemlisi blastokist evresine kadar olan embriyo gelişimde kök hücre nişinin etkisi 2 ve 8 katı olacak şekilde artmıştır. İn vitro maturasyon sürecinde oositlerde kortikal granül davranışının kök hücre etkisi ile daha belirgin olduğu özellikle preantral folikül

gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Kültür ortamında kök hücre nişi ile sağlanan bu etkilerden hormonlar da etkilenmiş ve diğer besiyerleri ile karşılaştırıldığında östrojenin 2 kat, progesteronun ise 10 kat arttığı kültür ortamına verilen HCG uyarımı sonrasında anlaşılmıştır (Ng, E.H ve ark. 2003). Bunun anlamı kök hücrelerin kendi besiyerlerine verdikleri faktörler, preantral folikül gelişimini, oosit olgunlaşmasını ve embriyo gelişimini olumlu yönde etkilediği şeklindedir. Oositlerin İVM sürecinde hem sitoplazmik hem nükleer olgunlaşma süreçleri geçirmesi başarı bir fertilizasyon ve embriyo gelişimi için mutlaka gereklidir (Demeestere I ve ark. 2005). Nükleer olgunlaşmanın göstergesi olan GV yıkımı ve polar body kutuplaşması ile ortaya konurken, sitoplazmik olgunlaşma ile belirteçler çok anlaşılmış değildir.

Kök hücreler besiyerlerine MCP, VEGF, EGF, FGF, IL, LIF ve TGF beta gibi sitokinler ve büyüme faktörleri salgılamaktadır. Deneysel amaçlı toplanan oositlerin kumulus karakteristikleri OKK olarak bilinip iki kategoriye ayrılır. Bunların ilkinde sıkı bir şekilde bağlanmış ve katlı bir kumulus tabakasının varlığı, ikincisi ise gevşek ve çoğunlukla ortadan kalkmış ve yayılmış kumulus varlığıdır. İlk gruptaki OKK'ların oositin mayoz maturasyonunda özellikle de GAP junctionlarına destek verdiği ve olgunlaşma sürecinde oositin çevresi ile ilişki kurmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bu sayede gerçekleşen sitoplazmik olgunlaşmanın fertilizasyon sonrası gelişimi etkilediği ve embriyonun kalitesini belirlediği öngörülmüştür. Kök hücre ve nişinin bu süreçlerdeki etkisi açısından da önemli olduğu çalışmamızda da desteklenmektedir. Çünkü deneylerimizde bulunan 2 hücreli aşama ile sonraki evrelerde kök hücre nişinin diğer besiyerlerine göre çok daha etkili olması gelecek için ümit veren bir bulgu olmaktadır. Özellikle EGF ve IGF-1 düzeylerine yaptıkları etkiler sebebiyle kumulus hücrelerine benzer bir şekilde germinal vezikül bozulmasına yardımcı oldukları iddiası desteklenmektedir. Bu sonuçlar ışığında kültürdekine benzer şekilde in vivo şartlarda da kök hücre ve nişinin etkili olabileceği tahmin edilebilir. İn vivo şartlardaki bu etkinin özellikle erken dönemdeki preantral foliküllerde saptanmış olması ve bu foliküllerin içerdikleri hücreler açısından teka, granüloza ve oosit olarak kök hücrenin birçok etkisini göstermesinde kullanılabilir. Kültür ortamındaki deneylerde bu hücrelere kök hücrelerin etkisi gösterilmiş ve daha önemlisi kök hücre uygulamasına bu hücrelerin gerçekleştirdiği hormona cevaplar ortaya konmuştur. Bu etkiler sonucunda kök hücre nişinin oluşturduğu

daha olgun mayoz süreci MII evresinde oositlerin fazlaşmasına, olgunlaşmasına ve İVF’de kullanılmak üzere ideal halini bulmasında yardımcı olacaktır (Ling B. ve ark 2008). Kök hücre niş etkisinin oosit aktivasyonunda da rol aldığı ve pronükleer formasyonu etkilediği ve bu etkileri kalsiyum üzerinden yaptığı düşünülmüştür. Oositin kalsiyumla bu ilişkisinde gap junctionların kullanılıyor olması ve normal bir embriyo gelişimi için bu sürecin varlığı bir başka mekanizma olarak kök hücre için etkili olabilmektedir (Feng DQ. Ve ark. 2009)

Önceki çalışmalarda sıçanlarda oosit toplamanın birçok faktör etkisi altında olduğu, bunlardan kendiliğinden oluşan aktivite ve olgunlaşma üretici faktör (Maturation Promoting Factor, MPF) farklı cinslerde değişik düzeylerde olması nedeniyle önemli olduğu gösterilmiştir. Bu faktörlerin süperovulasyonla daha etkili hale geldiği ve oluşan oositlerin daha çok etkilendiği saptanmıştır (Ross PJ. 2006). Bir başka çalışmada İVF için kullanılacak oositlerde kumulus hücrelerinin implantasyonu etkilediği ve yönlendirdiği görülmüştür ve mümkünse kumulus hücrelerinin olumlu etkilerinden yararlanmak için çok fazla uzaklaştırılmamaları gerekmektedir (Bağış H. ve ark. 2001). Oositler üzerine kök hücrenin etkisini gösteren ve bunu İVF ile ilişkilendiren çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Deri kökenli kök hücreleri ile yapılan bir çalışmada oosit farklılaşması sonucunda germ hücresi özgün belirteçleri in vivo yada in vitro olarak tanımlandığı saptanmıştır. Dahası bu hücrelerin hasar görmüş overe verildiğinde orada kaldıkları, bisulfan ile hasar verilmiş overlerde hasarı tamir ettikleri ve inflamatuvar sitokinlerden TNF, TGF, İL ve IFN (Interferon) salgıladıkları saptanmıştır. Bu hücrelerin ayrıca oogenez belirteç genlerinden NOBOX, NANOS3 ve LHX8 miktarını arttırdığı saptanmıştır gösterilmiştir (Lu ve ark. 2007). Bu çalışmalar bizim çalışmamızda görülen kök hücrenin nişi ile elde edilen olumlu etkilerin varlığına destek vermekte ve overdeki foliküller için hasar görmüş overlerde kök hücre tedavilerinin anlamlı olacağına işaret etmiştir (Lai D. ve ark. 2014).

