



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**POLİKİSTİK OVER SENDROMLU HASTALARDA
İN-VİTRO MATURASYON, VİTRİFİKASYON
VE
DONDURMA-ÇÖZME KOMBİNASYONUNUN
BAŞARILI İMPLANTASYON ORANINA ETKİSİ**

EBRU ALÇOLAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİVAS / 2009

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**POLİKİSTİK OVER SENDROMLU HASTALARDA
İN-VİTRO MATURASYON, VİTRİFİKASYON
VE
DONDURMA-ÇÖZME KOMBİNASYONUNUN
BAŞARILI İMPLANTASYON ORANINA ETKİSİ**

EBRU ALÇOLAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF.DR. H. ERAY BULUT
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

SİVAS

ARALIK 2009

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen / Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. H. Eray BULUT

Üye Prof. Dr. Emel KOPTAGEL

Üye Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI

Üye Doç. Dr. Muhittin SÖNMEZ

Üye Doç. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN

ONAY

Bu tez çalışması, 08.01.2010 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen / Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

POLİKİSTİK OVER SENDROMLU HASTALARDA *İN-VİTRO* MATÜRASYON, VİTRİFİKASYON

VE

DONDURMA-ÇÖZME KOMBİNASYONUNUN BAŞARILI İMPLANTASYON ORANINA ETKİSİ

EBRU ALÇOLAK

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji-Embriyoloji AD.

Danışman: Prof.Dr. H. Eray BULUT

2009

Gonadotropin vermeden immatür oosit elde etmek ve embriyo kriyoprezervasyonu, polikistik over sendromlu (PKOS) hastalarda ovaryan hiperstimülasyon sendromunu (OHSS) önlemek için son zamanlarda konvansiyonel *in-vitro* fertilizasyon (İVF) tekniklerine alternatif faydalı bir tedavi seçeneğidir.

Çalışmadaki amacımız, PKOS'lu hastalarda OHSS riskini önlemek ve azalmış endometriyal reseptiviteden dolayı implantasyonu arttırmak için intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu (İCSİ) siklusunda elde edilmiş embriyoların dondurulmuş-çözülmüş Embriyo Transfer (Kriyo-ET) siklusuna aktarılmasında *in-vitro* matürasyon (İVM) ve vitrifikasyon yöntemi kombinasyonunun etkisini incelemektir.

Yaş ortalaması 31.2 (± 3.8) olan toplam 37 hastada 47 İVM siklusu çalışıldı. Hastalardan 18'inde 23 İVM siklusu kaydedilen bu çalışmada *in-vitro* matürasyon ile elde edilen tüm zigotların vitrifikasyonunda kriyotop metodu uygulandı. İntra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu siklusunda kaydedilen bütün veriler, 2-3, 7-8 ve devam eden günlerdeki endometriyal kalınlık ve follikül takibi transvajinal ultrasonografi uygulanarak seri değerlendirmeler ile gözlemlendi. İmmatür oositlerin toplanma zamanı dominant follikül büyüklüğü ($\geq 10-12$ mm) ve endometriyal kalınlık ($\geq 6-8$) istenilen uygunluğa gelir gelmez, hCG

uygulanmasından 36 saat sonra olarak ayarlandı. Toplanan tüm immatür oositlerin İVM prosedüründe Sage medyumunu kullanıldı. Bu immatür oositlerin *in-vitro* matürasyonu ile üretilen matür (MII) oositlerden İCSİ prosedürü sonrası meydana gelen tüm zigotlar vitrifiye edildi. Kriyoprezervasyonu sağlanan zigotlar çözülüp bir günlük inkübasyondan sonra Kriyo-ET programına transfer edildi. Klinik ve embriyolojik sonuçlar değerlendirildi.

Toplamda 397 immatür oosit toplandı ve 201 oosit *in-vitro* ortamda olgunlaştırıldı. Bunların 102'si fertilize oldu ve vitrifiye edildi. Matürasyon ve fertilizasyon oranları sırasıyla % 50.62 (201 toplam oosit / 397 GV oosit) ve % 50.74 (102 toplam zigot / 201 toplam MII oosit) olarak hesaplandı. Dondurulmuş-çözülmüş 34 ET siklusunda 68 embriyo transfer edildi. Transfer (n=34) başına düşen klinik gebelik oranı % 8.82 bulundu ve implantasyon oranı % 5.88 olarak saptandı. Bu çalışmada 4 gebelik elde edildi. Bir hastada spontan düşük yaşandı, diğer 3 hastanın klinik gebelik ise hala (>24 hafta) devam etmektedir. Çalışmamızda kayıtlı PKOS hastalarında hiç OHSS teşhis edilmedi.

Bu çalışma, İVM/İCSİ siklusunda üretilen tüm zigotların vitrifikasyonu ile kombine Kriyo-ET programının PKOS'lu hastalar için umut verici ve güvenilir bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Polikistik over sendromu, vitrifikasyon, oosit Matürasyonu,

ABSTRACT

THE EFFECTS OF THE COMBINATIONS OF IN VITRO MATURATION, VITRIFICATION AND CRYO-THAWED METHODS ON SUCCESSFUL IMPLANTATION RATES IN PCOS PATIENTS

Ebru ALÇOLAK

Master of Sciences Thesis, Department of Histology- Embryology

Supervisor: Prof. Dr. H. Eray BULUT

2009

Immatur oocytes retrieval without gonadotropin supplementation and cryopreservation of embryos are now valuable treatment options that alternative to the conventional in-vitro fertilization (IVF) techniques in order to prevent ovarian hyperstimulation syndrome.

The aim of the present study was to invastigate the effects of the combination of in-vitro maturation and vitrification methods in zygotes that obtained from the ICSI cycles and transferred to the cryo-thawed embryo transfer programme cycle in order to prevent ovarian hyperstimulation syndrome risk also to increase the successful implantation rate in polycystic ovarian syndrome patients.

A total number of 47 in-vitro maturation (IVM) cycles were studied in total number of 37 PCOS patients with the age of 31.2 (\pm 3.8). The Cryotop method was used in 23 IVM cycles of 18 patients for the vitrification of all zygotes obtained by the in-vitro maturation techniques. Data monitored by measuring the endometrial thickness and follicular follow-up procedure were done by transvaginal ultrasonography on days 2-3, 7-8 and on subsequent follow up days.

The recruitment time of immature oocytes was 36 hours after hCG priming when the dominant follicle diameter reached to \geq 10-12 mm, Sage medium was used in IVM procedure of immature oocytes. All zygotes obtained by ICSI procedure of MII mature oocytes which were obtained by IVM process

of immature oocytes were vitrified. Cryopreserved zygotes were thawed then, following one day incubation process, they were transferred to the cryo-thawed embryo transfer programme. Clinical and embryological findings were evaluated.

A total number of 397 immature oocytes were collected and 201 of those oocytes reached to the MII stage. Fertilized and vitrified oocytes number was 102. Maturation and fertilization rates were 50.62% (201 total oocytes/397 total GV oocytes) and 50.74% (102 total zygotes/201 MII oocytes) respectively.

Sixtyeight embryos were transferred into 34 embryo transfer cycles. Clinical pregnancy rate per transfer (n=34) was 8.82% whereas the implantation rate was 5.88%. While 4 pregnancies were occurred, one of them was lost by spontaneous miscarriage. The remaining 3 pregnancies are still continuing (>24 weeks). On the other hand, no ovarian hyperstimulation syndrome was occurred in PCOS patients included in the present study.

Findings of the present study indicated that the combination of IVM and vitrification methods should be a promising and safe treatment choice for patients with PCOS.

Key words: PCOS, vitrification, oocytes maturation

TEŐEKKÜR

Tez konumun seçilmesi ve değerlendirilmesi sırasında bana önderlik eden, her konuda yol gösteren

danışman hocam;

Prof. Dr. H. Eray BULUT'a

Tecrübelerini benden esirgemeyen, çalışmalarım boyunca bana destek olan yardımcı danışman hocam;

Prof. Dr. Safaa AL-HASANI'ye

Çalışmam boyunca desteğini gördüğüm değerli hocam;

Prof. Dr. Emel KOPTAGEL'e

Histoloji-Embriyoloji Bölümü hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma

Tez düzeltmelerime yardım eden sevgili dostum;

Emre SUATOĞLU'na

Her zaman hayatıma ve çalışmalarına maddi manevi destek olan;

AİLEM'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ebru ALÇOLAK

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	15
2. GENEL BİLGİLER	17
2.1. Kadın Üreme Sistemi Fizyolojisi	17
2.2. Polikistik Over Sendromu	21
2.2.1. Polikistik Over Sendromunda Klinik ve Laboratuar Bulguları	23
2.2.2. Polikistik Over Sendromunun Etiyopatogenezi ve İnfertilite	25
2.2.2.1. Gonadotropin Sekresyon Defektleri	25
2.2.2.2. Steroidogenez Değişiklikleri	26
2.2.2.3. İnsulin Salınım ve Etki Bozuklukları	27
2.2.2.4. Genetik Faktörler	27
2.3. Oositlerin Büyüme, Gelişim ve Olgunlaşması	28
2.3.1. Oosit Matürasyonu	29
2.4. Yardımla üreme Tekniklerinde Kriyoprezervasyon Uygulamaları	31
2.4.1. Kriyoprezervasyon İşleminde Kullanılan Maddeler	32
2.4.1.1. Hücre İçine Nüfuz Edebilen Kriyoprotektanlar	33
2.4.1.2. Hücre İçine Nüfuz Edemeyen Kriyoprotektanlar	34
2.4.2. Kriyoprezervasyon Uygulamalarında Kullanılan Yöntemler	35
2.4.2.1. Konvansiyonel Yavaş Dondurma	35

2.4.2.2. Hızlı Dondurma	36
2.4.2.3. Vitrifikasyon	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Hasta Seçimi	39
3.2. Hastanın İn-Vitro Maturasyon Programı İçin Klinik Olarak Hazırlanması	40
3.3. İmmatür Oosit Toplama İşlemi	40
3.4. Sperm Hazırlama ve İCSI	41
3.5. Vitrifikasyon ve Çözdürme Protokolleri	41
3.6. Embriyo Transferi İçin Endometriyumunu Hazırlama ve Embriyo Transferi	42
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA	47
6. KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	89

TABLolar ve ŐEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Menstrüel Siklus	18
Tablo 1. Polikistik Over Sendromu Tanı Kriterleri	22
Tablo 2. Polikistik Over Sendromunun Belirti ve Bulguları	25
Tablo 3. Parametreler	43
Tablo 4. Dondurulmuş Çözölmüş Embriyo Skorlaması	44

KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
AFP	Antifriz Protein
BSA	Siğır Serum Albumini
BKİ	Beden Kitle İndeksi
CSF	Hematopoetik Büyüme Faktörü
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
DHEAS	Dihidroepiandrostenedion Sülfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
E ₂	Östradiol
EG	Etilen Glikol
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FAS	Folikül Aspirasyon Sıvısı
FCS	Fötal Kordon Serumumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FISH	Floresan <i>in-situ</i> Hibridleme
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GL	Gliserol
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GV	Germinal Vezikül
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
H/S	Histeroskopi
HSA	İnsan Serum Albumini
HSG	Histerosalpingografi
HTF	İnsan Tübal Sıvısı
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IGF-2	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2
IL-1	İnterlökin 1
IVF	<i>In Vitro</i> Fertilizasyon

IVF-ET	<i>İn Vitro</i> Fertilizasyon-Embriyo Transferi
IVM	<i>İn Vitro</i> Maturasyon
Kriyo-ET	Dondurulmuş-Çözölmüş Embriyo Transferi
KOH	Kontrollü Over Hiperstimölasyonu
LH	Luteinizan Hormon
LIF	Lösemi Baskılayıcı Faktör
MII	Metafaz II
Met I	Metafaz I
MOS	Mannanoligosakkaritler
MPF	Maturasyon İlerleten Faktör
MS	Maternal Serum
NIH	Ulusal Sağlık Entitüsü
OHSS	Ovaryan Hiperstimölasyon
OPS	Açık Çekilmiş Payet
P	Progesteron
PEG	Polietilen Glikol
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PG-F2 α	Prostaglandin F2 α
PGL	Propilen Glikol
PKO	Polikistik Over
PKOS	Polikistik Over Sendromu
PrOH	Propanediol
PVA	Polivinil Alkol
PVP	Polivinil Pirrolidon
rFSH	Rekombinant Follikül Stimüle Edici Faktör
SHBG	Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TV-USG	Transvajinal Ultrasonografi
YÜT	Yardımla Üreme Teknikleri

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, bir yıl içinde etkili bir doğum kontrolü uygulanmamasına ve düzenli cinsel ilişki varlığına rağmen konsepsiyonun gerçekleşmemesi olarak tanımlanmaktadır. Sağlıklı çiftlerin yaklaşık % 85-90'ında ilk bir yıl içerisinde gebelik gerçekleşir (1). İnfertilite probleminin üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık % 10-15'ini etkileyen bir faktör olduğu bilinmektedir (2). Yetmişli yıllardan itibaren uygulanmaya başlanan *in-vitro* fertilizasyon (İVF) ve 1992'den beri uygulanan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (İCSİ) yöntemleri infertilite tedavisine umut kaynağı olmuştur. Günümüzde birçok İVF merkezinde *in-vitro* fertilizasyon-embriyo transferi (İVF-ET) işlemleri yaygın ve başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Bu sebeple dünyada binlerce çift infertilite tedavisi alabilmek ümidi ile tedavi merkezlerine başvurmaktadır.

In-vitro fertilizasyon tekniğine alternatif olarak follikül stimüle edici hormon (FSH) ya da diğer ovulasyon uyarıcı ilaçlar kullanılmadan, bir başka deyişle stimüle edilmemiş ovaryumlardan alınan olgunlaşmamış oositlerin *in-vitro* matürasyonu (IVM) günümüzde giderek artan kullanıma sahip bir üreme teknolojisidir (3-6). *In-vitro* matürasyon 1991 yılında ilk kez Cha tarafından sezeryan esnasında yapılan ovaryum biyopsisinden elde edilen immatür oositlerde başarı ile uygulanmıştır (7). Trounson ve arkadaşları ise 1994 yılında PKOS'lu bir hastadan transvajinal ultrasonografi (TV-USG) rehberliğinde, immatür oositlerin eldesiyle oluşturdukları gebeliği rapor ederek İVM'i ilk kez klinik uygulamalara sokmuşlardır (8). Başlangıçtaki düşük gebelik oranları nedeni ile pek rağbet görmeyen bu teknik son yıllarda, özellikle PKOS'lu kadınlarda, yeniden güncellik kazanmıştır (3-5). Ultrasonografide PKOS saptanan hastalar klinik ve endokrin olarak PKOS olmasalar dahi ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) gelişimi açısından artmış risk altındadırlar (9). Prospektif bir çalışma 20 PKOS'lu kadında uygulanan 25 İVM siklusunda oosit toplanmasından önce 10.000 IU insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulaması ile % 40 klinik gebelik oranı yayınlayarak bu tekniğin PKOS'lu hastalarda İVF'e bir alternatif olduğu ortaya konmuştur (3).

Klinikteki bir başka uygulama ise *in-vitro* koşullarda olgunlaştırılan oositlerden elde edilen embriyoların dondurulup çözümlmesinden sonra sağlıklı bebeklerin doğması ile elde edilmiştir (10). Kriyoprezervasyon (dondurulup saklama) uygulamaları fizyolojik olmayan ve yüksek ısı ile ozmotik değişikliklere gereksinim duyan güncel laboratuvar uygulamalarıdır. İnsan hücrelerinin ve özellikle gamet ve embriyolarının kriyoprezervasyonu yardımıyla üreme teknikleri (YÜT) alanında çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu teknik tek bir ovaryum stimülasyon siklusu sonucunda hastaların yüksek oranlarda gonadotropinlere maruz bırakılmadan kümülatif gebelik oranlarının arttırılmasında oldukça etkilidir. Seksenli yılların başlarından itibaren kullanılan yavaş dondurma ve yakın zamanda tanımlanan vitrifikasyon günümüzde kullanılan kriyoprezervasyon yöntemleridir. Her iki yöntem temelde hücre veya dokunun donma ya da katılaşması esasına dayanmaktadır. Vitrifikasyon, artmış çözüme sonrası yaşam ve başarı oranları ile insan gamet ve embriyolarının kriyoprezervasyonunda tercih edilmesi gereken yöntem olarak tanımlanmıştır. Vitrifikasyon tekniğinde yüksek konsantrasyonlarda dondurma çözeltilerinin kullanımıyla dondurulacak hücre çok hızlı bir şekilde (<1 sn) 37 °C'den (inkübatör içinden) -196 °C'lik kritik sıcaklık aralığını yüksek soğutma hızıyla (>-10.000°C/dk) geçilerek cam şeklinde katılaşarak dondurulur. Yapılan meta-analitik bir çalışmaya göre embriyolarda vitrifikasyon yöntemiyle oldukça başarılı canlılık oranları bildirilmiştir (11). Sonuç olarak İVM ve vitrifikasyon tekniklerinin birlikte kombinasyonunun gelecekte daha sık kullanım alanına sahip yardımcı üreme tekniği olması kaçınılmaz görünmektedir.

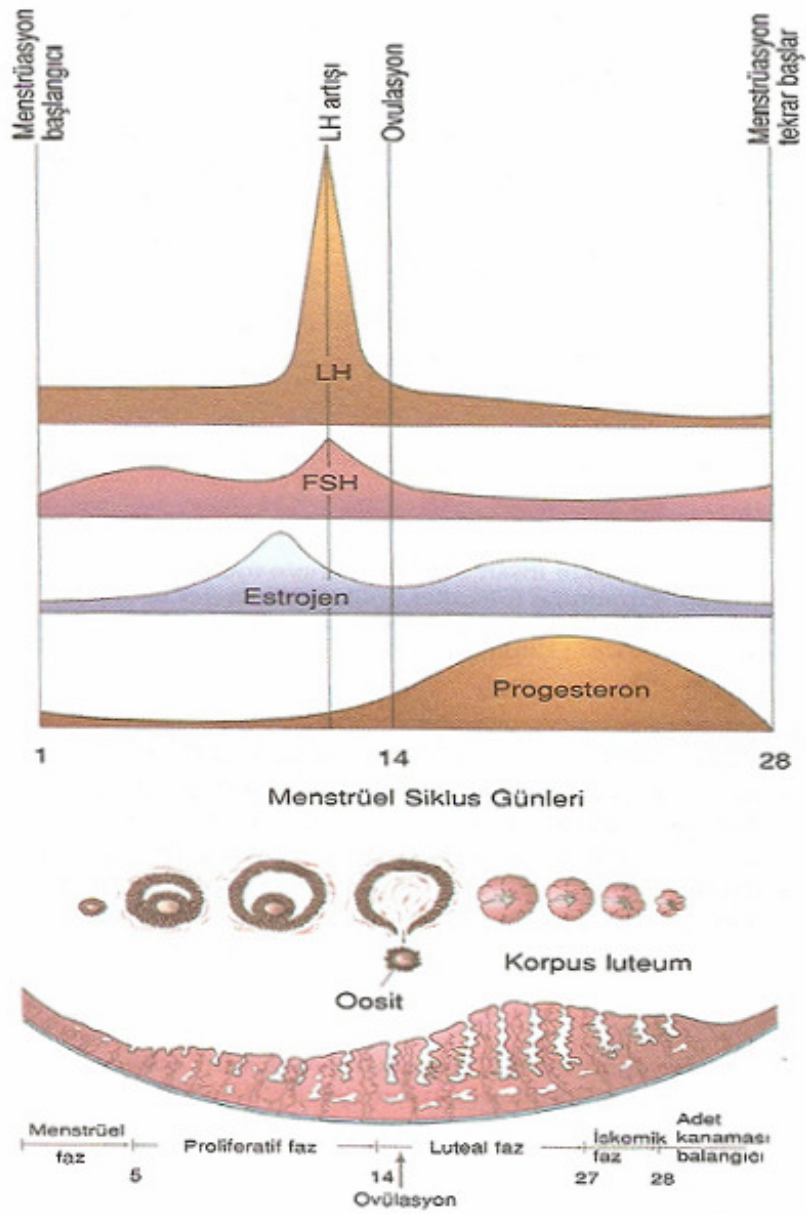
Bu çalışmada, PKOS'lu hastalarda OHSS riskini önlemek için İVM/İCSİ ile vitrifikasyon yöntemlerinin kombine şekilde kullanılmasının sağlıklı embriyo üretimine ve başarılı implantasyon oranına etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kadınlarda tek başına en fazla karşılaşılan infertilite nedeni, ovulasyon bozukluğudur. İnfertilite problemi olan kadınların % 40'ından fazlasında ovulasyon problemi bulunmaktadır. Polikistik over sendromu üreme çağındaki kadınlarda ovarial fonksiyon bozukluğuna ve dolayısı ile infertiliteye yol açan en başlıca neden olarak karşımıza çıkmaktadır. Normal ovarial (menstrüel) siklus oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu karmaşık yapıda en ufak bir değişiklik siklusu bozabilir ve ovulasyon engellenebilir. Modern tedavi yöntemleri ile bu hastaların gebe kalma şansları oldukça yüksektir. Polikistik over sendromu nedenlerine bakmadan önce doğal ovarial siklusun fizyolojisine bakmak faydalı olacaktır.

2. 1. Kadın Üreme Sistemi Fizyolojisi

Menstrüasyon; menarştan menopoza kadar kadının fertil döneminde düzenli aralıklarla görülen fizyolojik karakterde vajinal kanamalarla karakterizedir. Adet kanamalarının düzeni hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofizden salgılanan follikül stimüle edici hormon (FSH), lüteinizan hormon (LH) ile ovarial seks steroidleri arasındaki koordinasyonun hedef organ endometriyumdaki siklik etkileşimlere bağlı olarak gerçekleşir. Genellikle ovulatuar sikluslar ortalama 28 gün sürmekle beraber 21-40 gün arasında değişen düzenli sikluslara da rastlanabilmektedir. Perimenarşial veya perimenapozal kadınlarda sikluslar gonadotropin seviyelerindeki dalgalanmalara bağlı olarak anovulatuar daha kısa veya daha uzun aralıklarla da oluşabilir. Overlerde gonadotropinler folliküler ve luteal evreler olarak iki dönemi belirler. Folliküler evrenin endometriyal dokudaki karşılığı proliferatif, luteal dönemindeki karşılığı ise sekretuar evrelerdir.



Şekil 1. Menstrüel siklus: Üst panelde siklik FSH, LH, östradiol (E_2) ve progesteron (P) değişiklikleri ovulasyon zamanı esas alınarak gösterilmektedir. Alt panelde ovaryel siklusun folliküler ve luteal dönemlerinin endometriyal sikluskdaki proliferatif ve sekretuar evreler ile kolerasyonu gösterilmektedir (12).

Kadınlar, puberteden başlayarak, hipotalamus, hipofiz bez ve overler tarafından düzenlenen aylık üreme sikluslarına girerler. Bu sikluslar üreme sistemini gebeliğe hazırlar. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipotalamustaki nörosekretuar hücreler tarafından sentezlenir. Bu hormon ön hipofizde sentezlenen ve overlere etki eden gonadotropinlerin salınımını uyarır. Menstrüel siklus folliküler ve luteal evreleri içerir. Folliküler evre FSH, luteal evre LH hormonunun etkisi altında gerçekleşir. Yaklaşık 9 gün süren proliferatif evre ovaryal folliküllerin büyümesi ile aynı zamanda olur ve bu folliküller tarafından salgılanan östrojen ile kontrol edilir. Bu süre içinde endometriyum kalınlığında iki üç kat artış olur. Bu evrenin erken dönemlerinde endometriyumun yüzey epiteli yenilenir. Bezlerin sayısı ve uzunlukları artar ve spiral arterlerde uzama olur. Luteal evrede LH, ovulasyon için tetik görevi yapar ve folliküler hücrelerle korpus luteumun progesteron üretimini uyarır. Yaklaşık 13 gün süren luteal evre, korpus luteumun oluşumu, işlev görmesi ve büyümesi ile eş zamanlıdır. Korpus luteum tarafından üretilen progesteron, bez epitelinin glikojenden zengin mukus salgılamasını uyarır. Bezler geniş ve kıvrımlı bir hal alır. Endometriyum korpus luteumdan salgılanan progesteron ve östrojen hormonlarının etkisi ve bağ dokusu içindeki sıvı miktarının artışı ile kalınlaşır.

Bir kadının reproduktif dönemi boyunca yaklaşık 400 follikülde ovulasyon meydana gelecektir. Her siklusta gelişme için foliküllerin seçilme mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Gelişmeyle başlayan folliküllerin sayısı rezidüel over rezervine bağlıdır. Folliküler evrenin ilk beş gününde yükselen FSH, 3 ila 30 antral follikülün büyümesini sağlar. Bu foliküllerden yalnız bir tanesinde ovulasyon oluşacak diğerleri ise atrofiye uğrayacaktır. Follikül stimüle edici hormon uyarısı follikülleri preantral folliküllere dönüştürür. Androstenodion ve testosteron, teka ve interstisyel hücrelerden salgılanarak östrojen sentezi için kaynak oluştururlar. Teka hücrelerince sentezlenen bu androjenler granüloza hücrelerine diffüze olur. Granüloza hücrelerinde androjenlerin FSH uyarısı ile aromatisasyonu sonucu östradiol üretimi gerçekleşir. Östrojen sentezindeki teka ve granüloza hücrelerinin bu ortak iş

bölümüne “iki hücre, iki gonadotropin teorisi” denir. Follikül stimüle edici hormon ve östradiol birlikte foliküllerdeki FSH reseptörü sayısını arttıırırlar. Östrojen geribildirimi, dominant follikül dışındaki folliküllerin tümünü inhibe eder. Follikül stimüle edici hormon reseptörü açısından zengin olan follikül dominans kazanır. Dolaşımdaki FSH, folliküler evrenin ikinci yarısında düşerken, artmış östrojen FSH'nin sinerjistik etkisi ile artan LH reseptör oluşumuna geçişi sağlar. Lüteinizan hormon salgılanması düşük düzeylerdeki östrojenle inhibe edilirken ancak yüksek düzeylerdeki östrojenle uyarılır. Bunu sağlayan iki kritik özellik vardır;

- 200 pg/ml yi aşan konsantrasyonlar
- 50 saati geçen östrojene maruz kalma

Artan östrojen hipofiz bezinin GnRH'na duyarlılığını arttırırken, GnRH'nın etkisi ile LH piki olana kadar sürer. Ovulasyon, siklustan siklusa değişkenlik göstermekle beraber genellikle LH doruk düzeye ulaştıktan 10–12 saat sonra gerçekleşir. Lüteinizan hormonun ani artışı östradiol pikinden 24–36 saat sonra meydana gelir. Lüteinizan hormon en yüksek düzeye ulaştıktan sonra östradiol düşmeye başlar. Lüteinizan hormonun ani artışı mayozun sürdürülmesini, granüloza hücrelerinin lüteinizasyonunu, kumulus ooforusun genişlemesini sağlar. Yine LH'nın bu artışı progesteronda sürekli bir yükselmeyi indükler. Progesteron ile follikülün hacmi hızla artar. Progesteron, FSH ayrıca LH etkisi ile salgılanan proteolitik enzimler ve prostaglandin F2 α (PGF-2 α) ovumun salınmasına yol açar.

Oositin salınması ile lüteal evre başlar. Progesteron düzeyleri ovulasyondan sonra hızla yükselir. Progesteron, LH ani artışından 8 gün sonra maksimum düzeye ulaşır. Lokal ve santral yolla ayrıca östrojen ve inhibin A'nın da etkileri ile yeni foliküllerin gelişmesi engellenir. Döllenme gerçekleşmezse 6-8 gün sonra progesteron düşmeye başlar ve siklus sonunda iyice düşmesi ile menstrüasyon kanaması başlar (13, 14)

2. 2. Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu, üreme çağındaki kadınların % 5-10'unu etkileyen kronik anovulasyon ve hiperandrojenizm ile karakterize, kompleks metabolik bir hastalıktır (15). Nedeni kesin olarak aydınlatılamamış olan bu hastalıkta her menstrüel döngüde gelişerek çatlaması gereken follikül, gelişmesinin yarıda kalması nedeniyle yumurtalık dokusu içinde 3-10 milimetre çapında bir kiste dönüşür. Yumurtalık dokusu, bu kistler sayıca arttığında "polikistik" oluşum içeren bir yapı haline gelir.

İlk kez 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından, yedi hastadan oluşan bir seride PKO ve amenore birlikteliği şeklinde rapor edilmiştir (16). Bu iki bilim adamı 1935 yılında bir tıp dergisinde yayınladıkları makalede bu sendromu aşırı tüylenme, adet görememe, gebe kalamama, aşırı kilo alma ve diğer bazı belirtilerden oluşan bir durum olarak sunmuşlar ve yumurtalıklarda çok sayıda kistik oluşumdan bahsetmişlerdir. Aynı bilim adamları 1948 yılında PKOS olan kadınlara patolojik tanı koyma amacıyla yumurtalıklarından ameliyat yoluyla kama şeklinde parça çıkarma ile uyguladıkları biyopsi sonrasında sendromun belirtilerinin hafiflediğini veya kaybolduğunu gözlemlemişler ve bu kadınların % 90'ının gebe kalabildiğini yazmışlardır (17). O zamandan günümüze PKOS alanında önemli gelişmeler kaydedilmiş olmakla birlikte, günümüzde hala sendromun etiyopatogenezi ve tanı kriterleri hakkında tartışmalar sürmektedir.

Yaygın olarak kullanılan tanı kriterleri, 1990 yılında Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) tarafından düzenlenmiş bir konferansta oluşturulmuştur (Tablo 1) (18). Buna göre, PKOS tanısı için klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ile kronik anovülasyon bulunması ve Cushing sendromu, hiperprolaktinemi, klasik olmayan konjenital adrenal hiperplazi gibi PKOS benzeri kliniğe yol açabilecek diğer nedenlerin ekarte edilmesi gereklidir. Bu tanı kriterleri her ne kadar PKOS'taki heterojen hasta grubu düşünüldüğünde arzulanan seviyede olmasa da en azından tanı açısından belli bir standardizasyonu sağlamıştır. Ayrıca belirlenen bu tanı kriterlerinin klinik, biyokimyasal ve uzun dönem sağlık riskleriyle ilişkisini

irdeleyen çok merkezli ve klinik birçok çalışmaya da vesile olmuştur (19, 20). Buna karşılık, 2003 yılında düzenlenen bir uzman toplantısında, 1990 NIH kriterleri yeniden gözden geçirilmiş ve öncekine benzer şekilde diğer etiyolojik nedenler ekarte edildikten sonra sendrom tanısının aşağıdaki üç kriterden ikisinin birlikteliği ile koyulması önerilmiştir (Tablo 1) (21).

- Oligo-anovülasyon,
- Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları,
- Ultrasonografide polikistik overler.

Kronik anovülatuar infertilitenin en sık nedeni olan PKOS, multisistemik reproduktif metabolik bir sendrom olarak tip II diyabet, dislipidemi, kardiyovasküler hastalık ve endometriyal karsinoma gibi uzun dönem sağlık riskleri taşıması nedeniyle günümüzde bir halk sağlığı problemi olarak da ön plana çıkmaktadır.

Tablo 1. Polikistik over sendromu tanı kriterleri

	1990 NIH Tanı Kriterleri	2003 Rotterdam Yeniden Gözden Geçirilmiş Tanı Kriterleri*
1.	Kronik anovülasyon	Oligo-anovülasyon
2.	Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ve diğer etyolojik nedenlerin ekarte edilmesi.	Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
3.		Polikistik overler ve diğer etiyolojik nedenlerin ekarte edilmesi

*Tanı için üç kriterden ikisinin bulunması gerekmektedir.

2. 2. 1. Polikistik Over Sendromunda Klinik ve Laboratuvar Bulguları

Polikistik over sendromu, genellikle peripubertal dönemden itibaren başlayan menstrüel düzensizlikler (oligo-amenore, disfonksiyonel uterus kanaması), hiperandrojenizm bulguları (hirsütizm, akne, ciltte yağlanma, androjenik alopesi) ve erişkin kadınlarda endokrin kökenli infertilitenin en sık nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Tablo 2) (22).

Polikistik over sendromunda en sık görülen hiperandrojenizm bulgusu hirsütizmdir. Hirsütizm modifiye Ferriman-Gallwey metodu ile değerlendirilir (23). Bu metot ile üst dudak, çene, göğüs bölgesi, sırtın alt ve üst kısımları, alt ve üst abdomen, kol ve bacakların üst kısımları olmak üzere toplam dokuz alanda kıl dağılımı 0-4 arasında skorlandırılarak toplam Ferriman-Gallwey skoru ≥ 6 hirsütizm olarak tanımlanır. Akne, ciltte yağlanma ve androjenik alopesi de hiperandrojenizme bağlı olarak karşımıza çıkabilmektedir, ancak tanı için bu klinik bulguların olması şart değildir. Ayrıca, etnik özellikler ve bireysel farklılıklara bağlı olarak her hastada hirsütizm bulunmayabileceği de unutulmamalıdır (24, 25).

Polikistik over sendromunda obezite görülme sıklığı % 40-60 olarak bildirilmektedir (19, 22). Toplumda genel obezite prevalansına bağlı olarak farklı ülkelerdeki PKOS hastalarında obezite prevalansı farklılık gösterebilir. Obezite sıklıkla bel/kalça oranının arttığı santral obezite tipinde olup, PKOS'lu hastalara ek riskler getirmektedir (26). Normal vücut ağırlığına sahip PKOS hastalarında da ağırlık yönünden eşleştirilmiş sağlıklı kontrollere göre bel/kalça oranı artmıştır (27).

Klinik bulguların PKOS düşündürdüğü olgularda tanı biyokimyasal ve ultrasonografik bulgularla desteklenebilir. Hastaların laboratuvar incelemesinde over ve adrenal kökenli androjenik hormonlarda artışla karakterize hiperandrojenemi gözlenir. Ayrıca, LH düzeylerinde ve LH/FSH oranında artış olabilir. Yaklaşık % 25-60 olguda hiperinsülinemi ve insülin direnci saptanabilir (28, 29).