İVF için gerekli olan diğer eş durumundaki spermelerin benzer şekilde kök hücre uygulamalarında özellikle harekete olan olumlu etki zamana bağlı bozunmalar içinde belirgin bir şekilde kendini gösterdi. Sperm için kök hücrenin araştırıldığı bir çalışmada sıçan hastalık modelinde bisulfan uygulaması sonucunda GFP ile işaretlenmiş MKH’ler rete testisten uygulanarak neredeyse kontrole benzer şekilde olumlu sonuçlar elde

edilmiştir. VASA+ ve SCP1+ hücreler GFP ile işaretlenmiş hücrelerde görülmüş, daha da önemlisi bu hücrelerin doğan bebeklere geçtiği saptanmıştır (Cakıcı ve ark 2013). Sperm fonksiyonelliğinin kaybolduğu soğuk ile koruma süreçlerinde rehabilitasyon basamağı olarak MKH'ler kullanılmış ve hasar oluşmuş hücrelerde rejenerasyonu hem salgıladıkları mikroveziküller hemde ürettikleri trofik moleküllerle düzelttikleri görülmüştür. Dondurulmuş hücrelerin ısıtılma süreçlerinde, yaşayabilirlik, hareketlilik ve antioksidan kapasite kök hücre uygulanmayan gruplara göre çok daha belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır. Ayrıca CD29, CD44 ve ICAM-1 ve VCAM-1 gibi yüzey adezyon moleküllerinin çok daha fazla salgılandıkları tespit edilmiştir (Mokarizadeh ve ark.2013). Daha da önemli bu çalışmada yağ kökenli kök hücre ile MKH arasında hiçbir fark bulunmadığı da tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda benzer bulguların olması yakın gelecekte insana uygulamalarının başlayacağına işaret etmektedir. Yapılmış bir başka çalışmada bisulfan uygulanmış testislerde spermatogenez durdurularak bu sefer BrDU ile işaretlenmiş MKH ler uygulanmış, spermatogonia, primer spermatosit ve spermatozoidlerin kontrol grubuna benzer şekilde tekrardan üretildiği görülmüştür. Ayrıca bu hücreler BrDU ile işaretlenmiş hücreler olarak da tanımlanmıştır (Monsefi M ve ark. 2013). Yine yapılmış bir başka çalışmada transgenik farelere c-Kit mutant durumda GFP ile işaretlenmiş KİMKH'si verilmiş ve hücrelerin yaşadıkları sertoli hücrelerine benzer bir görünüm elde ettikleri ve seminifer tübüllerde FSH reseptörü tanımladıkları saptanmıştır. Bu hücrelerin ayrıca spermatogonia ve spermatosit benzeri görünümde oldukları ve VASA ile işaretlendikleri saptanmıştır. Tüm bu bulgular çalışmanın sonuçlarını destekler nitelikte olup gelecekte IVF için yardımcı olacakları şekilde ümit vermektedir (Lu ve ark. 2007).

IVF uygulaması için gereken iki farklı germ hücresinin kök hücre ile olan etkileşimlerini izledikten ve olumlu katkılarını saptadıktan sonra bu hücreleri deneysel ortamda fertilizasyona zorlayarak niş etkisinin bu durumdaki değerini anlamaya çalıştık. Yaptığımız deneysel model optimizasyon şartları ile yönlendirilmiş olup bu konuda literatürde önemli değişiklikler bulunmaktadır. Deneyimizde MII aşamasında bulunan oositler kültür ortamına alınıp üzerine konan spermlerin bozunma süreçleri olan 45 dk boyunca muamele edilmeleri sağlandı. 45 dk ile 3 günlük periyod arasında fertilizasyona zorlanan oositlerin fertilize olmaları durumunda embriyonun ilerleme aşamaları

kaydedildi. Hem fertilizasyon hem de sonrasında gerçekleşen yarıklanma ve bölünme dönemlerinde KİMKHBY'nin daha etkin bir olumlu katkı verdiği görüldü. Yapılmış bir çalışmada İTSBY kullanımı ile 8-10 saat arasında sıçanlarda fertilizasyonun gerçekleştiği ve oluşan embriyoların vitrifikasyon ile dondurulmalarında ve daha sonra çıkarılarak ısıtılmasında ve böyle oluşan doğum oranlarında oldukça iyi sonuçlar alındığı gösterilmiştir (Aoto T. Ve ark. 2011). Literatürde dişi hayvanların ovulasyon indüksiyon protokolünü belirlemek amacıyla birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmaya göre eriskin Wistar-Imamichi sıçanların intraperitoneal PMSG enjeksiyonunu 48. saat sonra süperovulasyon yapılması için intraperitoneal HCG enjeksiyonu yapıldı (Kaya M. 2008). Uygulanan PMSG ve HCG dozları 0, 75, 150, 300 IU/kg idi. Elde edilen sonuçlara göre, eriskin sıçanlarda (10-15 haftalık) PMSG oosit sayısını ve fertilize olmuş oosit sayısını doz bağımlı şekilde 150 IU/kg'a kadar artırdığını bulunmuştur. Fakat PMSG tedavisi sonucu, eriskin sıçanlarla karşılaştırıldığında genç sıçanlarda (6-9 hafta) bu etkinin yarısı gözleldiler. Fertilizasyon oranı genç ve erişkin sıçanlarda yüksek yüzdede ve benzer buldular. Bu çalışmanın sonucuna bakıldığında yazarlar, transgenik rat üretimi için yüksek sayıda fertilize oosit toplanması amacıyla, süperovulasyon için 6-9 haftalık genç sıçanlar yerine 10-15 haftalık erişkin sıçanların kullanılması gerektiğini ve PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) tedavisinin 150 IU/kg ve HCG tedavisinin 75 IU/kg olmasını önermişlerdir (Mukumoto S. ve ark. 2001). Sonuç olarak, özellikle oosit toplama evresinden önce olasılıkla uzun süreli ve pahalı bir deneyin gerçekleştirildiği deneysel IVF çalışmalarında çalışmacıların kendi kullandıkları deneklere ait optimal doz ve süreyi belirleyen pilot ovulasyon indüksiyon çalışmalarını da çalışma planlarına almalarının gerekliliğini işaret etmektedir (Kaya M. 2006)

Yapılan bir çalışmada sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde fertilizasyon oranları incelenmiş ve bozuldukları belirgin bir biçimde saptanmıştır. bu çalışmada fare ile yapılan İVF denemelerinde kullanılan parametreler ile hücrelerin etkilenmeleri ve bozunmaları ortaya konmuştur. Bunlar arasında oosit maturasyonu ve fragmantasyon olduğu görülmektedir. Bizde bunlardan oosit ve embriyo kültürü tekniklerine bakıp kök hücre niş etkisinin oluşturduğu değişiklikleri inceledik (Kaya M. 2006).

KİMKH olgun organlardaki dokularda oldukça yaygın bir şekilde olup yapısında monosit kemotaktik protein-1, epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme

faktörü-2 (FGF-2), vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A), interlakün-6, lökosit büyüme faktörü gibi çeşitli sitokinleri ve büyüme faktörlerini içerir. KİMKG kültür esnasında ürettikleri faktörleri besiyeri içerisine verir (Feng DQ, 2008). Çalışmamızda niş dediğimiz bu faktörlerin oosit olgunlaşmasına ve in vitro fertilizasyona olumlu etki yaptığını gösterdik. Yaptığımız çalışmaya göre KİMKG besiyerine bırakılan PI oositlerin üçüncü günün sonunda yapılan incelemede oositlerin MII oositini oluşturduğu gözlemlendi. Bu sonuç KİMKG besiyerindeki faktörlerin oosit olgunlaşmasında önemli bir role sahip olduğunu gösterdi. Bu oositler üzerine daha önceden erkek sıçanların epididimlerinden toplanan sperm bu olgun oositler üzerine bırakıldığında fertilizasyon miktarının diğer besiyerine oranla daha fazla embriyo elde edildiği gösterilmiştir. Ayrıca bu KİMKG kültür besiyerinin embriyonun klivaj oranı embriyo gelişimi olumlu yönde tetiklediğini göstermektedir. İVF için kaliteli ve olgunlaşmış MII oositlerinden fazla sayıda elde etmek için SO işlemleri ÜYTE için çok önemlidir. Menstürel dönemde gonadotropinlerin yükselmesinin sonucunda buradaki oositlerin gelişmesine ve bu oositlerin mayotik maturasyonunu indükleyici etkide olduğu gösterilmiştir (Clift ve ark. 2013). Dişilerde, ovaryumda oositler olarak adlandırılmış yumurta öncül hücreleri doğumdan önce ovaryumda tutulur (Johnson ve ark. 2004; White ve ark. 2012). Depolanan bu oositler doğacak yavrulardaki genetik çeşitliliği korunmasını sağlayan DNA replikasyonu ve rekombinasyonu çoktan gerçekleşmiştir. Embriyonel dönemdeki bu oositler mayotik profazda areste kalır ve primordiyal folikül olarak adlandırılan folikül ile çevrilidir. Puberteye kadar bu oositler profaz I aşamasında kalır, puberteden sonra bu oositler mayotik bölünmesi mayoz II nin metafazına kadar devam eder ve burada areste kalır (Clift D ve ark. 2013). Çoğu memeli türlerinde, oosit olgunlaşmasında, diş gamet gelişiminin son adımı ovulasyondan önce meydana gelir. IVM embriyo gelişim sürecini desteklemek için çok sayıda olgun oositi üretme esasına dayanır ve böylece klinikte ve memeli hayvanların üretimi için yararlı olabilir (Gilchrist RB, 2011). Oosit olgunlaşması moleküler faktörlerin birçoğu tarafından kontrol edilir ve ikisi de bir oositin gelişimsel yeterliliği için gerekli olan nükleer ve sitoplazmik olgunlaşmayı içerir (Sirard MA ve ark. 2006). Nükleer olgunlaşmada oositler oositlerin PI sürecinden germinal vezikül yıkımı aşamasına geçtiği, MI sürecini atlattığı ve anafazI/telofaz I sürecinden MII sürecine geçtiği düşünülmektedir. Sitoplazmik olgunlaşmada sürecinde organellerin dağılımı, sitoiskelet dinamikleri, RNA,

protein ve metabolitlerin anne kaynaklı olanlarının değitrimesi esasına dayanır (Ferreira EM. ve ark. 2009).

Oositlerde nükleer olgunlaşma başarılı bir şekilde tamamlansa bile fertilizasyondan sonraki meydana gelecek gelişimi tamamlayabilmek ve sağlıklı bir şekilde embriyo gelişimi deva ettirebilmesi için oosit sitoplzmasında da değişiklikler meydana gelmelidir. Buna ‘‘Sitoplazmik Olgunlaşma’’ denir. Sitoplazmik olgunlaşmasını tamamlayamayan oositlerin kaliteleri kötüdür ve normal gelişimsel süreçleri tamamlayamazlar. Oosit apı ile embriyo gelişmesi ve ilerleyen embriyonel gelişimi destekleme yeteneğinin kazanılması arasında doğrudan bir ilişki vardır ve oositler sınır çaplarına (rneğin sığır için bu değer 120 µm’dir) ulaşmadan mayotik yeteneği kazansalar dahi sitoplazmik olgunlaşma meydana gelmediğinden, ileri embriyonik gelişimi destekleyemezler (Krisher, R.L. 2004). Oosit maturasyonu farelerde 12 ila 14 saat ve insanda ise 24 saatten fazla sürmektedir (Clift D ve ark. 2013).

Ovaryumlarda oosit rezervi ftal hayatta belirlenir ve tüm üreme hayatı boyunca bu rezerve ait primordial foliküller olgunlaşma periyoduna girerek Graff folikülünün ovulasyonu ile giderek tükenir. Bu rezervin insanda sadece %1’i rodentlerde ise %10’u ovulasyon aşamasına kadar olgunlaşır. Dünya Sağlık rgt’nün (WHO) tanımına göre infertilite bir yıl korunmasız koitusu rağmen gebeliğin oluşmamasıdır ve üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10-15’inde görülmektedir. İnfertilite çiftlerin %40’ında erkek kaynaklı, %40’ında kadın kaynaklı ve %20’sinde de çiftlerin her ikisinden kaynaklanmaktadır (Wrfel, 2003). Kadınlardaki en önemli infertilite problemi ovulatuvar disfonksiyondur (Speroff ve ark., 1999). Ovaryum stimulasyonu için uygulanan eksojen hormonların ovaryum rezervi için tamamen risksiz bir prosedür olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir (Liang, Xu ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda ovaryum rezervinde bulunan erken gelişim aşamasındaki aktive olmamış foliküllerin aktivasyonunda gonadotropinlerin etkili olabileceği gösterilmiştir (Flaws ve ark., 1997; Meredith ve ark., 1986). Rodentlerde yapılan çalışmalar da erken foliküllerin gelişiminin gonadotropinlerin etkisiyle olduğunu düşündürmüştür bununla birlikte hayvanlarda ve insanlarda dolaşımdaki minimal FSH veya defektif FSH reseptörleri varlığında bile foliküllerin antral evreye dek ulaşmış olmaları nedeniyle preantral folikül gelişiminin gonadotropin bağımsız olduğunu düşündüren çalışmalar da mevcuttur (McGee ve Hsueh, 2000). Ovaryum hiperstimülasyon

tedavisinin ovaryum yanıtına, toplanan oosit sayısına, oosit sitoplazma ve çekirdek olgunlaşmasına, embriyonun kalitesine, implantasyon oranına etkisiyle ilgili pek çok klinik ve deneysel çalışma literatürde mevcuttur (Ertzeid ve Storeng, 2001; Combelles ve Albertini, 2003; Van Blerkom ve Davis, 2001, Chao, Lee ve ark., 2005).