Polikistik over sendromlu hastaların ultrasonografik görüntülemesinde 2-9 mm çaplı, 12 veya daha fazla follikül olması ve/veya artmış over volümü (>10 ml) polikistik over olarak tanımlanır (21). Bu bulgunun tek overde olması yeterlidir. Polikistik over değerlendirmesinde folliküllerin dağılımı dikkate alınmaz. Oral kontraseptif ilaç kullanımı over morfolojisini etkileyebilir. Ayrıca, multifoliküler over hipogonadotropik hipogonadizmden normal döneme geçmekte olan hastalarda overde spontan folliküler aktiviteye ya da ovülasyon indüksiyonu ile over stimülasyonuna bağlı olarak gelişebilmektedir. Ultrasonografik polikistik over görüntüsü, sağlıklı kadınlarda da % 20'lere varan oranlarda bulunabilir (30).

Polikistik over sendromu tanısı koyabilmek için benzer kliniğe neden olabilecek hastalıkların ekarte edilmesi gerekir. Ayırıcı tanıda menstrüel düzensizlikler ve hirsütizme neden olabilecek hipofiz ve adrenal bez hastalıkları, hiperandrojenizme neden olan hastalıklar bulunmaktadır. Bazı ilaçların kullanımı hiperandrojenizme ya da hiperandrojenemik değişikliklere yol açabilir (androjenler, progestajen ajanlar, steroidler, fenitoin gibi). Androjen salgılayan tümörler ayırıcı tanıda düşünülmelidir; hızlı gelişen hirsütizm, virilizan bulgular, neoplastik bir etiyoloji için uyarıcı olabilir. Testosteronun > 200 ng/dL, dihidroepiandrostenedion sülfat (DHEAS)'nin > 7,000 ng/ml olması adrenal/over tümörünü düşündürmelidir. Geç başlangıçlı klasik olmayan konjenital adrenal hiperplazi, 17 (OH) progesteron düzeyinin erken folliküler fazda < 3 ng/ml olması ile ekarte edilebilmektedir. Bu değer üzerindeki olgularda adrenokortikotropik hormon (ACTH) uyarısı ile ölçülen 17 (OH) progesteron seviyesinin > 10 ng/mL olması 21-hidroksilaz eksikliğinin tanısını koydurur. Cushing sendromunu düşündüren klinik bulguların varlığında, 24 saatlik idrarda serbest kortizol düzeyinin ölçülmesi tarama için kullanılabilir. Prolaktin ile ilgili bozukluklar ve tiroid hastalıkları da ayırıcı tanıda düşünülmesi gereken durumlardır. Polikistik over sendromunda % 30'a varan oranlarda hafif-orta düzeylerde prolaktin yüksekliği görülebilir. Tiroid hastalıklarında menstrüel düzensizlikler görülebilir, ancak çoğu zaman hastalıkla ilişkili diğer semptom ve bulgular tanıya olanak sağlar.

Tablo 2. Polikistik over sendromunun belirti ve bulguları *

Belirti ve Bulgular	%
Hirşutizm	% 60-90
Oligomenore	% 50-90
İnfertilite	% 55-75
Polikistik over	% 50-75
Obezite	% 40-60
Amenore	% 25-50
Akne	% 25
Disfonksiyonel uterus kanaması	% 30
Normal menstrüel patern	% 22

* Goldzieher 'dan (1961) uyarlanmıştır (22).

2. 2. 2. Polikistik Over Sendromunun Etiyopatogenezi ve İnfertilite

Kadın infertilitesine sebep olan parametreler arasında polikistik over sendromu ayrı bir yer teşkil etmektedir. Adet düzensizlikleri ve infertilitenin altında yatan sebep bu sendromun temel bileşeni olan kronik anovülasyondur (31, 32). Polikistik over sendromu anovülatuar infertilitenin en sık görülen sebebidir. Etiyoloji kesin olarak bilinmemekle birlikte PKOS, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkmış sık görülen ve kompleks bir hastalık olarak değerlendirilebilir. Sendromun fizyopatolojisinde gonadotropin dinamiğinde değişiklikler, steroidogenez defektleri, insülin salınım ve etki bozuklukları beraberinde genetik faktörler ön plana çıkmaktadır.

2. 2. 2. 1. Gonadotropin Sekresyon Defektleri

Polikistik over sendromunda hipotalamus-hipofiz-over aksının fonksiyonunda bozukluklar tanımlanmıştır. Lüteinizan salınımın şiddeti ve frekansı ile ortalama serum LH konsantrasyonu artmış olarak tespit edilmektedir. Bu değişikliklere GnRH salgı sıklığının artışı, GnRH'ye yanıt artışı ve yüksek östrojen düzeylerinin neden olduğu düşünülmektedir (33). Polikistik

over sendromlu hastalarda LH'nin aksine hipofizer FSH sekresyonu erken folliküler fazda belirgin olarak düşük tespit edilmektedir (34). Düşük FSH düzeyinin nedeni tam olarak anlaşılammakla beraber kronik karşılanmamış östrojenin negatif geribildirim etkisi ile artmış GnRH salgısının, LH beta gen ekspresyonuna FSH beta gen ekspresyonuna göre daha fazla artırması patogeneizde rol oynadığı düşünülen iki mekanizmadır (35, 36).

2. 2. 2. 2 . Steroidogenez Değişiklikleri

Polikistik over sendromunda over/adrenal bez steroidogenezinde pek çok değişiklik bulunmuştur. Artmış LH düzeyi overlerde cAMP artışı ile steroidogenez androjenlerin üretimi yönünde etkiler ki bu da follikül gelişiminde duraklama ile sonuçlanır. Klinik olarak GnRH agonistlerinin PKOS'lu hastalarda kullanılması ile normal kadınlara göre teka hücrelerinde artmış androstenedion ve 17 (OH) progesteron saptanması bu hücrelerde de novo steroidogenez farklılığını (sitokrom P450c17 gen overekspresyonu) düşündürmektedir. Bu sistemi LH'nin selektif olarak etkiliyor olması da olasıdır (37). Teka hücrelerinde insülin, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), insülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF-2) reseptörleri bulunmaktadır ve bu reseptörlerin uyarılmasının over androjen üretiminde etkileri olduğu saptanmıştır (38). İnsülinin etkisi tam olarak bilinmemekle beraber hiperinsülineminin düzeltilmesi ile LH'de değişiklik olmaksızın serum androjen düzeylerinde azalma gösterilmiştir. Polikistik over sendromlu hastaların % 20-50'sinde artmış dihidroepiandrostenedion sülfat (DHEAS) ve 11 β (OH) androstenedion seviyeleri adrenal bezin artmış androjen üretimini göstermektedir (39). Ancak adrenokortikotropik hormon (ACTH) seviyeleri sağlıklı kadınlardakine benzer düzeylerde tespit edildiğinden, farklılığın ACTH'ye yanıtta kaynaklanabileceği ya da ACTH dışı faktörler ile adrenal bezin uyarıldığı düşünülmektedir. Polikistik over sendromunda DHEAS düzeyleri, bazal ve ACTH uyarısına artmış adrenal androjen sekresyon yanıtında genetik faktörler önemlidir (40). Adrenal de artmış androjen sentezinin PKOS patogeneizindeki yeri tam olarak bilinmemektedir.

2. 2. 2. 3. İnsülin Salınım ve Etki Bozuklukları

İnsülin direnci ve beraberinde kompensatuar hiperinsülinemi hem zayıf hem de obez PKOS hastalarında sık görülen bir bulgudur (28). Polikistik over sendromunda insülin direncinin değerlendirilmesinde çalışılan popülasyonun özellikleri ve kullanılan insülin direnci ölçüm metotları sonuçlar üzerinde önemli etkiye sahiptir (41). Sendromda insülin etki anormalliklerinin mekanizması net olarak bilinmemektedir (42). İlk kez 1980 yılında Burghen ve arkadaşları tarafından obez PKOS'lu hastalarda hiperandrojenizm ve hiperinsülineminin pozitif lineer korelasyonunun bulunmasının ardından birçok çalışmada zayıf ve obez PKOS hastalarında insülin direnci gösterilmiştir (43), ancak ne obezite ne de tek başına androjen fazlalığı PKOS'ta görülen insülin etki bozukluğunu açıklamamaktadır (42, 43). Ayrıca, her PKOS hastasında insülin direnci olmadığı gibi, insülin direnci ölçümü PKOS tanı kriterleri arasında da yer almaz (41). Polikistik over sendromunda insülin direnci ve hiperinsülinemi overde androjen sentezini ve ayrıca seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) düzeyinde azalmayla serbest testosteron düzeyini arttırmaktadır. İnsülin direncinin incelendiği bazı çalışmalarda, insülinin reseptöre bağlanması normal iken, insülin aracılı glukoz transportunun azalmış olduğu (artmış serin fosforilasyonuna bağlı postreseptör defekt) saptanmıştır (42).

2. 2. 2. 4. Genetik Faktörler

Polikistik over sendromu hastalarında ailesel kümelenmenin olması genetik özelliklerin araştırılmasına neden olmuştur (44). Genetik faktörler sendromun gerek reproduktif gerekse metabolik fenotiplerinin gelişmesinde önemli katkıda bulunmaktadır. Polikistik over sendromlu hastaların anne ve kız kardeşlerinde hiperandrojenizm ve menstrüel disfonksiyonun artmış sıklıkta bulunmasının yanısıra, baba ve erkek kardeşlerde de serum androjen düzeyleri artmış gibi görünmektedir (45). Ayrıca, tüm birinci derece yakınlarda insülin direnci ve değişik derecelerde glukoz homeostaz bozukluklarının görülme riski, yaş ve beden kitle indeksi (BKİ) eşleştirilmiş sağlıklı kontrollere göre artmıştır (45). Polikistik over sendromu gelişiminde rol oynayabilecek olası genetik

defektlerin incelendiği değişik çalışmalar sendromun kompleks, poligenik bir bozukluk olduğunu göstermektedir (46).

2.3. Oositlerin Büyüme, Gelişim ve Olgunlaşması

In-vivo veya *in-vitro* fertilizasyonun gerçekleşip embriyoner gelişimin devam edebilmesi için oositlerin olgunlaşma süreçlerini tamamlamış olmaları gerekir. Oositler ovaryumlarda, folliküller içindeki büyüme ve gelişimleri fizyolojik, metabolik ve genetik değişimlerin bütünü olarak kabul edilir. Bu gelişimlerin sonucunda oositler fertilize olabilir, ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar, polispermiye karşı koyacak özellikleri kazanır ve embriyoner gelişime devam eder.

Oogenez dışında ovaryumlarda, folliküller içinde tamamlanır. Ovaryumlar dışta folliküllerin yer aldığı korteks ile içte kan damarlarından zengin, gevşek bağ dokusundan oluşan medülladan meydana gelir. Korteks ile medulla arasında belirgin bir sınır yoktur. Ovaryumlardaki oogonyumlar insanda, fetal yaşamın birinci ayından itibaren kortekse yerleşerek mitoz ile bölünmeye başlarlar. Bu dönemde oositlerin bir bölümü birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerek primer oosit adını alır. Diğer bir grup oogonyum ise gelişme göstermez ve dejenere olur. Primer oositler tek katlı yassı hücrelerle (follikül hücreleri) çevrili olarak primordial folliküllerde bulunurlar. Oogonyumların bir yandan mitotik aktivite göstererek çoğalmaları, diğer yandan atreziye gitmeleri bir denge içinde süregelir ve yeni doğan bir kız çocuğunun her iki ovaryumunda yaklaşık 400.000 follikül bulunur. Oositlerin içinde büyüme ve gelişimini sürdürdüğü folliküller ve çevresindeki bağ dokusu da oositin büyüme ve gelişimine katılarak farklanır. Bütün bu olaylar hipofizer hormonların kontrolü altında gerçekleşir. Primordial folikülleri çevreleyen tek katlı yassı follikül hücreleri oositin büyümeye başlamasıyla birlikte çoğalarak granüloza hücreleri adını alır. Folliküllerde antrum şekillendiğinde ise bir grup granüloza hücresi oosit çevresine yerleşerek kumulus (kumulus ooforus) ve korona hücreleri (korona radiata) olarak isimlendirilir. Folliküllerin çevresindeki bağ dokusu da farklanarak önce tek bir tabaka halinde teka'yı oluşturur ve bir

süre sonra da teka interna ve eksterna olarak özelleşir. Teka internadaki hücreler salgılama işlevleriyle oosit matürasyonuna katkıda bulunurlar. Ovulasyonla atılacak oositin içinde geliştiği folliküller tersiyer follikül (Graff follikülü) olarak isimlendirilir. Oositlerin fertilizasyon ve gelişime katkıları ancak hücresel özelliklerinin değerlendirilmesiyle açıklanabilir. Oositlerin büyümesi sırasında gelişen bazı organellerin yanı sıra bazıları da yeniden organize olarak oositin işlevine uygun özellik kazanırlar. Büyüme döneminden itibaren oositler aktif olarak salgılama yaparken bir yandan da embriyoner gelişim için gerekli maddeleri depolarlar. (47)

2.3.1. Oosit Matürasyonu

Matürasyon, oogenezin büyüme ve gelişimi izleyen üçüncü evresidir. Çeşitli sitoplazmik özelliklerin değişmesi, oositin ovulasyon ve fertilizasyona hazırlanmasıyla karakteristiktir. Bu anlamda matürasyon sürecinde oosit çekirdeği ve sitoplazmasında bazı değişiklikler meydana gelir, mayoz bölünme ilerler, oosit hücre membranının yapısı ve özellikleri değişir.

Oosit büyüme döneminde büyük bir yapı olarak gözlenen germinal vezikül (GV) birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde ortaya çıkar. Matürasyon sürecince ilk belirti germinal vezikül membranının yıkılması ve çekirdek içeriğiyle sitoplazmanın karışmasıdır. Böylece kromozomlar sitoplazmaya geçer ve buradan oositin periferine doğru hareket ederek mitoz mekiğini oluşturur. Oosit matürasyonu sırasında birinci mayoz bölünme ve fertilizasyondan sonra ikinci mayoz bölünmenin tamamlanması perivitellin aralığa yerleşen 1. ve 2. kutup cisimciklerinin şekillenmesiyle kesinlik kazanır. Bu nedenle oosit matürasyonu irdelenirken 1. kutup cisimciğinin varlığı ve fertilizasyon değerlendirilirken de 2. kutup cisimciğinin bulunması sözü edilen gelişmelerin gerçekleştiğini ortaya çıkarması açısından önemlidir.

Birinci mayoz bölünme sırasında kromozomların şekillendiği bölgede sitoplazma plazma membranıyla çevrili olarak bir çıkıntı meydana gelir. Anafaz I döneminde sitoplazmanın periferindeki kromozomlar bu sitoplazmik çıkıntıya doğru hareket ederler. Birinci kutup cisimciğinin temelini oluşturan bu

sitoplazmik çıkıntını tabanında, her iki yanında ince çentikler oluşur. Zamanla bu çentiklerin derinliğinin artmasıyla birlikte periferal aster ve kromozomlar da sitoplazmik çıkıntı içine tamamıyla yerleşirler. Sitoplazmik çıkıntının iki yanındaki yarıklanmanın ilerlemesi sonuçta birbiriyle birleşmesi sonucu 1. kutup cisimciği sitoplazmadan ayrılır. Bu olayın tamamlanmasında sitoplazmik çıkıntının tabanına yerleşik mikrofilamanlar da etkilidir. İnsan oositlerinde kutup cisimciği olarak farklanacak bu sitoplazmik çıkıntının tabanında yoğun bir aktin birikiminin bulunduğu gözlenmiştir.

Çeşitli omurgasız ve memelilerde 1. kutup cisimciği minyatür bir hücre olarak tanımlanmıştır. Birinci kutup cisimciğinin en belirgin özelliği kompakt bir kromatin kitlesi içermesine karşın bunu çevreleyen bir zarın olmayışıdır. Memelilerde ve çalışılan diğer birçok türde 1. kutup cisimciği kortikal granüllerle birlikte bir miktar endoplazmik retikulum ve mitokondrium içerebilir. Bazı türlerde ise 1. kutup cisimciği sentriol ve Golgi birleşimini de içerebileceği gibi bazılarında da gelişmenin ilerleyen dönemlerinde elektron-opak bir görünüm kazanabilir. Bu görünüm kutup cisimciğinin nekroze olmaya başladığını gösterir. Kutup cisimciği şekillendikten sonra oosit (veya zigot) sitoplazmasında kalan kromozomlar ikinci mayoz iğciğinin etrafında yeniden düzenlenirler. Bu olay telofaz ve profaz arasındaki evrede gerçekleşir. Anafaz II de kromozomların hareketi ve iğciğin uzaması da anafaz I deki gibidir. İkinci kutup cisimciğinin oluşumu da diğerine benzer şekilde gerçekleşir. İnsanda 2. kutup cisimciğinde endoplazmik retikulum, mitokondrium ve beslenme materyali daha fazladır. İnsan, sıçan ve hamsterlerde 2. kutup cisimciğinin kortikal granül içermemesi bu yapının sayılan türlerde kortikal granül reaksiyonundan sonra şekillendiğini gösterir. Birinci mayoz bölünme sonunda meydana gelen hücrelerin hacmi birbirinden farklıdır. Birinci kutup cisimciği sitoplazmanın çok az bir bölümüne sahip olarak perivitellin aralığa yerleşir. Birinci mayoz bölünmeyi tamamlayan oosit ise bölünme geçirmemiş oositle hemen hemen aynı büyüklüktedir. Bu hücre ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresine geçer ve insanda ancak spermin sitoplazmaya penetrasyonundan sonra ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar.

In-vitro fertilizasyon tekniklerinde ovulasyon indüksiyonu protokollerinin uygulanmasıyla elde edilen insan oositlerinin tümü aynı matürasyon evresinde olmayabilir. Klasik İVF'de oositlerin matürasyonu kumulus-korona hücrelerinin özelliklerine göre yapılır. Ancak bu kriterlerle oosit matürasyonu konusunda her zaman doğru bir saptama yapmak mümkün değildir. Örneğin fertilize olmayan oositlerin reinseminasyondan sonra fertilize olmaları, bu hücrelerin ilk insemine edildikleri dönemde matür olmadığını, geçen süre içinde matürasyonunun tamamladığını gösterir. Klasik İVF'den farklı olarak İCSİ uygulamalarında oositlerin matürasyon ve sitoplazmik özellikleri daha ayrıntılı bir şekilde değerlendirilebilir. Mikroenjeksiyon yapılacağı sırada immatür (Met I veya GV) olarak ayrılan oositler kültüre edildiğinde matürasyonlarını tamamlayarak enjekte edilebilecek özelliklere sahip olabilirler. Doğal olarak Met I evresindeki oositler GV olarak nitelendirilenlere göre daha kısa sürede olgunlaşırlar.

Oosit matürasyonunun mekanizmasına genel bir tanımlama getirmenin güç olmasına karşın mayoz bölünmenin devam edebilmesinin intrasellüler Ca^{++} nın tetiklenmesiyle gerçekleştiği bilinmektedir. Oosit sitoplazmasındaki Matürasyonu İlerleten Faktörle (MPF) Mannanoligosakkaritler (MOS) protein kinazın (ki bu da sitostatik faktörün en önemli komponentidir) profaz I evresinde düşük olduğu ve oosit matürasyonu sürecinde artarak metafaz II evresinde en yüksek düzeye ulaştığı bilinir (47).

2. 4. Yardımla Üreme Tekniklerinde Kriyopreservasyon Uygulamaları

Kriyoprezervasyon işleminde kullanılan yöntemleri geleneksel yavaş dondurma, hızlı dondurma ve vitrifikasyon olmak üzere üç grupta incelemek mümkündür (48-51). Başlangıçta embriyoların dondurulmasında yavaş ya da kademeli soğutmayı gerektiren yavaş dondurma yöntemi kullanılmıştır (52-54). Geleneksel bir yöntem olan yavaş dondurmada, embriyoların dondurulması için çok pahalı ve komplike cihazlara gereksinim vardır. Hızlı dondurma işleminde ise, en az iki farklı kriyoprotektan madde ve yüksek donma hızları kullanılır. Yapılan çalışmalar sonucunda, 1985 yılında vitrifikasyon denilen yeni bir

kriyopreservasyon yöntemi geliştirilmiştir (55). Bahsedilen bu iki yöntem (hızlı dondurma ve vitrifikasyon) sayesinde yavaş dondurma yönteminde gerekli olan pahalı ve komplike cihazlara olan gereksinim ortadan kalkmıştır. Son yıllarda, embriyoların dondurulma işleminde vitrifikasyon yöntemi oldukça yaygın biçimde kullanılmaktadır. Vitrifikasyonda, buz kristallerinin hiç şekillenmediği vitröz ya da camsı bir durum yaratılarak, hücrelerin direkt olarak sıvı azot içerisine daldırılmasıyla dondurulmaları sağlanmaktadır.

Donma ve çözme işlemlerinde hücrelerin zarar görmesini önlemek amacıyla, dondurma ve çözündürme çözeltileri içerisine kriyoprotektan diye adlandırılan çeşitli maddeler katılmaktadır. Günümüzde uygulanan dondurma yöntemlerinde çeşitli kriyoprotektanlar ile yavaş veya hızlı soğutma ve çözme (ısıtma) yöntemleri kullanılmaktadır (56). Uygulanmakta olan tüm dondurma yöntemlerindeki temel prensip, donma ve çözünme sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek, hücrelerin buz kristallerinden görecekları zararı önlemektir (57). Bunu sağlamak amacıyla hücre içi sıvısının, hücre membranından geçebilen başka bir deyişle nüfuz edebilen ve hücrelere olabildiğince zararsız olan kriyoprotektan maddelerle yer değiştirmesi hedeflenmektedir.

2. 4. 1. Kriyoprezervasyon İşleminde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kriyoprotektanlar dondurma ve çözündürme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır (50). Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm esnasında dekrizalizasyona ve gelişen membransel destabilizasyona karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılır. Hücre, dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkübasyona tabi tutularak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır (50, 55). Hücre dondurma medyumundaki

kriyoprotektanların toksisitesini azaltmak için, hücrelerin kriyoprotektanlara maruz kalma süresinin kısaltılması ve hücre içine nüfus etme özelliği olmayan kriyoprotektanların kullanımı gibi uygulamalar yapılmaktadır (58, 59). Bunun yanı sıra, kriyoprotektanlar hücreler yüksek konsantrasyonda tuz ile çevrildiğinde hücreleri yoğun dehidrasyonun şekillendiği dönemde korumaktadırlar (50, 56).

Kriyoprotektan maddeleri, hücre membranından nüfus edilebilme özelliklerine göre iki ayrı grupta inceleyebiliriz;

- Hücre membranından geçebilen, yani hücre içerisine nüfus edebilen kriyoprotektanlar.
- Hücre membranından geçemeyen, yani hücre içerisine nüfus edemeyen kriyoprotektanlar.

2.4.1.1. Hücre İçine Nüfus Edebilen Kriyoprotektanlar

Hücre içerisine nüfus edebilen kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahiptirler ve dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol (GL), etilen glikol (EG), 1.2 propanediol (PrOH), 2.3 bütanediol, propilen glikol (PGL) ve diğer bazı alkollerini kapsamaktadır (50, 56, 60)

Gliserol, yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir poliol bileşiğidir. Gliserol kendi hidroksil grubu ile su molekülündeki mevcut oksijen arasında hidrojen bağı şekillendirmektedir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması onun gametler üzerine olan etkisini artırmaktadır. Gliserolün toksisitesi, metabolik dönüşümünde oluşan metilglioksal tarafından oluşturulur. Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açmasıyla kendini göstermektedir (61-63).

Etilen glikol, yüksek geçirgenliği ve düşük sitotoksitesini nedeniyle insan oosit ve embriyolarının vitrifikasyonunda en çok kullanılan kriyoprotektandır (64-66). Birçok türün gametlerinin donma-çözünme esnasında oluşan zarara karşı etilen glikol, gliserolle eşit oranda etki sağlamaktadır.

Amid türevi kriyoprotektanlar, formamid, dimetilasetamid (DMA vb.) özellikle aygır sperminin dondurulmasında gliserole göre daha iyi koruma sağlamakta ve daha az kontraseptif özellik göstermektedir. Sulandırıcılara % 3.5-5 oranında katılması, donma zararına karşı etkili olmakta, çözüm sonu parametrelerde iyileşme sağlamaktadır.

Dimetil sülfoksit, kimyasal olarak bir polar kök etrafında iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. Bu özellik ona hem sıvı hem de organik medyumlarda çözünme imkanı sağlamaktadır. Dimetil sülfoksit'in oksijeni ise, suyun protonları ile birleşmekte ve bunun sonucunda da ısı açığa çıkmaktadır. Eskiden hücre üzerine toksik etkilerinin olduğu bilinsede yeni çalışmalar bunun tersine sonuçlanmıştır (67). Araştırmacılar kullanılan kriyoprotektanın MII döneminde dondurulan sığır oositlerinde gelişimsel kapasiteyi etkileyen faktörlerden birisi olduğunu belirtmektedirler. Bu amaçla PROH'un, GL ve DMSO'ya göre daha etkili olduğu ileri sürülmektedir (68).

Hücre içerisine nüfuz edebilen bu maddeler, suya bağlanabilme özelliğindedir ve diğer bileşenlerin yüksek konsantrasyonlarından kaynaklanan toksik etkileri azaltırlar. Bu gruptaki kriyoprotektanların çoğu yüksek oranda suda çözünebilme yeteneğine ve ısı etkisine sahiptir. Bu nedenle bu niteliklere sahip kriyoprotektanlar suyun hidrojen bağlarını kopararak, suyun yapısını değiştirirler. Aynı zamanda, bu grupta yer alan kriyoprotektanlar su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilmektedirler.

2.4.1.2. Hücre İçine Nüfuz Edemeyen Kriyoprotektanlar

Bu grup kriyoprotektanlar kendi aralarında iki ayrı gruba ayrılabilir. Bunlar; hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı (glikoz, sükroz, trehaloz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı sakkaritler) ve yüksek molekül ağırlıklı polimer karakterli (polivinil alkol (PVA), polivinil pirrolidon (PVP) ve diğer bazı polimerler) kriyoprotektanlardır (50, 69).

Hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar donma işlemi süresince şekillenen buz kristalleri oluşumunu azaltan etkilerini, soğutmadan önce hücreleri dehidre ederek gösterirler. Şekerler donma ve

çözünme esnasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak koruma sağlamakta ve çözüm işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (70, 71). Bunlar ayrıca, hücrede donma-çözünme esnasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Sulandırıcıya ilavelerinde düşük oranda hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektan kullanılmakta, hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanların olası toksik etkilerini azaltmaktadır (72, 73).

Hücre içine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar ise, hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi sırasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak biçimde değiştirerek etkilerini gösterirler (50). Bunlardan başka, albumin (74), fikol (75), ve antifriz protein (AFP) (76) gibi bazı proteinler de hücre içerisine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar içerisinde yer almaktadırlar.

2.4.2. Kriyoprezervasyon Uygulamalarında Kullanılan Yöntemler

2.4.2.1. Konvansiyonel Yavaş Dondurma

Bu yöntemle embriyoların dondurulmasında değişik aşamalar mevcut olup, bunlar sırasıyla şu şekilde özetlenebilir:

- Embriyoların GL, EG, DMSO ya da PGL gibi hücre içine nüfuz edebilen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlardan birisinin değişik molar konsantrasyonlarındaki çözeltisine, kriyoprotektan çözeltisi ve embriyo arasında ozmotik dengeyi (ekilibrasyonu) sağlamak amacıyla, genellikle oda ısısında bazen daha düşük sıcaklıklarda maruz bırakılmaları,
- Buz kristallerinin oluşumunun -5 °C ile -6 °C'ler arasında başlatılması,
- Kontrollü bir biçimde embriyo dondurma cihazı aracılığıyla -30 °C ile -70 °C arasındaki bir sıcaklığa ulaşınca kadar kademeli yavaş soğutma (-0.2 -2.0 °C/dakika),

- İstenilen sıcaklığa ulaşıldığında, sıvı azot (-196 °C) içerisine daldırma ve saklama,
- Yaklaşık olarak dakikada 250 °C olacak şekilde kontrollü çözündürme (bu işlem karıştırılmayan 25 °C'lik su banyosunda kolaylıkla gerçekleştirilebilir),
- Embriyoların kültüre alınması ya da taşıyıcılara transferlerinden önce kriyoprotektanın uzaklaştırılması.

Belirtilen aşamaların her biri, başarılı bir embriyo kriyoprezervasyon işlemi için özel öneme sahiptir (50, 77). Hücre içine nüfuz edebilen bu kriyoprotektanlar, donma ve çözünme sürecinde hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek hücre yapısını korurlar (50). Donmaya karşı tolerans gösteren hayvanlarda hücre içi içerik, toksik olmayan ve hücre içine nüfuz edebilen kriyoprotektanın yüksek konsantrasyonlarında dengelendiği ve sıcaklığın 0 °C'nin altına düştüğü durumlarda buz kristallerinin gelişimi, spesifik buz çekirdeklerini oluşturan proteinlerce başlatılır. Buz kristallerinin oluşumunun başlatılması ani ve hızlı soğumayla birlikte kendiliğinden ve kontrolsüz biçimde buz çekirdeklenmesinin şekillendiği dönemde hızlı dondurmanın zararlı etkilerini önler (75). Buz kristallerinin oluşumu başladığında, küçük buz kristallerinde daha büyük kristallere dönüşüm yönünde bir eğilim şekillenir ki; hücreler için ölümcül etkiye sahip bu durumun önlenmesi yavaş soğutma oranlarının (dakikada -2 °C'den daha az) uygulanmasıyla sağlanmaktadır. Böylece, dondurma işlemi süresince hücrelerin dehidre olmaları sağlanır.

2.4.2.2. Hızlı Dondurma

Hızlı dondurma, yüksek donma hızlarının (dakikada yaklaşık -1200 - 1250 °C) uygulanmasından önce hücrelerin kısmen dehidre edildiği dondurma işlemi tanımlamak için kullanılır. Bu yöntemle başarılı bir sonuç almak için GL, PrOH, DMSO ya da EG gibi hücre içine nüfuz edebilen kriyoprotektanlardan birisinin 2 ile 4.5 M'lık ve sükroz, trehaloz, laktoz ya da galaktoz gibi hücre içine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlardan birisinin 0.25 M

ile 0.5 M'lık karışımlarından oluşan dondurma çözeltilerinin kullanılması gerekmektedir (79, 80). Otuz saniye ile 3 dakika arasında kısa bir ekilibrazyondan sonra, embriyolar (hücreler) kısmen dehidre bir duruma geçerler ve bu aşamada embriyolar sıvı azot buharında çok kısa bir süre tutulup sonra sıvı azot içerisine daldırılır.

2.4.2.3. Vitrifikasyon

Vitrifikasyon, hücrelerin, dokuların ve organların düşük sıcaklıklarda hücre içerisinde tamamıyla vitröz ya da camsı bir durumun yaratılmasıyla dondurulmasını ifade eden bir terim olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde buz kristalleri hiç şekillenmemektedir. Vitrifikasyon tekniğinde hücre canlılığı, konsantrasyonu yüksek kriyoprotektanlar yardımıyla ani ısı düşüşüyle birlikte hücre etrafında cam bir katı yüzey oluşturularak korunmaya çalışılır. Vitrifikasyon tekniğinde sıcaklığın ani düşürülmesi çok önemlidir. Bunun başlıca iki nedeni bulunmaktadır;

- Soğutma hızı yüksek olursa, vitrifikasyon için gereken kriyoprotektan miktarı azalmakta, böylece toksik hasar riski düşmektedir.
- Aynı şekilde, soğuğa duyarlı olan biyolojik yapıların zarar gördüğü, sıcaklık dereceleri (-5 -15 °C arası) hızla geçilebilmektedir.

Başarılı bir vitrifikasyon için, viskozitede çok yoğun bir artış gerekmektedir. Bunun için ya yüksek soğutma oranları ya da düşük sıcaklık derecelerinde viskoziteyi artıran ve buz kristallerinin oluşumunu baskılayan kriyoprotektan çözeltilerin kullanımı gerekir (81). Vitrifikasyon tekniğinde yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanların kullanımıyla dondurulacak hücre ultra hızlı bir şekilde (>-10.000 °C/dk) geçilerek cam şeklinde katılaşıp dondurulur. Vitrifikasyonda kriyoprotektanların dondurma işleminde buz oluşumunu baskılamaları en önemli unsurdur ve sıcaklık düşüştükçe, çözelti tümüyle viskoz bir hal alarak sonunda camsı bir faza geçmektedir. Farklı kriyoprotektanların suyla oluşturulan çözeltilerinin camsı faz oluşturabilme

özelliklerinin değişken olduğu gösterilmiştir. Bunun da nedeninin, her bir kriyoprotektanın vitrifikasyonun gelişmesine yardımcı olmada ya da donmaya olan eğilimi azaltmada, su molekülleri ile olan etkileşimlerindeki farklılık olduğu bildirilmiştir (50, 82).

Embriyoların vitrifikasyonu ilk olarak 0.25 ml'lik payetlerde yapılmışken, daha sonraları yüksek termal ileticiliği olan cam (83) mikropipetlerde (GMP), open pulled (84) payetlerde (OPS) ve son yıllarda gel loading (85) tip (GL-tip), kriyoloop ya da kriyotoplar (86) içerisinde mikrodamlalarda dondurulmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3. 1. Hasta Seçimi

Schleswig-Holstein Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran ve PKOS tanısı konulan, 25-41 yaş arası, yaş ortalaması 31,2 ($\pm 3,8$) olan, 37 kadın hasta çalışma kapsamına alındı. Çalışma kapsamındaki 37 hastaya 47 İVM siklusu uygulanıp immatür oositler toplandı. İmmatür oositler *in-vitro* matürasyonu sağlandıktan sonra İCSI programına aktarıldı. Fertilize olan oositlerin vitrifikasyon yöntemiyle kriyopreservasyonu sağlandı. Transfer işleminden bir gün önce çözölen zigotlar bir gün kültür ortamında bekletildikten sonra Kriyo-ET programına aktarıldı.