Mezenkimal kök hücrenin ve oluşturduğu niş ortamının IVF üzerindeki etkileri sadece embriyo oluşu için önemli olmayıp, somatik hücre nüklear transferi ile yapılan klonlamalarda da gelecek gösterdiği ve bir ümit olabileceği ortaya konmaktadır (Opiela J ve Samiec M 2013). Domuz kemik iliği kök hücrelerinden yapılan klonlamada yarıklanma oranının blastosist oluşum oranının ve iç hücre kitlesinde hücre sayısının mezenkimal kök hücrelerden klonlanmış hücrelerde çok fazla sayıda olduğu ve nüklear transfer yapılmış embriyolarda TUNEL+ hücrelerin kök hücreyle azaldığı tespit edilmiştir (Jin HF. 2007) Bu hücrelerden oluşan etkinin sadece germ hücrelerine değil onların birleşiminden oluşan embriyonun kabulünde, endometriyum için de önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir (Cuman C. ve ark. 2013). Mezenkimal kök hücrelerin içerdiği sitokinler ve büyüme faktörlerinin bu katkılarının sağlanmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Ling B. ve ark.2008).

5. SONUÇ, YORUM VE ÖNERİLER

Fertilizasyon problemi gelişmiş ülkelerde her geçen gün artan bir şekilde sorun oluşturmakta ve çözümü için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Kök hücrenin özellikle mezenkimal olanlarının zarar vermedikleri ve yarar göstermek için her ortamı fırsat buldukları bilinmektedir. Klinikte faz çalışmaları olarak insanlarda kullanılan bu hücrelerin olumlu etkilerininin vitro fertilizasyon içinde geçerli olabileceği düşünülerek bu çalışmamızda sıçan in vitro fertilizasyonunda kök hücrelerin nasıl bir etkisinin olduğunu araştırdık.

Bu çalışmamızda KİMKH Stro-1 ve CD90 antikorları ile boyadık ve pozitif sonuç verdiği gözlemledik.

Erkek ve östrüs dönemindeki dişi sıçanlardan toplanan oosit ve sperm örnekleri KİMKHBY'nin yanında İTSBY, SSBY, AMBY içerisine konularak yaşama süreçleri, oosit maturasyonu ve sperm hareketliliği hesaplandı. . 0, 3, 6, 9. Günlerde yapılan incelemede oositin en uzun süre yaşamını devam ettirdiği besiyeri olarak kemik iliği mezenkimal kök hücre besiyeri olduğunu gösterdik. Aynı zamanda sperm hareketliliğinin ve canlılık süresinin de kemik iliği besiyerinde en iyi olduğu görülmüştür.

Ayrıca KİMKHBY uygulamasının oosit maturasyonu açısından da önemli sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu sonuç İVF tedavilerinde kök hücrelerin kullanımının etkili olabileceğini göstermiştir. TGF- β gibi faktörlerin bulunduğu besiyeri ortamına vermesinden dolayı kök hücrenin oosit maturasyonunda ve fertilizasyonda önemli rol oynadığı görüşünü bize düşündürmektedir. Bu çalışmamız IVF çalışmalarına bir ışık kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

Bu sonuçlara ek olarak kök hücre direkt etkisinin benzer bir çalışma ile değerlendirilmesi, sonrasında gerçekleştirilecek implantasyon sırasında benzer şekilde endometriyuma kök hücre ve nişinin uygulanması IVF için önemli katkılar sağlayacaktır.

Sonuç olarak hem kadınlar hem de erkeklerde kök hücre uygulamalarının infertiliteye yönelik sadece tedavi olmayıp koruyucu bir yaklaşım olarak kullanılabilmesi düşüncesine varılması önemlidir. Ayrıca kök hücre özellikle de mezenkimal kök hücre tedavisi zarar vermeme anlamında son derece emniyetli gözükmektedir. Kök hücre uygulamalarının germ hücresine yaptığı etkilerin mekanizmalarının anlaşılması IVF için hala 1/3 olan başarının artmasını sağlamada büyük önem taşıyacaktır.

KAYNAKLAR

- A. McLaren, "Primordial germ cells in the mouse," *Developmental Biology*, vol. 262, no. 1, pp. 1–15, 2003. [View at Publisher](#) · [View at Google Scholar](#) · [View at Scopus](#)
- Aghaloo TL, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Kang B, Franco R, Dry SM, Atti E, Tetradis S. Osteogenic potential of mandibular vs. long-bone marrow stromal cells. *J Dent Res*. 2010 Nov;89(11):1293-8. doi: 10.1177/0022034510378427. Epub 2010 Sep 1
- Alhadlaq, A., Mao, J.J. 2004. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem. Cells and Dev.*, 13(4); 436-448.
- Anwar A, Moussa MD. In vitro maturation of oocytes. *OBGYN.net Advertisement*. Jan: 2002.
- Akyüz A. (2003) İnfertil Çiftin Araştırılması. 3.Uluslararası Üreme ve Aile Planlaması Kongresi, 20-23 Nisan Ankara, s.32-35.
- Akkoç T, 2013 [ttp: //dosya.marmara.edu.tr/ ecz/Etkinlikler/2013/ Nisan/Son%20hafta/ Tolga_AKKO_ -IVF_ve_Kriyobiyoji_22042013.pdf](http://dosya.marmara.edu.tr/ecz/Etkinlikler/2013/Nisan/Son%20hafta/Tolga_AKKO_-IVF_ve_Kriyobiyoji_22042013.pdf)
- Aoto T, Takahashi R, Ueda M. A protocol for rat in vitro fertilization during conventional laboratory working hours. *Transgenic Res*. 2011 Dec;20(6):1245-52. doi: 10.1007/s11248-011-9492-z. Epub 2011 Feb 26.
- Bağış H, Keskintepe L, Sagirkaya H, Odaman H, Çetin S. Influences of Cumulus Cells During in vitro Fertilization of Mouse Oocytes in Different Mouse Strains. *Turk J Vet Anim Sci* 25 (2001) 777-782
- Begüm Alyürük, Diabetes Mellitus Tip 1 Oluşturulmuş Erkek Farelerden Elde Edilen Spermlerin İvf Uygulamalarında Fertilizasyon Ve Embriyo Kalitesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi, Kocaeli Üniversitesi 2011
- Betül Çelebi, Sıçan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinin Proteom İncelemesi, Ankara Üniversitesi 2007.
- Bukovsky, A., Svetlikova, M. and Caudle, M.R., 2005, Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3:17, 1-13
- Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005 May 5;3:17. PubMed PMID: 15871747;
- Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isık A, Uludag O, Ustun H, Subası C, Karaoz E. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-

tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *Biomed Res Int.* 2013;2013:529589. doi:10.1155/2013/529589. Epub 2013 Feb 18.

Cemal H., Karatekelioğlu E., Atar E. (2007) Erkek fertilitisini etkileyen beslenme, çevresel faktörler ve diğer nedenler. *Androloji Bülteni*, Sayı 28, s.39-43.

Chao H-T, Lee S-Y, Lee H-M, Liao T-L, Wei Y-H Ve Kao S-H, (2005), Repeated Ovarian Stimulations Induce Oxidative Damage and Mitochondrial DNA Mutations in Mouse Ovaries, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1042**: 148–156

Chowdhury I, Garcia-Barrio M, Harp D, Thomas K, Matthews R, Thompson W. E. The Emerging Roles of Prohibitins in Folliculogenesis. *Front Biosci. (Elite Ed.)* 2012; 4: 690-699.

Clarke GN. Association between sperm autoantibodies and enhanced embryo implantation rates during in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2006 Sep;86(3):753-4. Epub 2006 Jun 30. PubMed PMID: 16814290.

Colter, C.D., Sekiya, I., Prockop, D.J. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Cell Biol.*, 98(14); 7841-7845.

Conget, P.A., Minguell, J.J. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 181(1); 67-73.

Çelik Ö. (Edt.) Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Nobel Tıp Kitabevi, 2011.

Cuman C, Menkhorst EM, Rombauts LJ, Holden S, Webster D, Bilandzic M, Osianlis T, Dimitriadis E. Preimplantation human blastocysts release factors that differentially alter human endometrial epithelial cell adhesion and gene expression relative to IVF success. *Hum Reprod.* 2013 May;28(5):1161-71. doi:10.1093/humrep/det058. Epub 2013 Mar 10.

Delilbaşı L., 2008, *In vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*, Güneş Tıp Kitabevleri., Yıldırım M., 2000, *Klinik İnfertilite*, 2. Baskı, Eryılmaz Ofset.

De Smedt V, Szöllösi D, Kloc M.: The balbiani body: asymmetry in the mammalian oocyte. *Genesis*, 26(3):208-212, 2000. Review.

Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact Of Various Endocrine And Paracrine Factors On In Vitro Culture Of Preantral Follicles In Rodents. *Reproduction*. 2005; 130: 147–156.

Desmond A. McCarthy. Cytometric analysis of cell phenotype and function. 2001, 1-13

Driscoll GL, Tyler JPP; Hangan JT, et al. A prospective, randomised, controlled, doubleblind, double-dumming comparison of recombinant and urinary HCG (SIGMA; C8554) for inducing oocyte maturation and follicular luteinization in ovarian stimulation. *Human Reproduction* 2000; 15(6): 1305-1310.

Durlinger A. L, Kramer P, Karels B, de Jong F. H, Uilenbroek J. T, Grootegoed J. A, Themmen A. P. Control Of Primordiyal Follicle Recruitment By Anti-Mullerian Hormone In The Mouse Ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 5789–96.

Diefenderfer, D.L., Osyczka, A.M., Reilly, G.C., Leboy, P.S. 2003. BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect. Tiss. Res.*, 44; 305-311.

Driscoll GL, Tyler JPP; Hangan JT, et al. A prospective, randomised, controlled, doubleblind, double-dumming comparison of recombinant and urinary HCG (SIGMA; C8554) for inducing oocyte maturation and follicular luteinization in ovarian stimulation. *Human Reproduction* 2000; 15(6): 1305-1310.

Dominici, M., Hofmann, T.J., Horwitz, E.M., 2001. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and clinical application. *J. Biol. Reg. Homeo. Ag.*, 15; 28-37.

Dicker D., Goldman J. A., Ashkenazi J., Feldberg D., Shelef D., Levy T. (1991) Age and pregnancy rates in vitro fertilization. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, Volume 8, Number 3, 141-144.

Erdem M. ve Yıldırım M. (2003) İleri yaş infertilitesi. *Türk Fertilite Dergisi*, 11: 185-192.

Edwards RG, Steptoe PC and Purdy JM (1970) Fertilisation and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes. *Nature* **227**,1307–1309.

Edwards RG, Steptoe PC and Purdy JM (1980) Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* **87**,737–756

Edwards, L.J., et al., Effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. 288(5): p. E845-51.

Edwards RG. Changing genetic world of IVF, stem cells and PGD. C. Embryogenesis and the differentiation of the haemopoietic system. *Reprod Biomed Online*. 2005 Dec;11(6):777-85. Review.

Elizur S. E., Lerner-Geva L., Levron J., Shulman A., Bider D., Dor J. (2005) Factors predicting IVF treatment outcome: a multivariate analysis of 5310 cycles. *Reprod Biomed Online* 10: 645–9.

Eskenazi B., Wyrebeck A. J., Slotter E., Kidd S. A., Moore L., Young S., Moore D. (2003) The association of age and semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 18(2): 447-454.

Eroschenko V. P. (Çeviri Edt.; Demir R.) diFiore Atlas of Histology, 10th. Palme Yayıncılık, 2008.

Ertzeid G. , Storeng R. , The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice, *Human Reproduction* , **Vol.16**, No.22 pp. 221-225, 2001

Esrefoglu, M., 2004, Genel ve özel histoloji, Pelikan Tıp Ve Teknik Kitapçılık, Ankara, 356 s.

Fauser, B.C. and A.M. Van Heusden, Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev*, 1997. 18(1): p. 71-106.

Fauser, B.C. and P. Devroey, Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends Endocrinol Metab*, 2003. 14(5): p. 236-42.

Fauser, B.C., et al., Minimal ovarian stimulation for IVF: appraisal of potential benefits and drawbacks. *Hum Reprod*, 1999. 14(11): p. 2681-6.