Hastalar, çalışmanın amacı ve prosedürü konusunda tamamen bilgilendirildi ve çalışma için yazılı onayları alındı. Polikistik over sendromu tanı kriterleri olarak, 2003 yılında yapılan "Rotterdam PKOS Fikir Birliği Semineri" (21) inde yeniden gözden geçirilen tanı kriterleri kullanıldı. Bu tanı kriterleri;

- Oligo-anovülasyon,
- Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları,
- Polikistik overler ve diğer etyolojik nedenlerin ekarte edilmesi (Cushing Sendromu, Ovaryan Hipertekozis, Konjenital Adrenal Hiperplazi).

Polikistik over görüntüsü ve over morfolojisi tanı kriteri olarak, ultrasonografide en az tek bir overde, 2-9 mm çaplı, 12 veya daha fazla sayıda follikül olması ve/veya artmış ($> 10 \text{ cm}^3$) over volümü esas alındı (87). Hiperandrojenizm değerlendirilmesi için hirşutismus skorlaması (Farriman Galloway skorlaması) yapılmadı. Hiperandrojenizm belirlenmesinde serum total testosteron ($>2.6 \text{ nmol/l}$) ve serbest testosteron ($> 50 \text{ pmol/l}$) değerlerine bakıldı. Sperm parametreleri İCSI uygulaması için uygundu.

3. 2. Hastanın *In-Vitro* Matürasyon Programı İçin Klinik Olarak Hazırlanması

Oligoamenore ya da amenore olan hastalarda oral kontraseptif (Microgynon) ile progesteron çekilme kanaması sağlandı. Hasta menstrüel siklusun 3. günü vajinal ultrasonografi ile muayene edildi. Her iki ovaryumdaki folliküllerin sayısı ve büyüklüğü kaydedildi. Menstrüasyonun 3. günü başlanarak 3 gün süreyle 3 ampul (75 IU) rekombinant FSH (rFSH, Gonal-F, Serono) uygulandı. Hasta menstrüel siklusun 8. gününde folliküler gelişimden emin olmak için ikinci kez ultrasonografi ile muayene edildi. Folliküler ölçümde, dominant follikül büyüklüğü $\geq 10-12$ mm ve endometriyum kalınlığı $\geq 6-8$ mm olarak ölçüldü. *In-vitro* matürasyon siklusu uygulanması planlanan hastaya immatür oosit toplanmasından 36 saat önce subkutan olarak 10.000 IU insan koryonik gonadotropin (hCG, Choragon, Ferring) uygulandı.

3.3. İmmatür Oosit Toplama İşlemi

İmmatür oosit toplama işlemi genellikle menstrüel siklusun 9. ya da 10. günlerinde, hastaya hCG uygulamasından 36 saat sonra yapıldı. Oosit toplama işlemi vajinal ultrasonografi eşliğinde 17G (1735G, Cook) aspirasyon iğnesi ile genel anestezi altında follikül aspirasyonu yapılarak toplandı. Aspirasyon pompasının basıncı 100 -120 mm Hg olarak ayarlandı. Follikül sıvısı yaklaşık 2-3 ml sıcak (37 °C) medyum (Flushing Media, Medicult, Denmark) içeren 14 ml'lik tüplere (Falcon 2001) alındı. Folliküler sıvı, kumulus-oosit kompleksi tayini için 70 µm filtreden (Falcon 2350) geçirildikten sonra stereomikroskop altında incelendi. Kumulus-oosit kompleksi sıcak (37 °C) medyum (Flushing Media, Medicult, Denmark) içeren petri kabına aktarıldı ve birkaç kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra kumulus-oosit kompleksi sıcak (37 °C) İVM medyum (Oocytes Maturation Medium, Sage, USA) içeren petri kabına aktarıldı. Bu kültür ortamına 75 IU FSH (Puregon, Organon) ve 50 IU hCG (Predalon, Organon) eklendi ve üzeri parafin yağı ile kapatılıp immatür oositlerin matürasyonu için 2 gün (48 saat) inkübatörde (37 °C % 5 CO₂) kültüre edildi. İki gün sonra kumulus hücreleri denude edilip oositlerin matürasyonu belirlendi.

Kumulus temizliği 1 dakika hyaluronidaz (İVF Hyaluronidase, Sage, Denmark) enziminde bekletilerek yapıldı ve daha sonra *in-vitro* matür hale getirilen oositler yıkanıp (Flushing Media, Medicult, Denmark) İCSİ işlemleri uygulandı. Matür oositlere İCSİ işlemleri uygulandıktan sonra 20 saat inkübatörde fertilize olmaları için kùltüre (Cleavage Medium, Sage, USA) edildi.

3. 4. Sperm Hazırlama ve İCSİ

İCSİ'nin yapılacağı petri kabı işlem uygulanmadan en az 1 saat önce hazırlanıp 37 °C'lik inkübatörde bekletildi. Meni İCSİ'nin yapılacağı gün toplandı. 37 °C 30 dakika likefiye olması beklendikten sonra yüzdürme (swim-up) methodu uygulanarak İCSİ işlemleri için hazır hale getirildi. İCSİ işlemlerinden sonra oositler kùltür medyumuna (Cleavage Medium, Sage, USA) transfer edildi ve inkübatörde 20 saat kùltüre edildi. İCSİ işlemlerinden 20 saat sonra oositlerin fertilize olup olmadığı kontrol edildi. Fertilize olan oositlerin vitrifikasyon yöntemi ile kriyopreservasyonu sağlandı.

3. 5. Vitrifikasyon ve Çözdürme Protokolleri

İCSİ sonrası fertilize olan oositler kriyopreservasyon uygulamasına aktarıldı. İCSİ işlemleri uygulanan oositler ertesi gün pronükleusların (2PN) belirmesiyle vitrifikasyon yöntemi ile donduruldu. Vitrifikasyon ve çözdürme işlemlerinde Kuwayama ve arkadaşlarının tanımladığı, Al-Hasani ve arkadaşları tarafından modifiye edilen vitrifikasyon methodu kullanıldı (88, 89). Zigotlar kùltür medyumundan alınıp, Ham's F-10 medyumuna (% 20 hasta serumu içeren) içinde % 7.5 etilen glikol (EG) (sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ve % 7.5 dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) bulunan ekilibrasyon medyumunda 8 dakika bekletildikten sonra alınarak, Ham's F-10 medyumuna (% 20 hasta serumu içeren) içinde % 15 etilen glikol (EG, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), % 15 dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ve 0.5 M sükröz bulunan vitrifikasyon medyumunda 1 dakika bekletildikten sonra kriyotop'a (Kitazato, Japan) yüklenip direkt olarak

sıvı nitrojene daldırıldı. Her kriyotop'a en fazla 2 zigot yüklendi. Vitrifikasyon işlemi oda sıcaklığında uygulandı.

Çözdürme işlemi için zigotlar Ham's F-10 medyumunu (% 20 hasta serumu içeren) ile hazırlanmış 1 M'lık sükröz çözeltisinde (37 °C) 1 dakika ve hemen sonrasında 0.5 M'lık sükröz çözeltisinde (oda sıcaklığında) 3 dakika bekletildikten sonra yıkanıp (Flushing Media, Medicult, Denmark), ertesi gün transfer edilmek üzere kültür medyumunu (Cleavage Medium, Sage, USA) içinde bir gün inkübe edildi.

3. 6. Embriyo Transferi İçin Endometriyum Hazırlama ve Embriyo Transferi

Endometriyumu embriyo transfer işlemine hazırlamak için, menstrüel siklusun 3. gününde, günde 3 kez 2 mg estradiol valerat (Progynova, Schering, Germany) tablet ile başlandı. Embriyo transferi için ideal endometriyal kalınlık 8 mm olarak ölçüldü. Embriyo transferinin yapılacağı gün dahil olmak üzere, transferi takip eden 48 saat süreyle intravajinal mikronize progesteron (günlük 50 mg, Crinone gel, Serono) uygulandı.

Embriyo transferi siklusun 15. gününde yumuşak transfer katateri (Cook, USA) ile gerçekleştirildi. Embriyo transferinden 15 gün sonra kanda beta hCG ölçümü ile eğer varsa gebelik saptandı.

4. BULGULAR

Tablo 3. Parametreler

Toplam Hasta Sayısı	37
Uygulanan iVM Siklus Sayısı	47
Elde Edilen Germinal Vezikül (GV) Sayısı	397
Dondurulmuş-Çözülmüş ET Yapılan Hasta Sayısı	18
Embriyon Transferi Siklus Sayısı	34
İn-Vitro Mature Olan Oosit sayısı (%)	201 (50.62)
Fertile olan Oosit sayısı (%)	102 (50.74)
Vitrifikasyon ile dondurulan zigot (2PN) sayısı	102
Çözülen Zigot (2PN) Sayısı	88
Çözme Sonrası Canlı Zigot Sayısı (%)	82 (93.18)
Çözülmemiş Zigot (2PN) Sayısı	14
Yarıklanmış (Klivaj) Embriyon Sayısı	68 (86.07)
Yarıklanmayan Zigot Sayısı	11
Dejenere Olan Zigot Sayısı	6
Diskarte Edilen Zigot Sayısı	3
Transfer Edilen Embriyon Sayısı	68
Transfer Başına Düşen Embriyon Sayısı	2
Pozitif hCG Testi Sayısı	4
İmplantasyon Oranı (%)	5.88
Gebelik Oranı (%)	11.76
Klinik Gebelik Sayısı (%)	3 (8.82)
Spontan Düşük Sayısı	1

Tablo 4. Dondurulmuş-Çözölmüş Embriyo Skorlaması

Derece	2hücre	3hücre	4hücre	5hücre	6hücre	8hücre	Toplam
I	3	3	8	1	1	1	17
II	16	3	7	1	1	1	29
III	9	6	7				22
Toplam	28	12	22	2	2	2	68

*Steer ve arkadaşları, 1992 (165).

Derece I; % 0 fragment, Derece II; <% 20 fragment, Derece III; < %50 fragment.

Bu çalışmada kullanılan parametreler ile başarılı implantasyon ve gebelik oranları tablo 3'te verilmiştir. Çalışmada klinik olarak PKOS tanısı konmuş 37 hastaya uygulanmış 47 İVM siklusunda 397 immatür oosit elde edilmiştir ve bunlardan 201 (% 50.62) tanesinin *in-vitro* matürasyonu sağlanmıştır. *In-vitro* matürasyonu sağlanan 201 oosit İCSİ siklusuna aktarılmıştır. Fertilize olan 102 (% 50.74) oosit vitrifikasyon ile dondurulmuştur. Çözölen 88 adet zigottan çözme sonrası 82 (% 93.18) zigot canlılığını korumuş ve yarıklanma aşamasına gelen 68 (% 86.07) zigot 34 dondurulmuş-çözölmüş ET siklusunda transfer edilmiştir. Transfer sonrası 4 (% 11.76) hastada beta hCG pozitif çıkmış fakat bir hastada gebeliğin 20. haftasından önce spontan düşük gerçekleşmiştir. Beta hCG pozitif çıkan diğer 3 hastanın klinik gebeliği (> 24 hafta) devam etmektedir. Klinik gebelik oranı %8.82 dir.

Hastalardan 28 tanesine 1 kez, 8 tanesine 2 kez, 1 tanesine 3 kez olmak üzere toplam 47 İVM siklusu uygulandı. Bu hastaların 18 tanesinden 5 tanesine 2 kez olmak üzere uygulanan 23 İVM siklusunda, hastalardan 9 tanesine 2, 1 tanesine 3, 13 tanesine 1 dondurulmuş-çözölmüş ET siklusu olmak üzere toplamda 34 dondurulmuş-çözölmüş ET siklusu yapıldı. Elde

edilen 397 immatür oositten 201 tanesinin *in-vitro* matürasyonu sağlandı ve matürasyon oranı % 50.62 olarak bulundu. *In-vitro* matürasyonu sağlanan 201 oosit İCSİ siklusuna aktarıldı. Fertilize olan 102 oosit belirlendi ve fertilizasyon oranı % 50.74 olarak bulundu. Elde edilen 102 zigot vitrifikasyon ile donduruldu. Çözülen 88 adet zigottan çözme sonrası 82 zigot canlılığını korudu ve çözme sonrası canlılık oranı % 93.18 idi. Vitrifikasyonu gerçekleştirilen 102 zigottan 14 tanesi çözülmedi ve hala sıvı azot içinde saklanmaktadır. Çözme sonrası canlılığını koruyan 82 zigottan 68 tanesi yarıklanma aşamasına ulaştı ve yarıklanma oranı % 86.07 olarak bulundu. Çözme sonrası yarıklanmayan 11, dejenere olan 6, diskarte edilen 3 zigot dondurulmuş-çözülmüş ET siklusuna aktarılmadı. Yarıklanma aşamasına gelen 68 zigot 34 dondurulmuş-çözülmüş ET siklunda 18 hastaya transfer edildi. Transfer başına düşen embriyo sayısı 2 olarak bulundu. Transfer sonrası 4 hastada beta hCG pozitif çıktı. İmplantasyon oranı % 5.88, gebelik oranı % 11.76 olarak hesaplandı. Sonuçta klinik gebelik oranı % 8.82 idi. Gebe olan 4 hastadan birinde gebeliğin 20. haftasından önce spontan düşük gerçekleşti. Beta hCG pozitif çıkan diğer 3 hastanın klinik gebeliği (> 24 hafta) devam etmektedir.

Çalışmada 2 İVM siklusunda aspirasyon sonrası hiç immatür oosit elde edilmedi. Uygulanan 8 İVM siklusunda elde edilen immatür oositlerin *in-vitro* matürasyonu gerçekleşmedi. Uygulanan 11 İVM/İCSİ siklusu sonrası fertilizasyon gerçekleşmedi. Uygulanan 3 İVM/İCSİ siklusu sonrası elde edilen toplam 7 zigot henüz çözülmedi ve dolayısı ile dondurulmuş-çözülmüş ET siklusuna aktarılmadı. Sonuç olarak toplam 19 hastaya uygulanan 24 İVM siklusu sonrası yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı dondurulmuş-çözülmüş ET uygulanamadı. Hastalardan birinde 2 kez dondurulmuş-çözülmüş ET uygulandı ve arta kalan 7 zigot henüz çözülmedi, sıvı azot içinde saklanmaktadır. Çalışmada istatistik hesaplama yapılmadı.

Embriyo skorlamasında Steer ve arkadaşlarının yaptığı embriyo skorlaması methodu referans alındı (165). Dondurulmuş-çözülmüş ET siklusunda transfer edilen 68 embriyodan 17 tanesi I. derece, 29 tanesi II.

derece, 22 tanesi III. derece kalitede embriyo olarak skorlandırıldı. Transfer öncesi 2 hücreli 28 tane, 3 hücreli 12 tane, 4 hücreli 22 tane, 5 hücreli 2 tane, 6 hücreli 2 tane ve 8 hücreli 2 tane embriyo skorlandırıldı.

Uygulanan tüm İVM siklusları sonrası 397 immatür oositten vitrifikasyon ile 102 zigot donduruldu. Çözülen 88 adet zigottan 68 tanesinin transferi sonucu 3 hastada klinik gebelik sağlandı.

5. TARTIŞMA

Son on yılda insanda ilaç kullanmaksızın İVF yapmak ve bu sayede sağlıklı gebelikler ve canlı doğumlar elde edildiğinin gösterilmesi immatür oositlerin *in-vitro* ortamda matür hale getirilmesi ile mümkün olmuştur. *In-vitro* fertilizasyonda yakın zamana kadar oositlerden maksimum sayıda matür oosit elde etmek amaçlanmış olmakla birlikte; bu sikluslarda gonadotropinlerin kullanımına bağlı olarak OHSS ve uzun vadede over kanseri riski gibi yan etkiler gelişebilmekte ve tedavi maliyeti yüksek olmaktadır (90). *In-vitro* matürasyon ile overlerin stimülasyonuna gerek olmadığından bu riskler ortadan kalkmakta ve olası riskler ile birlikte maliyet azalmaktadır.

Bu çalışmada, PKOS tanısı konmuş hastalardan elde edilen immatür oositlerin *in-vitro* matürasyonu sağlandıktan sonra bu oositlerden matür olanlar İCSİ siklusuna aktararak fertilize edilip vitrifikasyon ile dondurulmuştur. Dondurulan zigotlar çözülerek dondurulmuş-çözülmüş embriyo transferi (Kriyo-ET) siklusuna aktarılmış ve bu kombinasyonun başarılı implantasyon oranına etkisi incelenmiştir.

25 Temmuz 1978'de İngiltere'de ilk tüp bebek olan Louise Brown'un doğumundan itibaren klinikte uygulanmaya başlanan İVF ve 1992'den beri uygulanan İCSİ yöntemleri infertilite tedavisinde umut kaynağı olmuştur. Gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonu, infertilite tedavisindeki en büyük gelişmelerdendir (91). Bu tedavide öncelikle gonadotropin (GnRH) salgılatıcı hormon analogu ilaçların yardımı ile vücudun kendi hormonları baskılanıyor ve bu şekilde oosit gelişimi tamamen dışarıdan verilen ilaçlarla kontrol edilebilir hale gelir. Yardımcı üreme teknikleri kullanılacak hastalarda kontrollü over hiperstimülasyonu (KOH) ile çok sayıda folliküllerin, dolayısıyla da çok sayıda oosit ve embriyoların elde edilebilmesi ile YÜT'nin başarısını arttırmak amaçlanmıştır.