Farini A, Sitzia C, Erratico S, Meregalli M, Torrente Y. Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases. *Stem Cells Int*. 2014;2014:306573.

Feeney A, Nilsson EE, Skinner MK. Cytokine (IL16) and Tyrphostin Actions on Ovarian Primordial Follicle Development. *Reproduction*. 2014 Jun 26. pii: REP-14-0246. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24970835.

Feng DQ, Zhou Y, Ling B, Gao T, Shi YY, Wei HM, Tian ZG. Effects of the conditioned medium of mesenchymal stem cells on mouse oocyte activation and development. *Braz J Med Biol Res*. 2009 Jun;42(6):506-14.

Filicori, M., et al., The use of LH activity to drive folliculogenesis: exploring uncharted territories in ovulation induction. *Hum Reprod Update*, 2002. 8(6): p. 543-57.

Fukumoto, T., Sperling, J.W., Sanyal, A., Fitzsimmos, J.S., Reinholz, G.G., Conover, C.A., O'Driscoll, S.W. 2003. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming factor beta-1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(1); 55-64.

Fair, T., Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, 2003. 78(3-4): p. 203-16.

Flaws, J.A., et al., Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*, 1997. 57(5): p. 1233-7.

Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev. Sci. Tech. Off. İnt. Epiz.* 2005; 24 (1): 413-423.

Gardner DK., 2008, *İn Vitro Fertilizasyon Pratik Yaklaşım*, (Çev: Serdaroğlu H.), Hayat Tıp Kitapçılık.

Gartner, L. P. and J. L. Hiatt (2007). *Color textbook of histology*. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier.

Gregory, C.A., Prockop, D.J., Spees, J.L. 2005. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp. Cell. Res.*, 306(2); 330-335.

Gövsu F: *Sistematik Anatomi*. İzmir: Güven Kitapevi; 2003.

Guyton, A.C., Hall, J.E. (2000). *Medical Physiology* (H. Çavuşoğlu, B. Çağlayan Yeğen, Z. Aydın, İ. Alican, Çev.). İstanbul: Yüce yayımları A. Ş. ve Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. (2001).

Hassa H., 2003, *İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları*, Osmangazi Üniversitesi Yayınları.

Hskowitz-Eldor J, Kol S, Mannaerts B. Use of a single bolus of GNRH agonist triptorelin to trigger ovulation after GNRH antagonist ganirelix treatment in women undergoing ovarian stimulation for assisted reproduction, with special reference to the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: preliminary report. *Human Reproduction* 2000; 15(9): 1965-1968.

Hwang SJ, Cho TH, Kim IS. In Vivo Gene Activity of Human Mesenchymal Stem Cells After Scaffold-Mediated Local Transplantation. *Tissue Eng Part A*. 2014 Apr 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24575828.

Heikinheimo O, Gibbons W. E. The Molecular Mechanisms Of Oocyte Maturation And Early Embryonic Development Are Unveiling New Insights Into Reproductive Medicine. *Molecular Human Reproduction*. 1998; 4(8): 745-756

Hugues JN. Ovarian stimulation for assisted reproductive technologies. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD (eds), *Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting*. Geneva: WHO, 2002, pp 102-(12).

Inanç, B., Elçin, A.E., Elçin, Y.M. 2007. Effect of osteogenic induction on the *in vitro* differentiation of human embryonic stem cells cocultured with periodontal ligament fibroblasts. *J. Artif. Organs*, 31(11); 792-800.

Inoue A, Akiyama T, Nagata M, Aoki F. The perivitelline space-forming capacity of mouse oocytes is associated with meiotic competence. *Journal of Reproduction and Development*, 2007; 53(5):1043-1052

Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med*. 2005;23: 234-241.

Jefferson W. N., Padilla-Banks E. and Newbold R.R. (2005) Adverse Effects on Female Development and Reproduction in CD-1 Mice Following Neonatal Exposure to the Phytoestrogen Genistein at Environmentally Relevant Doses. *Biology of Reproduction*, 73:798–806.

Jin HF, Kumar BM, Kim JG, Song HJ, Jeong YJ, Cho SK, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ. Enhanced development of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol*. 2007;51(1):85-90.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K. at Tilly, J.L., 2004, Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary, *Nature*, Vol 428: 145-150

Junqueira L. C, Carneiro J. (Çeviri Ed.; AYTEKİN Y, SOLAKOĞLU S.) *Temel Histoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2005.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K. at Tilly, J.L., 2004, Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary, *Nature*, Vol 428: 145-150

Junqueira LC, Carneiro J. (Çev.: AYTEKİN2003), (Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology, Güneş Tıp kitabevi; 2009.

Karabulut O, Delilbaşı L, Oogenezis, Oosit Toplama Prosedürü, Oosit Morfolojisi ve İn vitro Maturasyon. In: Delilbaşı L.(Ed). İn Vitro Fertilizasyon Laboratuvar Yöntemleri. 2007; 85-86.

Kierszenbaum A. L. (Çeviri Edt.; Demir R.) Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology. Palme Yayıncılık, 2006.

Kim S. T. and Moley K. H. (2008) Paternal effect on embryo quality in diabetic mice is related to poor sperm quality and associated with decreased glucose transporter expression, Reproduction, 136 (3): 313 - 322.

Kişnişçi H. A., Gökşin E., Durukan T., Üstay K., Ayhan A., Gürkan T., Öneroğlu L. S. (1996) Erkeğe Bağlı İnfertilite, Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ed. Ankara: Güneş, 1119-1129, 1287.

Kita K, Watanabe T, Ohsaka K, Hayashi H, Kubota Y, Nagashima Y, Aoki I, Taniguchi H, Noce T, Inoue K, Miki H, Ogonuki N, Tanaka H, Ogura A, Ogawa T. Production of functional spermatids from mouse germline stem cells in ectopically reconstituted seminiferous tubules. Biol Reprod. 2007 Feb;76(2):211-7. Epub 2006

Krüssel JS., Bielfeld P., Polan ML., Simon C. Regulation of embryonic implantation, Europ J Obstetrics&Gynecology and Reproductive Biology 2003, 110

Koc, O., Lazarus, H. 2001. Mesenchymal stem cell: heading into clinic. Bone Marrow Transplant, 27; 235-239.

Kort H. I., Massey J. B., Elsner C. W., Mitchell-Leef D., Shapiro D. B., Witt M. A., Roudebush W. E. (2006) Impact of body mass index values on sperm quantity and quality, Journal of Andrology, 27(3): 450-2

Koşar P. A., Özçelik N. (2007) Erkek infertilitesinde genetik değerlendirme. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 14(3): 48-51.

Krisher, R.L., The effect of oocyte quality on development. J Anim Sci, 2004. 82 E-Suppl: p. E14-23.

Kuyucu Y. , Tap Ö. ; Oocyte Maturation Process and Affecting Factors, Archives Medical Review Journal. 2009; 18(4): 227-240

Lai D, Wang F, Dong Z, Zhang Q. Skin-derived mesenchymal stem cells help restore function to ovaries in a premature ovarian failure mouse model. *PLoS One*. 2014 May 30;9(5):e98749

Li, T.F., O'Keefe, R.J., Chen, D. 2005. TGF-beta signaling in chondrocytes. *Front. Biosci.*, 10; 681-688.

Liu X, Mal S, Miao D, Liu D, Bao S, Tan J. Cortical granules behave differently in mouse oocytes matured under different conditions. *Human Reproduction*, 2005; 20((12)):3402-3413.

Lue Y, Erkkila K, Liu PY, Ma K, Wang C, Hikim AS, Swerdloff RS. Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. *Am J Pathol*. 2007 Mar;170(3):899-908.

Ling B, Feng DQ, Zhou Y, Gao T, Wei HM, Tian ZG. Effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells on the in vitro maturation and subsequent development of mouse oocyte. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Nov;41(11):978-85. Epub 2008 Oct 31.

Lu DY, Li Y, Bi ZW, Yu HM, Li XJ. Expression and immunohistochemical localization of aquaporin-1 in male reproductive organs of the mouse. *Anat Histol Embryol*. 2008 Feb;37(1):1-8. Epub 2007 Dec 7.

Lunenfeld, B., Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Hum Reprod Update*, 2004. 10(6): p. 453-67

Liang L. , Xu B. , Zhu G. , (2009) Effects of repeated gonadotropin stimulation on ovarian reserves and proliferation of ovarian surface epithelium in mice, *Frontiers of Medicine in China* 3(2):220-226,

Macklon, N. S., R. L. Stouffer, ve ark. (2006). "The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization." *Endocrine Reviews*, 27(2): 170-207.

Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ.: Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod. Biol.*, 9(3):203-224, 2009.

Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *Journal of Reproduction and Development*. 2012; 58: 44-50.

M. Kanatsu-Shinohara, J. Lee, K. Inoue et al., "Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice," *Biology of Reproduction*, vol. 78, no. 4, pp. 681–687, 2008. [View at Publisher](#) · [View at Google Scholar](#) · [View at Scopus](#)

Meredith, S., D. Kirkpatrick-Keller, and R.L. Butcher, The effects of food restriction and hypophysectomy on numbers of primordial follicles and concentrations of hormones in rats. *Biology of Reproduction*, 1986. **35**(1): p. 68-73.

Mehmet Kaya ; Deneysel olarak sigara dumanına maruz bırakılan farelerde sigara dumanının ve E vitamininin ivf parametreleri (fertilizasyon oranı, klivaj oranı, embriyo gelişim oranı) üzerine etkileri, 2006 .

McGee E ve Hsueh A.J.W, (2000) İntial and Cyclic Recruitment of Ovarian follicles, *Endocrine Reviews*, **21**(2):200-214

Murat Başar, Süperovulasyonun Ovaryum Dokusu Yapısı Üzerine Etkilerinin Morfolojik Yönden Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji AD., 2006.

Mokarizadeh A, Rezvanfar MA, Dorostkar K, Abdollahi M. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters. *Reprod Toxicol*. 2013 Dec;42:78-84.

Monsefi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T. Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. *Iran J Reprod Med*. 2013 Jul;11(7):537-44.

Montella K. R., Keely E., Laifer S. A., Lee R. V. (2000) Evaluation and management of infertility in women: The internist'role. *Annals Of Internal medicine*, 132: 973-981.

Moore KL, Persaud TVN: Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. M. Yıldırım, I. Okar, H.Dalçık (Çev). 6. baskıdan çeviri. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.

Minguell, J.J., Erices, A., Conget, P. 2001. Mesenchymal stem cells, *Minireview. Soc. Exp. Biol. Med.*, 226; 507-520.

Mukumoto S, Mori K, Ishikawa H.: Efficient induction superovulation in adult rats by PMSG and HCG. *Exp Anim*. 1995;Apr 44(2): 111-118. 2001; 50 (5): 365-369.

Niimura S, Kawakami S, Takano H. Changes in the amount of cytoplasmic inclusions in mouse oocytes during meiotic maturation in vivo and in vitro. *Reproductive Medicine and Biology*, 2004; 3:231-236.

Nihan Günaslan 2011, Kumulus Oosit Kompleksinde Kök Hücre Populasyonunun Araştırılması, Konya Selçuk Üniversitesi

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. 3rd Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

Nazlı Hayırlı ,2011;Genç ve yaşlı ratlarda tekrarlayan kontrollü ovaryum hiperstimulasyon tedavisinin genital ve endokrin sistem organları üzerindeki etkisinin morfolometrik olarak incelenmesi, Ankara Üniversitesi

Netter F. H. (Çeviri Edt.; Cumhur M.) İnsan Anatomisi Atlası. 5. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, 2012.

Ng, E.H., et al., Oocyte and embryo quality in patients with excessive ovarian response during in vitro fertilization treatment. J Assist Reprod Genet, 2003. 20(5): p. 186-91.

Noort, W.A., Kruisselbrink, A.B., Anker, P.S., Kruger, M., Van Bezooijen, R.L., De Paus, R.A., Heemskerk, M.H.M., Lowik, C.W.G.M., Falkenburg, J.H.F., Willemze, R., Fibbe, W.E. 2002. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD 34 (+) cells in NOD/SCID mice. Exp. Hematol., 30(8); 870-878.

Opiela J, Samiec M. Characterization of mesenchymal stem cells and their application in experimental embryology. Pol J Vet Sci. 2013;16(3):593-9.

Orshan S. A. (2008) Maternity, Newborn And Women's Health Nursing, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins a Wolters Kluwer business.

Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology, Güneş Tıp kitabevi; 2009.

Owen, M., Friedenstein, A.J. 1988. Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. Ciba Found. Symp., 136; 42-60.

Pepling M. E and Spradling A. C. Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordiyal Follicles. Dev. Biol. 2001; 234: 339-351.

Pepling M. E. Follicular Assembly: Mechanisms of Action. Reproduction. 2012; 143: 139-149.

Pepling ME, Wilhelm JE, O'Hara AL, Gephardt GW, Spradling AC. Mouse oocytes within germ cell cysts and primordiyal follicles contain a Balbiani body. PNAS, 2007; 104(1):187-192.