Ovulasyon indüksiyonu sonrası OHSS gelişme riski mevcuttur (91, 92). Hafif OHSS'nin klinik olarak çok fazla önemi olmasa da, ciddi OHSS over boyutlarında artma, asit, plevral efüzyon, oligoüri, hemokonsantrasyon ve

tromboembolik özelliklerle karakterize hayatı tehdit eden bir olgudur (93, 94). Genel İVF uygulamalarının kullanımı ile hafif şiddette OHSS için % 3-6, şiddetli OHSS için ise % 0.1-2 oranlarında görülme sıklıkları bildirilmektedir (95-97). Polikistik over sendromu vakalarında ise orta-şiddetli OHSS görülme sıklığı % 10.5'tir (9). Ovulasyon indüksiyonu sonrası PKOS'lu hastalarda OHSS görülme olasılığı diğer hastalara göre oldukça yüksektir (91, 93, 98, 99). Over hiperstimulasyonu sendromu gelişimi için çeşitli teoriler öne sürülmüş olsa da, gelişim mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (100, 101). Over hiperstimulasyonu sendromu gelişimini tam olarak önleyen farmakolojik bir yaklaşım mevcut olmasa da komplikasyonun görülme oranını azaltacak bazı tedbirler alınabilir (102, 103).

Polikistik over sendromu hastalarında OHSS olasılığını önlemek için bu hastalarda İVF sikluslarında daha düşük gonadotropin dozu ile başlanmalı, tedavi sırasında ultrason izlemleri ve serum estradiol düzeyleri daha sıkı monitorize edilmelidir (104). Embriyonun dondurulması, hipofiz baskılanması için GnRH agonisti yerine GnRH antagonist protokolünün tercih edilmesi, hCG enjeksiyonunu ertelemek, hCG yapılmaması veya siklus iptali ciddi OHSS geliştirme potansiyeli olan PKOS hastalarında alınan diğer tedbirlerdendir (104-106).

Son yıllarda İVF-ET tedavisine ihtiyaç duyan PKOS'lu kadınlarda OHSS gelişme riskini azaltmak için immatür oositlerin *in-vitro* matürasyonu yeni ve umut verici bir tedavi olarak geliştirilmiştir (3-6). İnsan oositlerinin *in-vitro* olgunlaştırılması, ilk kez 1965 yılında Edwards tarafından başarılmıştır (107). *In-vitro* matürasyon sonrası ilk canlı doğum ise, Veek ve arkadaşları tarafından 1983 gerçekleştirildi (108). Cha tarafından sezeryan esnasında yapılan ovaryum biyopsisinden elde edilen immatür oositlerde başarı ile uygulanmıştır (7). Trounson ve arkadaşları ise PKOS'lu bir hastadan transvajinal ultrasonografi rehberliğinde, immatür oositlerin eldesiyle oluşturdukları gebeliği rapor ederek İVM'i ilk kez klinik uygulamalara sokmuşlardır (8). Barnes ve arkadaşları 1995 yılında PKOS'lu bir hastada İVM ve İCSİ ile kombine embriyo traşlama yöntemlerini kullanarak *in-vitro* geliştirilen blastosistin transferi ile

sağlıklı canlı doğumu rapor etmişlerdir (109). Bu uygulamalardan sonra günümüze kadar PKOS'lu haslara uygulanmış İVM sikluslarında yüzlerce canlı doğum rapor edilmiştir (4, 10, 110, 111).

Polikistik over sendromlu hastalara uygulanan İVM sikluslarında immatür oositlerin matürasyon oranlarının % 50-75 arasında olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (5, 112-114). Çalışmamızda bu oran % 50.62 olarak bulunmuştur. *İn-vitro* maturasyon oranını % 80-84 veren çalışmalar da mevcuttur (115, 116). Polikistik over sendromlu hastalara uygulanan İVM sikluslarında *in-vitro* matüre edilen oositlerin fertilizasyon oranlarını % 67-78'e kadar ulaştırmıştır (5, 112-116). Çalışmamızda fertilizasyon oranı % 50.74 bulunmuştur. Hem matürasyon hem de fertilizasyon oranları genel verilere göre düşük kalmıştır. Bunun sebebi *in-vitro* kültür ortamının yetersizliği olabilir.

Matürasyon sürecinin fertilizasyon oranında etkili olmamasına rağmen (117), kısa sürede *in-vitro* olarak matüre edilen oositler daha iyi gelişim potansiyeline sahiptir (118). Ancak devam eden implantasyon oranı, yani ET başına düşen doğum oranı, düşüktür ve bu yaklaşık olarak rutin İVF/İCSİ sikluslarında elde edilen oranların yarısı kadardır (117). Primer oositlerin gelişim kapasitesi düzenli menstrüel sıklusa sahip hastalarda, düzensiz menstrüel sıklusa sahip ve anovulator PKOS hastalarından daha yüksek bulunmuştur (119).

Son gelişmeler ile İVF uygulamalarında ortalama 15 oosite ve %70'e kadar yumurta dölllenme oranına ulaşmak mümkün olmuştur. Ancak ortalama canlı doğum oranı % 30'un altında kalmıştır ve bu oran İVM için daha düşük olmaktadır. Düzenli menstrüel sıklusa sahip kadınlarda uygulanan İVM siklusunda % 17.6 klinik gebelik oranı bildirilmiştir (120). Polikistik over sendromlu hasta grubundaki çalışmada uygulanan İVM siklusunda, aspirasyon başına düşen klinik gebelik oranı % 22.5'tir (121). Bu durumda İVM uygulamasının belirli hasta grubunda daha etkili olduğu ortadadır. Başka bir çalışmada ise PKOS'lu hastalardan İVF ve İVM sikluslarından elde edilen klinik gebelik oranı sırasıyla % 33.7 ve %21.5 olarak bulunmuştur (114). Bu çalışmada İVF uygulanan hastaların 12'sinde orta veya şiddetli OHSS gelişmiş

fakat İVM uygulanan hastaların hiç birinde OHSS gelişmemiştir. Çalışmalar over stimülasyonu sonrası ciddi OHSS gelişme riski altında olan PKOS hasta grubunda uygulanan İVM sikluslarının İVF'e alternatif olduğunu göstermektedir. Cha ve arkadaşlarının yine PKOS hastalarında yaptığı çalışmada hasta başına ortalama 6.3 embriyo transferi sonrası % 27 gebelik oranı elde etmeyi başarmışlardır (5). Çalışmamızda klinik gebelik oranı % 8.82 olarak bulundu. Gebelik oranları istenildiği gibi olmasada çalışma grubundaki hiçbir hastada OHSS gelişmemiş olması bu tedavi yönteminin PKOS hastaları için güvenilir olduğunu göstermektedir.

In-vitro matürasyonda gebelik oranları % 4-54 arasında değişmektedir. Elde edilen başarılı gebelik oranlarının İVM uygulamalarında birbirinden bu kadar farklı olmasındaki temel sebeplerden ilki tedaviye uygun hasta seçimidir, çünkü İVM tüp bebek tedavisinde PKOS hastalarının over stimülasyonu sonrası gelişen OHSS riskini önlemede alternatif protokol olarak klinikte uygulanmaya başlanmıştır. Bu sebeple farklı hasta grubuna uygulanmasının farklı gebelik sonuçları vermesi doğaldır. Bunun yanı sıra hasta yaşı, aspirasyon sonrası elde edilen oosit sayısı, oosit kalitesi de gebelik oranları üzerine etkilidir.

Embriyo transferini takiben implantasyon başarısızlığı birçok nedene bağlı olarak gelişebilir. Endometriyum ve implante olan blastosist arasındaki hücresel ve moleküler etkileşimler henüz iyi anlaşılammıştır. Bu nedenle implantasyon başarısızlığı İVF'teki problemlerin başında gelmektedir (122, 123). İmplantasyon başarısızlığının tanımı her yerde değişiktir. Ancak en sık kullanılan kriter, 3 İVF denemesinde embriyoların tekrarlayan, ardısıra implantasyon başarısızlığıdır. Tekrarlayan implanyasyon başarısızlığının nedenleri üzerindeki görüşler de oldukça tartışmalıdır. Örneğin bazıları, sadece iyi kalitedeki embriyoların aktarımı en az 3 defada başarısız olmuşsa implantasyon başarısızlığı tanısını kabul etmektedirler bu nedenle de kötü embriyoları olan kadınları dikkate almayı uygun bulmadıklarını belirtmişlerdir. Ancak daha yakın zamanda, artan sayıda jinekolog, iyi kalitede embriyo üretememeyi kendi başına, tekrarlayan implantasyon başarısızlığına yatkınlaştıran etken olarak değerlendirirler. Son görüş, kötü kalitede

embriyoları olan 36 yaşın üzerindeki kadınların, kromozomal anöploidi taramasına erken gönderilmesi gerektiğidir. Etiyolojik etkenler sıklıkla çakışsa da implantasyon başarısızlığı anne yaşı ve oosit-embriyo kalitesi, immünolojik etkenler, endometriyal reseptivite ve luteal faz bozuklukları, uterin, tubal ve peritoneal etkenler ve stimülasyon protokolü ile embriyo kültür ortamının altında sınıflandırılmıştır (124).

Yardımcı üreme tekniklerini ile tedavide sonuçları etkileyen en önemli faktör maternal yaştır (125). Otuz beş yaşına kadar implantasyon oranı lineer olarak artarken, 35 yaştan sonra implantasyon oranları progresif olarak yılda % 2.8 oranında azalır. Ayrıca yaş ilerledikçe, primordiyal folliküllerin sayısının ve kalitesinin azalması yanında artan kromozomal anomaliler de fertilitayı olumsuz yönde etkilemektedir (126, 127). Otuz beş yaşından sonra İVF uygulanan kadınlar, seks kromozomları ve 13, 16, 18, 21 ve 22. otozomları kapsayan mozayikleşmeler ve anöploidilere daha yatkın olurlar. Yirmi-otuz dört yaş arasındaki, embriyoları morfolojik olarak normal olan kadınlar ile yapılan bir çalışmada floresan *in-situ* hibridleme (FISH) analizleri, X, Y, 13, 18 ve 21. kromozomlarda % 16 anöploidi oranı saptayabilmiştir. Otuzbeş-kırkdokuz yaş ve 40-45 yaşındaki kadınlar için buna denk anöploidi rakamları ise sırasıyla % 37 ve % 53'tür (128).

Uterin kavitedeki herhangi bir yüzeysel lezyon (submüköz miyom, intrauterin adhezyon veya endometriyal polip) lokal inflamatuvar cevap yaratarak (RIA benzeri etki) implantasyonu bozma potansiyeli taşır. Histerosalpingografi (HSG), salin infüzyon sonogram, endometriyal biyopsi ve transvajinal ultrasonografi potansiyel implantasyon problemlerini tespit edebilen diyagnostik testlerdir. Rutin diagnostik histeroskopiye (H/S) İVF-ET hastalarında uygulayan Jacobs ve arkadaşları % 20 vakada, endouterin yüzeysel lezyon tespit etmişlerdir (129). Küçük lezyonların bile implantasyonu bozma potansiyeli olduğundan, diagnostik H/S veya salin sonografinin YÜT öncesi tüm hastalara yapılması önerilmektedir (129, 130).

In-vitro fertilizasyon-embriyo transferi (İVF-ET) hazırlığında kontrollü over hiperstimülasyonu (KOH) takiben geç proliferatif fazda endometriyumun

transvajinal ultrasonografi (TV-USG) ile değerlendirilmesi ile tedavi sonuçları tahmin edilebilir. Özellikle İVM tedavisi sırasında gelişen follikül ya da folliküllerin hacminden emin olmak için sıkça ultrasonografi değerlendirilmesi uygulanmalıdır. Child ve arkadaşları transfer günü endometriyal kalınlığın 8 mm'den az olmasının kötü gebelik sonuçları ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (131). Bunun yanısıra hCG verilen günde endometriyumun trilaminar görünümde olmamasının İVF sikluslarında zayıf gebelik sonuçları ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır (131-133). *In-vitro* fertilizasyon uygulamalarında atravmatik bir embryo transferinin implantasyon oranlarını arttırdığı rapor edilmektedir (134). Ayrıca yüksek implantasyon oranları ile uterin kan akımındaki artış arasında bir ilişki olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (131).

İmplantasyon süreci, gelişmekte olan blastosist ile uterus epiteli arasındaki karmaşık bir dizi interaktif basamağı içerir. Bu basamakların herhangi birinde bir aksama meydana geldiğinde embriyonun implante olabilme şansı azalır (133). Adhezyon ve sonrasındaki invazyon esnasında embriyo ile anne arasında görülen moleküler etkileşimler embriyonun implante olabilmesi için hayati önem taşır. İmplantasyon aşamasında hem trofoblastlar hem de desidua tarafından birçok büyüme faktörü, sitokinler ve parakrin faktörler yanında adhezyon molekülleri sentezlenir. Endometriyumu işgal eden trofoblastlar ile konakçı arasındaki ilişki, sitokinler (IL-1, 3, 4, 6, 7, 8, 11 ve 12) ile büyüme faktörleri (Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Transforme edici Büyüme Faktörü (TGF), Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF), İnsülin Benzeri Büyüme faktörü (IGF), Hematopoetik Büyüme Faktörü (CSF) ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)) arasındaki hücreler arası sinyallerle düzenlenir (135). Gebeliklerin % 60 kadarı pre-implantasyon döneminde kaybedilir. Bu dönemdeki kayıpların en önemli sebeplerinden biri embryo-maternal sinyal sisteminde görülen bozukluklardır (132).

İmplantasyon süreci ister doğal yollardan isterse de YÜT ile olsun birbirine benzer şekilde gerçekleşir. Ancak YÜT uygulamalarında embriyonun tuba uterinada geçirdiği evreler laboratuarda kadın genital traktusunun pH, ısı

ve osmolaritesini aynen sağlamaya çalışan inkübatörler içinde gerçekleştirilmektedir. Çünkü *in-vivo* fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi tuba uterinada oluşurken, oosit ve embriyonun YÜT'teki gelişimi *in-vitro* kültürlerde oluşmaktadır. Tuba uterina ortamı başarılı bir gebeliğin başlaması için gerekli bir takım prosesleri sağlamaktadır (123, 136, 137). Tuba uterina da endometriyum gibi siklik değişiklikler göstermektedir. Genelde hormonlara bağlı olan bu değişikliklerdeki anormallikler anormal tuba fonksiyonlarına, örneğin ektopik tubal gebeliğe varan komplikasyonlara neden olabilmektedir (138). Diğer taraftan, fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi için optimal ortamı sağlayan tuba uterina salgı epitelinden çeşitli sitokin yada büyüme faktörleri salgılanmaktadır (137, 139, 140). Bir sitokin olan LIF'in (Lösemi Baskılayıcı Faktör) implantasyon için şart olduğu ve insan endometriyumunda özellikle implantasyona uyan dönemde yükseldiği gösterilmiştir. Bu faktörün tuba uterina epiteli tarafından salgılanması ise oldukça ilginçtir ve reseptivite için gerekli yapılanmada tuba uterina-endometriyum ilişkisini işaret eder (141-143). Endometriyum reseptivitesi üzerine yapılan çalışmalarda elektron mikroskobu ile ayırtedilebilen glandular sitoplazmik çıkıntılar olan pinopod yapısının reseptivite açısından önemli olduğu ortaya konmuştur. Normal sikluslu kadınlardan postovulatar evre 6. günde alınan endometriyal biyopsilerde % 78 oranında pinopod yapılarının geliştiği taramalı elektron mikroskobu incelemelerinde gösterilmiştir (122, 141, 143). Yapılan bir çalışmada tuba uterina ile oosit-embriyo arasındaki diyalog sonucunda endometriyum da tüp ligasyonlu grup ile ligasyon yapılmayan kontrol grubu arasında apoptoz, salgı granülleri, pinositoz ve özellikle de pinopod oluşumu arasında önemli farklar olduğu bulunmuştur (144). Bu bulgular, tuba uterina epiteli ile oosit-embriyonun parakrin ve/veya otokrin diyalogunun endometriyum reseptivitesine etkili mediyatörlerin salınımı ve muhtemelen fizyolojik uyarın etkiyle tuba-ovaryal kapillerlere geçebileceğini ve sonuçta lokal uterus-tuba uterina bağlantısı özelliği ile endometriyumda reseptivitede önemi olan işaretleyicileri etkileyebileceğini düşündürmektedir.

In-vitro fertilizasyonda uygulanan KOH'un yarattığı ana problemlerden

biri endometriyal faktörlerdeki değişimlerdir (145). *In-vitro* fertilizasyon sikluslarında fazla sayıda oosit elde etmek için kullanılan ovulasyon indüksiyon ilaçları suprafizyolojik seviyelerde steroid hormon üretimine yol açarak endometriyal reseptiviteyi ve takiben implantasyonu olumsuz yönde etkilerler (146). Fakat İVM uygulamalarında over stimülasyonuna gerek olmadığından bu risk ortadan kalkmaktadır.