Plas E., Berger P., Hermann M., Pflüger H. (2000) Effect of aging on male fertility. *Experimental Gerontology*, Volume 35, Issue 5, 543-551.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411); 143-147.

Pritts EA, Atwood AK. Luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. *Human Reproduction* 2002; 17(9): 2287-2299.

Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757).

Ross, M. H. and W. Pawlina (2011). *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.

Ross PJ, Yabuuchi A, Cibelli JB. Oocyte spontaneous activation in differentrat strains. *Cloning Stem Cells*. 2006 Winter;8(4):275-82.)

R.Pute, R.Pabsts 2004, *Sabota İnsan Anatomi Atlası*

Sadler T W: *Medikal Embriyoloji. Başaklar C (Çev), 9. baskıdan çeviri*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.

Sağsöz ve Ark. *Kök Hücreler Dicle Üniv Vet Fak Derg* 2008: 1 (2): 29 – 33

Sarraaj M. A, Drummond A. E. *Mammalian Foetal Ovarian Development: Consequences for Health and Disease*. *Reproduction* 2012; 143: 151-163.

Sadler T. W. (Çeviri Edt.; Başaklar A. C..) *Langman's Medikal Embriyoloji*, 7. Baskı. Palme Yayıncılık, 2007

Sarani S. A, Ghaffari-Novin M, Warren M. A, Dockery P, Cooke I. D. Morphological Evidence For The 'Implantation Window' In Human Luminal Endometrium. *Hum Reprod*. 1999; 14: 3101-3106.

Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Cui, J.G., Prockop, D.J. 2004. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *J. Bone Miner. Res.*, 19(2); 256-264.

Silva, W.A.Jr., Covas, D.T., Panepucci, R.A., Proto-Siqueira, R., Siufi, J.L.C., Zanette, D.L., Santos, A.R.D., Zago, M.A. 2003. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 21; 661-669.

Solomon EP. (Çev.: Süzen LB) İnsan anatomisi ve fizyolojisine giriş. İstanbul: Birol Basın Yayın Dağıtım; 2000.

Şahin, F., Saydam, G., Omay, S.B. 2005. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. THOD, 15(1); 48-56.

Shoham Z., Di Carlo C., Patel A., Conway G. S., Jacobs H. S. (1991) Is it possible to run a successful ovulation induction program based solely on ultrasound monitoring? The importance of endometrial of endometrial measurements. Fertil Steril, 56: 836-841.

Speroff L., Glass N. H., Kase R. G. (2007) Clinical Gynaecologic Endocrinology And Infertility, 7nd edition, Baltimore: Williams & Wilkins, p.84, 171, 213, 236, 1013, 1026, 1142, 1143, 1075, 1097, 1133.

Speroff L, Glass RH, Kase NG. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Sixth edition. 1999. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, U.S.A.

Stilley J. A. W, Birt J. A, Sharpe-Timms K. L. Cellular and Molecular Basis For Endometriosis-Associated Infertility. Cell Tissue Res. 2012; 00441-011-1309-0.

Sullivan, M.W., et al., Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation. J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(1): p. 228-32.

Tae, S.K., Lee, S.H., Park, J.S., Im, G.I. 2006. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. J. Biomed. Mater., 1; 63-71.

Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp AŞ yayınları; 2002.

Trounson, A. and L. Mohr, Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature, 1983. 305(5936): p. 707-9.

Tuli, R., Seghatoleslami, M.R., Tuli, S., Wang, M.L., Hozack, W.J., Manner, P.A., Danielson, K.G., Tuan, R.S. 2003. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. Mol. Biotechnol. 23(1); 37-49.

Tsai MC, Takeuchi T, Bedford MJ, Reis MM, Rosenwaks Z, Palermo GD. Alternative sources of gametes: reality or science fiction?. Hum Reprod, 2000; 15(5):988-998.

Van Blerkom J. ve Davis P. , (2001), Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II Mouse oocytes matured in vivo and in vitro, *Human Reproduction* **16**(4):757-764

van Santbrink, E.J., et al., Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril*, 1995. 64(1): p. 37-43.

van Montfoort AP, Plösch T, Hoek A, Tietge UJ. Impact of maternal cholesterol metabolism on ovarian follicle development and fertility. *J Reprod Immunol*. 2014 May 14. pii: S0165-0378(14)00055-2. doi: 10.1016/j.jri.2014.04.003. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24933118.

Ulloa-Aguirre, A., et al., Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*, 1995. 16(6):p. 765-87.

Wagner, W., Feldman, R.E.Jr., Seckinger, A., Maurer, M.H., Wein, F., Blake, J., Krause, U., Kalenka, A., Bürgers, H.F., Saffrich, R., Wuchter, P., Kuschinsky, W., Ho, A.D. 2006. The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp. Hematol.*, 34(4); 536-548.

Wang Y., Ock S. A., Chian R. C. (2006) Effect of gonadotrophin stimulation on mouse oocyte quality and subsequent embryonic development in vitro, 12(3): 304-10.

Ward M. A. (2005) Intracytoplasmic Sperm Injection Effects in Infertile azh Mutant Mice. *Biology of Reproduction*, 73: 193–200

Würfel, W., How to improve results in assisted reproduction., ed. e.M.-p. GmbH. 2003

Wide, L. and O. Bakos, More basic forms of both human folliclestimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 76(4): p. 885-9.

Yang, B.C., T. Uemura, and H. Minaguchi, Effects of a gonadotropin releasing hormone agonist on oocyte maturation, fertilization, and embryonal development of mice. *J Assist Reprod Genet*, 1995. 12(10): p. 728-32.

Yoshimura, Y., et al., Gonadotropin-releasing hormone agonists induce meiotic maturation and degeneration of oocytes in the in vitro perfused rabbit ovary. *Fertil Steril*, 1991. 55(1): p. 177-83.

Zeleznik, A.J. and C.J. Kubik, Ovarian responses in macaques to pulsatile infusion of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone: increased sensitivity of the maturing follicle to FSH. *Endocrinology*, 1986. 119(5): p. 2025-32.

Ziebe, S., et al., Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Hum Reprod*, 2004. 19(6): p. 1457-60.

Zou J, Yuan C, Wu C, Cao C, Yang H. The effects of platelet-rich plasma on the osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res*. 2014 Jun 18:1-6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24874552.

Zülal Öner, Endometriosis'te İmplantasyon Değişikliklerinin İmmünohistokimyasal Analizi, İnönü Üniversitesi 2011