Chian ve arkadaşları PKOS'lu hastalarda 25 İVM sikluslarında 10.000 IU hCG uygulayarak % 40 gebelik oranı rapor etmişlerdir (143). Bu grubun başka bir çalışmasında yine PKOS hastalarındaki İVM sikluslarında hCG uygulanan ve uygulanmayan gruplar karşılaştırıldığında, matürasyon süreci hCG uygulanan grupta uygulanmayan gruba oranla daha hızlı olduğu bulunmuştur (144). Bu çalışma İVM sikluslarında oosit matürasyonunu artırmak için hCG enjeksiyonunun yararını göstermiştir (144) ve dahası ovarian stimülasyon olmadığı için hCG dozunu arttırmak bu dozu standart 10.000 IU yerine 20.000 IU'ye çıkartmak da denenmiştir (145). Polikistik over sendromlu 118 hastanın dahil olduğu başka bir çalışmada ise hastaya ne FSH ne de hCG uygulanmadan transfer başına % 40 klinik gebelik oranı bildirilmiştir (146). Follikül stimüle edici hormonunun kumulus hücreleri üzerine etkinliği ve steroid üretimi, oositteki RNA ve protein sentezini artırıcı etkisi olduğu bilindiğinden beri (147), tedavide FSH uygulanmasının hem immatür oosit sayısı hem de oositin matürasyon potansiyeli ve gelişim yeteneğini arttırdığı sanılmaktadır. Mikkelsen ve Lindenberg, PKOS'lu hastalara menstrüasyonun üçüncü gününden başlayarak 3 gün boyunca günlük 150 IU rFSH uygulandığında, rFSH uygulanmayan gruba göre anlamlı olarak yüksek matürasyon oranı rapor etmişlerdir (148). Buna karşın fertilizasyon oranı ve embriyo yarıklanması her iki grupta da benzer bulunmuştur. Başka bir çalışmada normal menstrüel sıklusa sahip kadınlarda FSH enjeksiyonu, elde edilen oosit sayısında bir artışa neden olmamasının yanı sıra matürasyon, yarıklanma ve embriyo gelişimine de etki etmediği gösterilmiştir (149). Lin ve arkadaşlarının PKOS'lu hastalarla yaptığı randomize bir çalışmasında 6 gün boyunca 75 IU rFSH uygulanan ve rFSH uygulanmayan iki grup oluşturmuşlardır (113). Her iki gruba da

aspirasyondan 36 saat önce 10.000 IU hCG verilmiştir. İnsan koryonik gonadotropini uygulanma gününde serum östradiol (E₂) değeri FSH uygulanan grupta daha yüksek çıkarken her iki grupta matürasyon, fertilizasyon ve gebelik oranları benzer bulunmuştur. Ayrıca elde edilen immatür oosit sayısı ve endometriyal kalınlıkta benzer bulunmuştur. Bu çalışma İVM sonuçları üzerine hCG ile kombine FSH uygulanmasının yalnız hCG uygulamasından daha üstün olmadığını göstermiştir (113). *İn-vitro* matürasyon siklusunda elde edilen immatür oosit sayısı ile gebelik oranları korelasyon göstermektedir (116). *İn-vitro* matürasyon düzenli menstrüel sıklusa sahip kadınlara uygulandığında karşılaşılan sorun az sayıda antral follikül gelişimidir. Bunun aksine Barnes ve arkadaşları düzenli menstrüel sıklusa sahip hastalarda matürasyon, fertilizasyon ve yarıklanma oranlarını PKOS hastalarından daha yüksek bildirmişlerdir (119). Bu durum PKOS hastalarında folliküler sıvıdaki yüksek androjen seviyesine bağlı olabilir. Çalışmamızda PKOS hasta grubuna hCG ile kombine FSH uygulanmıştır. Matürasyon, fertilizasyon, yarıklanma ve gebelik oranları hasta grubuna göre farklılık göstermektedir. Ayrıca farklı çalışmalarda farklı sonuçların rapor edilmesindeki diğer etken, uygulanan protokollerin ve enjeksiyon dozajlarının farklı olmasına bağlı olabilir. Bu nedenle İVM uygulamalarında rutin olarak kullanılan standart bir protokol yoktur.

Transfer edilen embriyo sayısı ile gebelik oranı artar (150). Fakat bu durumda çoğul gebelik gelişme riski de artar (151). Yardımcı üreme tekniklerinde amaç olası çoğul gebelik riskini önlemektir. Bu amaç için yüksek gelişim potansiyeline sahip az sayıda embriyo transferi yapılmalıdır. Aspirasyondan sonraki ikinci ya da üçüncü gün embriyo transferi, embriyoların kalitesinin iyi ancak sayısının az ya da kalitesinin orta olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Blastosist aktarım programlarının genellikle zigot veya embriyo evresi aktarımlarından daha iyi performans gösterdiği artık iyi bilinmektedir. Bu, yeni bir rastgele kontrollü çalışmada, 3. günde 3'ten fazla iyi embriyo var olduğunda gösterilmiştir (152). Embriyo tansferinin, embriyo gelişiminin daha ileri safhalara kadar takip edilerek geciktirilmesi, embriyolardan daha iyi gelişenleri seçme şansı verir ve çoğul gebeliği anlamlı ölçüde önleyebilir.

Blastosist, implantasyondan önceki son embriyonik aşamadır ve en iyi embrioyu seçme olanağı verir (134, 153, 154). Blastosist evresinde yapılan transfer, sınırlı sayıda embriyo transferine izin verir ve böylece yardımcı üreme teknikleri ile ilişkili çoğul gebelik oranlarını azaltabilir (134). Çalışmamızda Alman Embriyo Koruma Yasaları, embriyo seçimine izin vermediğinden zigot aşamasında dondurulup-çözülen embriyolar bir gün kültür ortamında bekletildikten sonra menstrüel siklusun 15. gününde transfer edildi. Çalışmamızda transfer başına düşen embriyo sayısı 2 olarak bulunmuştur. Yasalar tek seferde en fazla 3 embriyo transferine izin verdiği halde hastalardan çoğunun 1 ya da en fazla 2 embriyo transferi istemeleri, bulgularımızdaki transfer başına düşen embriyo transferi sayısı ile örtüşmektedir. Hem yasaların embriyo seçimine izin vermemesi hemde hastaların isteği üzerine düşük sayıda embriyo transferi gebelik oranlarını olumsuz yönde etkilemiş olabilir.

Embriyo kalitesi, her bir embriyonun tek tek genetik özelliklerine ve çevresel faktörlere bağlıdır. Embriyonun kültür ortamındaki ihtiyaçlarını karşılayarak embriyo kalitesini etkileyen çevresel faktörler geliştirilebilir. Yakın zamanda kontrollü bir çalışma, kültür ortamlarının İVF sonrasında gebelik oranları üzerinde değişken etkileri olduğunu ileri sürmüştür (155). *İn-vitro* matürasyon sikluslarında oositin *in-vitro* matürasyonu, gelişen embriyo kalitesini dolayısı ile gebelik oranlarını etkiler. Laboratuvar ortamında oosit olgunlaşmasını sağlamak amacı ile rutin İVF'te kullanılanlardan farklı kültür sıvılarının hazırlanması gerekmektedir. *İn-vitro* matürasyon için kültür sistemlerinin başarısı farklı parametrelerin doğru kombinasyonuna bağlıdır (156-159). *İn-vitro* matürasyon için kullanılacak kültür sıvıları uygulamaların yapıldığı laboratuvarlarda üretilmektedir. Gonadotropinler (FSH ve LH), farklı serumlar, estradiol eklenmiş doku kültür medyumları 199 (TCM-199), Ham's-F10, Chang'in bikarbonat veya HEPES'le tamponlanmış medyumları gibi kompleks kültür medyumları oositin *in-vitro* matürasyon araştırmaları ve klinik uygulamalarda en çok kullanılan kültür ortamlarıdır (160). Cıncık ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada en iyi çalışan model, 37 °C ısı, % 98 nem ve % 5 CO₂ inkübasyon

koşulları ile fetal kordon serumu (FCS) içeren kültür ortamları olmuştur (161). Bu çalışmada maternal serum (MS) ve insan tübal sıvısı (HTF) kullanılmasıyla da buna yakın sonuçlar alınmıştır. % 10'luk ve % 15'lik FCS'u, İnsan Serum Albumini (HSA)'e; kıyasla daha başarılı, HSA de Sığır Serum Albumini (BSA)'ne göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Aynı amaçla follikül aspirasyon sıvısı (FAS) (162) kullanıldığında sonuçlar göreceli olarak iyi bulunmuştur. Ko-kültür hücreleri olarak granüloza hücrelerinin ortama eklenmesi follikül ve epitelyum hücrelerine göre daha iyi sonuçlar vermiştir (161). Ortamda serum veya FAS'ın bulunmasının, kumulusların matürasyondaki rollerini tetiklediği düşünülmektedir. Özellikle, FCS kullanılması ile kültüre edilen oositlerden meydana gelen embriyonların kalitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. (161). Çalışmamızda oosit matürasyon medyumuna içine (Oocytes Maturation Medium, Sage) 75 IU FSH (Puregon) ve 50 IU hCG (Predalon) eklenerek İVM kültür ortamı hazırlandı. Elde edilen immatür oositler 37 °C ısı, % 98 nem ve % 5 CO₂ fizyolojik şartları ile inkübe edildi. *In-vitro* matürasyon kültür sıvılarının içeriği konusunda çalışmalar sürdürülmekte olup içerik konusunda değişik uygulamalar söz konusu olduğundan henüz belli bir standart saptanmamıştır. Kültür sıvılarında belli bir standartın olmayışı ve her laboratuvarın farklı içerikli kendi medyumunu hazırlaması İVM gebelik sonuçları üzerine çok farklı sonuçların çıkmasında etkili olabilir.

Embriyo morfolojisi ve gebelik arasındaki korelasyonların sonucu olarak embriyologlar transfer edilen embriyoların kalitesini belgelemek için evreleme şeması kullanırlar. Bu şemaların çoğu sitoplazmik fragmentasyon ve büyüme hızıyla ilişkiliyken, bazıları da zona pellusida kalınlığı, blastomer büyüklüğü ve düzenliliği gibi başka faktörleri kapsar. Derece I; mükemmel morfolojiyi anlatmak üzere eşit büyüklükte blastomerleri olan ve sitoplazmik fragmanları olmayan pre-embriyoyu ifade eder, farklı büyüklükteki blastomerlerin ve pre-embriyo yüzeyinin kaplayan minör sitoplazmik fragmanların artması embriyo derecesini olumsuz yönde etkileyerek embriyo kalite derecesini arttırır (Derece II, Derece III) ve takiben başarı şansını azaltır (163, 164). Çalışmamızda Steer ve arkadaşlarının embriyo skorlaması

kullanıldı (165). Transferden hemen önce yapılan embriyo skorlamasında, elde edilen embriyoların çoğu II. derece 2 hücreli olarak sonuçlanmıştır. Aynı kliniğin yalnız infertil erkek ya da infertil erkek ile kombine tubal faktör infertiliteli kadınlarda uyguladıkları İCSİ ile kombine vitrifikasyon sonuçlarında elde edilen embriyoların çoğunluğu I. derece 4 hücreli olarak skorlandırılmıştır (89). Polikistik over sendromlu hasta grubunda embriyo kalitesi ve gelişim potansiyeli daha düşük çıkmıştır. Polikistik over sendromlu hastalarındaki bu sonuçlara, bu grubun yüksek androjen değerleri ya da kültür ortamının yetersizliği neden olmuş olabilir.

Gliserolün 1949 yılında sperm hücrelerinin dondurulmasında kriyoprotektan olarak başarıyla kullanılması (166) oosit ve embriyoların da dondurularak saklanması için gerekli araştırmaların yapılmasının başlangıcını oluşturmuştur. Oosit-embriyo membranı, dondurma-çözünme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Hücre membranı yapılarının termodinamik özellikte ve % 65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden oluşması, membranların soğutulmalarının sonucu olarak geri dönüşümüz faz değişimine, yani sıvı fazdan jel fazına geçmesi neden olmaktadır (167, 168). Gelişen faz değişimi membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol açarak, çözünme sonunda canlılığı azaltmaktadır. Bu değişimler sonrası oluşan stabilizasyonun bozulmasıyla da hücrede soğuk şoku gelişmekte ve bu durum terminolojide soğutma zararı olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca membranların doymamış fosfolipitlerce zengin olması, lipid peroksidasyonuna karşı duyarlılığı doğurmakta, hücrelerin kısa ya da uzun süreli saklanması sırasında hücresel zararı şekillendirmektedir (167, 169, 170). Oosit ve embriyodaki zarar ise, sitoplazmanın ve sitoplazmik membranın fazla oranda lipid içermesinden dolayı dondurma-çözünme işlemine duyarlı olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, sitoplazmalarında mitotik ağları oluşturan mikrotübül ve mikrofilamanlar, ortamdaki düşen sıcaklığın etkisiyle destabilize hale gelerek soğuk şoku zararını doğurmaktadır (50, 70, 171). Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm esnasında dekrizalizasyona ve gelişen membran destabilizasyonuna

karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılırlar. Genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve iyon miktarını azaltarak gösterirler. Hücre, dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkübasyona tabi tutularak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır (50,166). Hücrelerin başarıyla dondurulması, plazma membranından suyun ve kriyoprotektanların basit difüzyonunu ve hızlı transportu ile sağlanır. Son yıllarda membranda transport işlevli protein yapısında olan su kanalları (aquaporin) saptanmıştır. Bu proteinlerin dondurma sıvısına katılmasıyla hücrenin yaşam gücü artırılmaktadır (172).

Kontrollü yavaş dondurma yöntemiyle ilk başarılı embriyo dondurma işlemi 1972 yılında Whittingham ve arkadaşları tarafından fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir (173). Bu yöntemde dondurulan insan oositlerinin kullanıldığı İVF sonrası ilk bebek, 1986 yılında Chen tarafından elde edilmiştir (174). Vitrifikasyon prosedürü 1985'te ilk kez fare embriyolarında başarıyla gerçekleştirilmiştir (55). İnsan hücrelerinde vitrifikasyon tekniğinin ilk uygulanmaya başladığı 1998-2000 yıllarında hızlı dondurma adı verilen bir teknik uygulanırken, 2000'li yılların başından günümüze kadar olan süreçte vitrifikasyon adı verilen ve daha başarılı klinik sonuçlar elde edilen bir teknik tercih edilmektedir. Hızlı dondurmada embriyoların sıvı azot buharında kısa bir süre (2-3 dakika) bekletildikten sonra sıvı azota daldırılmasıyla gerçekleştirilir. Vitrifikasyon yönteminden farklı olarak, hızlı dondurmada ekstrasellüler sıvıda, buz kristalleri oluşur ve dondurma çözeltisinin ozmolaritesinde artma meydana gelebilir. Bunun sonucu olarak embriyo hücrelerinden daha fazla donabilir su hücre dışına geçiş yapar. Ancak, çözündürme işleminde uygun olmayan çözünme hızları uygulanırsa, hücre içi buz kristalleri şekillenebileceğinden embriyo zarar görebilir (175). Yavaş çözündürme hızları ile azalan hücre içi osmolariteden dolayı hücre içinde hücre dışından daha erken buz kristalleri şekillenmesine sebep olup hücre zarında hasara yol açar. Son çalışmalar bu yöntemde zona kırılmalarının daha fazla olduğunu göstermekte ve embriyoların

direkt sıvı azota daldırılmasıyla, vitrifikasyonda olduğu gibi, elde edilen soğutma hızının (sıcaklık transferinin daha hızlı olması nedeniyle), azot buharıyla muameleden sonra yapılan kriyopreservasyondan çok daha yüksek olduğuna işaret etmektedir (176). Bu teknik klasik dondurma ve vitrifikasyon kadar ilgi görmemiştir (177). Geleneksel yavaş kriyoprezervasyonda, embriyolar daha az konsantrasyonda kriyoprotektanlarla zaman ayarlı cihazda yavaş prosedürle dondurulur (178). Bu prosedürde embriyolar, kriyoprotektanların embriyoları dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında toksik etkisine uzun süre maruz kalmakta ve dondurma sırasında intrasellüler buz kristalizasyonu oluşumundan dolayı zona pellusidada kırılma, hücre membranları ve iskeletinde bozulmanın yanı sıra ve metabolik bozukluklar meydana gelmektedir (179). Böyle hasarlar hücrenin metabolik fonksiyonlarının aksamasına ve dolayısıyla apoptoz ve nekrozla hücrenin ölümüne yol açmaktadır (180).

Vitrifikasyon yöntemi geleneksel yavaş kriyopreservasyona alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Vitrifikasyon yöntemi yüksek oranda kriyoprotektanlarla konsantre edilmiş dolayısıyla viskozitesi artırılmış vitrifikasyon çözeltilerinde ve buz kristalizasyonunu önlemek için hızlı soğutma oranları (-15.000 -30.000 °C/dakika) uygulanarak embriyoların cam benzeri bir yapıda dondurulması işlemidir (181, 182). Yavaş dondurmanın tersine embriyoların kısa sürede gerçekleştirilen dehidrasyonundan hemen sonra intrasellüler ve ekstrasellüler buz kristal formasyonunu önlemek için embriyoları bulduran payetler hemen sıvı azota daldırılmaktadır. Bu yöntemde hücre içerisindeki suyun vitrifikasyonu yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan kullanılması yanında, hızlı soğutma oranlarının uygulanmasıyla da sağlanmaktadır (183). Vitrifikasyonda soğutma hızı, embriyoların içinde bulunduğu kriyoprotektan çözeltisinin miktarıyla direkt ilişkilidir. Embriyoları bulduran kriyoprotektan çözelti miktarı ne kadar az olursa, sıvı azota daldırma sırasındaki soğutma oranı da o ölçüde hızlı olacaktır (176). Vitrifikasyonda mümkün olan en küçük hacimde kullanılan vitrifikasyon çözeltisi içerisindeki embriyolar, yoğun kriyoprotektanlara çok kısa bir süre maruz kaldıkları gibi, vitrifikasyonla embriyoların en hassas oldukları sıcaklık aralığı da

(-5 -15°C) çok hızlı geçilmektedir (48). Üstelik OPS (açık çekilmiş payet), kriyoloop ya da kriyotop ile yapılan vitrifikasyonda kriyoprotektan çözeltisinin miktarı çok düşük olduğundan (0.5 ml ve daha az), embriyolar 0.25 ml'lik payetlerde yapılan vitrifikasyon işleminden 10 kat daha hızlı dondurulmuş olur (184). Ayrıca küçük hacimlerde yapılan vitrifikasyon işleminden sonra, embriyonun rehidrasyonu çözdürme çözeltisiyle temastan hemen sonra meydana gelir ve böylece çözdürme işleminin toksik ve ozmotik etkileri önlenmiş olur. Payetlerde vitrifiye edilen embriyolarda zona kırılmaları % 27 oranında gerçekleşirken, küçük hacimlerde vitrifikasyon yönteminde bu oran % 1'i geçmez (184). Çalışmamızda zigotların kriyotop metoduyla vitrifikasyonu sağlandı. Zigotlar kriyotopa yüklendikten sonra fazla çözelti pipetle geri çekilerek minimal hacimde olacak şekilde sıvı azota daldırıldı. Çözme sonrası elde edilen yüksek yaşama oranları bu metodun güvenilir ve sağlıklı olduğunu desteklemektedir.

Vitrifikasyon, pahalı ekipmanlara, zaman ve işçiliğe ihtiyaç olmadan embriyoların -196 °C'daki sıvı azota daldırılarak kolayca dondurulabildiği en son teknolojidir (185). Dolayısıyla soğutma oranının maksimizasyonu ile kriyoprotektan konsantrasyonunun minimizasyonu arasındaki denge çok önemlidir. Örneğin; yüksek soğutma oranları, istenen kriyoprotektan konsantrasyonlarını düşürmektedir (66). Embriyolar büyük hacimli olduklarından letal etkili intrasellüler kristalleşmeye yatkındırlar. Bunu engellemek için vitrifikasyon yönteminde yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanlar kullanılarak buz kristal formasyonu baskılanır ve embriyolar üzerindeki fiziksel hasarın önüne geçilir. Pratik soğutma oranlarında vitrifikasyonun sağlanması için kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonlarının kullanılması gerektiğinden, ilgili kriyoprotektanların toksisiteleri vitrifikasyonda önemli bir rol oynamaktadır (175). Yüksek konsantrasyonlardaki kriyoprotektanların toksik etkilerini en aza düşürmek için, ekilibrasyon zamanının kısaltılması, iki aşamalı ekilibrasyon ve toksisiteyi azaltan sükroz, trehaloz, formamid ve rafinoz gibi bazı maddelerin kullanılması önerilmektedir (50, 59). Ayrıca yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektanların ozmotik ve

toksik etkilerinin elimine etmek için vitrifikasyon çözeltilisinin iki veya daha fazla kriyoprotektanla hazırlanması yanında hücre içine nüfuz edebilen ve hücre içine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlar da birlikte kullanılmalıdır (59). Hücre içine nüfuz eden kriyoprotektanlar donmanın gerçekleşmesinden önce, ozmotik basınç farkından dolayı, embriyo hücreleri içerisindeki sıvı kriyoprotektan maddeler ile yer değiştirir ve böylece hem hücre hacmindeki değişiklikler azaltılarak hem de embriyo hücreleri içerisindeki buz kristallerinin oluşumu minimum düzeye indirilerek dondurma işlemi sırasında hücrelerin zarar görmesi minimum düzeye indirilir. Koruyucu etkileri donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (70, 170, 171, 186). Vitrifikasyon protokolündeki başlıca hedef kriyoprotektanların etkinliğini kaybetmeden toksisitesini baskılamaktır (183).

Öldürücü buz kristallerinin oluşumunun donma aşamasındakine oranla çözünme aşamasında daha hızlı şekillendiği gösterilmiştir (187). Bu nedenle, embriyoların vitrifikasyondan sonra canlılıklarını sürdürebilmeleri, aynı zamanda, devitrifikasyon sırasında meydana gelebilecek zararların da önlenmesine bağlıdır. Sulu çözeltilerinin dondurma ve çözündürme işlemleri boyunca camsı bir faz şekillendiren polietilen glikol ve 2.3 bütanediol gibi maddeler aynı zamanda gliserolle karşılaştırıldığında, hücrelere çok daha hızlı penetre olduğundan, vitrifikasyon çözeltilerinde kullanılan ideal kriyoprotektan maddeler olarak bildirilmiştir (50). Fikol (75), antifriz proteinler (76) ve sodyum hyaluronat (187) gibi yüksek molekül ağırlıklı maddeler kriyoprotektan çözeltilerini vitrifiye olabilme özelliklerini artırır ve çözündürme sürecinde devitrifikasyonu önlerler. Bu tür moleküllerin vitrifikasyon çözeltilerinde bulunmaması çözündürme esnasında net bir devitrifikasyonla sonuçlanmıştır ki; bu da buz kristallerinin dondurma aşamasına göre çözündürme aşamasında daha kolay şekillendiğini doğrulamaktadır. Ancak, çözündürme sürecinde şekillenen devitrifikasyon olgusunun çözündürme sonrası embriyoların canlılıklarını korumada olumsuz etki göstermediği bildirilmiştir (187). Farelerde yapılan bir çalışmada, dondurma aşamasında vitrifikasyon çözeltilisinde

şekillenen kristalizasyonun embriyolara zarar vermediği bildirilmiştir (188). Bu nedenle, dondurma aşamasındaki gözlenebilir kristalizasyon ve çözündürme aşamasındaki yeniden şekillenen kristalizasyonun embriyolara zararsız olması, buz kristallerinin hücre dışında şekillendiğinin ve embriyoların içerisinde herhangi bir kristalleşmenin ya da değişikliğin olmadığını göstergesi olarak kabul edilmektedir (50).

Bugüne kadar makromoleküller, şekerler ve diğer kriyoprotektanlarla kombine edilerek birçok vitrifikasyon çözeltisi oluşturulmuştur (189). Vitrifikasyon medyumları hızlı oranlarda soğutulduğunda kristalleşerek donmayan kriyoprotektan çözeltileridir. Bu nedenle vitrifikasyon için kullanılan temel medyum ya fosfat tamponlu, HTF gibi hepes tamponlanmış kültür medyumları veya TCM 199 (doku kültür medyumları), Ham's F-10'dur. Makromoleküllerden en çok serum ya da sığır serum albumini kullanılmakla beraber molekül ağırlığı yüksek polivinil alkol (PVA) ve sodyum hyaluronat, polietilen glikol (PEG), PVP, ficoll veya tavşan (tavşan serumu) gibi hayvanların proteinleri de vitrifikasyon çözeltilerine katılmaktadır (190). Doksanlı yıllara kadar vitrifikasyon medyumunda kriyoprotektan olarak DMSO ve GL kullanılırken, daha sonraları bunun yerini düşük toksisiteli olmalarından dolayı 1, 2-propanediol, PG, EG ve sükroz almıştır (182). Etilen glikol yüksek geçirgenliği ve düşük sitotoksitesi nedeniyle insan oosit ve embriyolarının vitrifikasyonunda en çok kullanılan kriyoprotektandır (64-66). Etilen glikol çözeltisi genellikle sükroz, glükoz, früktoz, sorbitol, trehaloz veya rafinoz gibi şekerlerle kombine edilerek kullanılır. Sükroz ve trehaloz gibi en çok tercih edilen disakkaridlerin molekül ağırlıkları büyük olduğundan hücre içine penetre olmazlar ve kombine edildikleri diğer kriyoprotektanların çözelti içindeki miktarının düşürülmesini sağlayarak toksisitelerini azaltırlar. Ayrıca sükroz katıldığı ortamda ozmotik tampon olarak rol oynar ve embriyolar üzerindeki ozmotik hasarı azaltır (184). Dimetil sülfoksit kullanarak fare oositleri vitrifiye edildiğinde çözündürme sonrası aneuploidi olgularının arttığı bildirilmiştir (191). Dimetil sülfoksit kullanarak yapılan dondurmalarından sonra meydana gelen fertilizasyon oranlarındaki düşmelerin DMSO'nun, kromozom yoğunlaşması ve

fertilizasyon için gerekli olan mikrotübüller üzerindeki olumsuz etkilerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (191-193). Yapılan yeni bir çalışma DMSO içeren vitrifikasyon çözeltilisinin hücre membranına zarar vermediğini rapor etmiştir (67). Çalışmamızda kullandığımız EG, DMSO, sükröz içeren vitrifikasyon çözeltilisi çözme sonrası yüksek yaşama oranlarıyla bu modelin iyi çalıştığını göstermiştir.

Vitrifikasyon ilk başlarda birçok spekülasyona neden olsa da özellikle erken dönem insan embriyolarının vitrifikasyonunda hem laboratuvar sonuçlarında çözdürme sonrası yüksek yaşama oranları hem de klinikte sağlıklı canlı doğumların rapor edilmesi ile kullanılan yeni dondurma yöntemidir. Son yıllarda yavaş dondurma yöntemine göre daha başarılı çalışmalar rapor edilmiştir (194-197). Daha sonraları oosit vitrifikasyonu (198, 199), yarıklanma ve zigot vitrifikasyonu (88, 89), blastosist vitrifikasyonu (200) için de yöntemin başarısını destekleyici birçok çalışma yapılmıştır. Genellikle erken dönem ve blastosist dönemindeki embriyoların vitrifikasyon sonrası yaşama oranları farklı çalışmalarda benzer ve çoğunlukla %85'in üzerinde bulunmuştur (200-202). İVF hastalarında yapılan bir çalışmada, zigot vitrifikasyonu sonrası % 89 yaşama oranı ve % 28.2 klinik gebelik oranı bildirmiştir (89). Hem blastosist hem de zigot ve yarıklanma evresindeki embriyoların vitrifikasyonu sonrası embriyo transferlerini (dondurulmuş-çözülmüş ET) takiben gebelik oranları, 3. veya 5 gün yapılan taze embriyo transferi gebelik oranları ile benzerlik göstermektedir (88, 203). Hatta son yıllarda yapılan yeni çalışmalar dondurulmuş-çözülmüş embriyo transferinin taze embriyo transferine üstünlüğünü (premature doğum oranları, düşük doğum ağırlığı oranları, ölü doğum oranları ve başarılı implantasyon oranları) destekleyecek verilere sahiptir (204-206).

In-vitro matür hale getirilen oositlerden elde edilen embriyoların dondurulup çözülmesi klinikte yeni bir uygulamadır (10). Vitrifikasyon ile dondurulan *in-vitro* matür oositlerin çözdürülüp fertilize edildikten sonraki transferiyle de sağlıklı canlı doğumlar rapor edilmiştir (207, 208). Çalışmamızda çözme sonrası canlılık oranı % 93.18, yarıklanma oranı % 86.07

olarak bulunmuştur. Bu oran vitrifikasyon sonrası yüksek canlılık oranlarını veren diğer çalışmaları desteklemektedir. Klinik gebelik oranı % 8.82 olarak bulunmuştur. Vitrikasyon sonrası yüksek canlılık ve yarıklanma oranlarına rağmen düşük gebelik oranı, PKOS hastalarının hormon fizyolojisi ile ilgili olabilir. Ayrıca bu düşük gebelik oranı, oositin sağlıklı implantasyonu için gerekli *in-vivo* matürasyon koşullarının *in-vitro* olarak tam sağlanamamış olmasıyla da alakalı olabilir. Oositin *in-vitro* matürasyonu sağlansa bile implantasyon süresince gelişen hücresel mekanizmanın tam bilinmiyor olması bu konuda spekülasyon yapma şansımızı kısıtlamaktadır. Dondurulmuş-çözülmüş oositlerin transferiyle, 900'den fazla canlı doğum sonrası görülen konjenital anomali oranı ile normal doğum sonrası görülen konjenital anomali oranları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (209). *In-vitro* fertilizasyon gebelikleri ile İVM gebelikleri arasında konjenital anomali açısından farklılık saptanamamıştır (210, 211).

Sonuç olarak İVM ovarial stimülasyona ait risklerden arınmış emin bir tedavi yöntemidir. *In-vitro* matürasyon ile vitrifikasyon yöntemi kombinasyonu özellikle YÜT gereksinimi olan yüksek OHSS riski altındaki PKOS'lu kadınlar için uygun görünmektedir. Ayrıca bugün için ülkemizde olmasa da oosit bağışi sonucu gebelik YÜT'de uygulanmaktadır. Fakat İVF'de ekzojen hormon kullanma gerekliliği ve bu tedavi sırasında kısa ve uzun vadedeki riskler oosit donörlerini vazgeçirebilmektedir. Ayrıca PKOS dışı hastalarda da hormon preparatlarının kullanımına bağlı kilo alma, göğüslerde gerginlik, sinirlilik, bulantı, kusma gibi istenmeyen yan etkilerde görülmektedir. *In-vitro* matürasyon bu kişiler için daha cazip bir seçenektir. *In-vitro* matürasyon kanser tedavisi alan haslarda fertilitenin korunmasında da kullanılabilir. Şu anda çocuk istemi olmayan çiftler için geleceği garanti altına almada vitrifikasyonla İVM'in kombine edilmesi de ileride cazip bir uygulama olabilecektir. Vitrifikasyon kolay uygulanabilmesi, maliyetinin düşük olması, çözdürme sonrası yüksek canlılık oranları ve güvenilirliği ile gelecekte uygulanan tek dondurma yöntemi olabilir. Oosit ve folliküler büyüme fizyolojisinin daha iyi anlaşılması ile daha iyi sonuçların alınması mümkün

olacaktır. *In-vitro* matürasyon hem yan etkilerinin daha az olması hem de tedavi maliyetinin düşük olmasıyla, gelecekte pek çok hasta grubu için fertilitenin sağlanması ve korunmasında ümit vaadeden bir yöntemdir, ancak uzun vadede rutin kullanıma girmesi için daha fazla klinik çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Mosher, W.D., Pratt, W.F. (1991). Fecundity and infertility in the United States: Incidence and trend, *Fertility and Sterility*, 56:192.
2. Barbieri, R.L. (2004). Female infertility, In Strauss FJ, Barbieri RL (eds), *Reproductive endocrinology*, Pennsylvania: Elsevier Inc. 5th ed., 663-668.
3. Chian, R.C., Gulekli, B., Buckett, W.M., Tan, S.L. (1999). Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome, *N Engl J Med*, 341:1624.
4. Chian, R.C., Buckett, W.M., Tulandi, T., Tan, S.L. (2000). Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome, *Hum Reprod*, 15:165-70.
5. Cha, K., Han, S., Hyung, M., Chung, H., Choi, D., Lim, J., Lee, W., Ko, J. and Yoon, T. (2000). Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome, *Fertility and Sterility*, 73:978–983.
6. Mikkelsen, A.L., Smith, S., Lindenberg, S. (2000). Impact of oestradiol and inhibin A concentrations on pregnancy rate in in-vitro oocyte maturation, *Hum Reprod*, 15:1685-1690.
7. Cha, K.Y., Koo, J.J., Ko, J.J., Choi, D.H., Han, S.Y., Yoon, T.K. (1991). Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program, *Fertility and Sterility*, 55:109-113.
8. Trounson, A., Wood, C., Kausche, A. (1994). In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients, *Fertility and Sterility*, 62:353-362

9. MacDougall, J., Tan, S.L., Balen, A., Jacobs, H.S. A. (1993). Controlled study comparing patients with, and without, polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilisation, *Hum. Reprod*, 8:233-237.
10. Chian, R., Gulekli, B., Buckett, W. and Tan, S.L. (2001). Pregnancy and delivery after cryopreservation of zygotes produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovarian syndrome, *Hum Reprod*, 16:1700–1702.
11. Loutradi, K.E., Kolibianakis, E.M., Venetis, C.A., Papanikolaou, E.G., Pados, G., Bontis, I., Tarlatzis, B.C. (2008). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis, *Fertility and Sterility*, 90(1):186-193.
12. Moore, K.L., Persaud, T.V.N. (2009). *Before We Are Born Essentials of Embryology and Birth Defect*, Saunders Elsevier.
13. Johnson, M., Everitt, B. (1988). *Essential Reproduction*, Oxford, Blackwell Scientific Publications Third Edition.
14. Austin, C.R., Short, R.V. (1984). *Reproduction In Mamals:3, Hormonal Control Of Reproduction*, Cambridge University Press.
15. Franks, S. (1995). Polycystic ovary syndrome, *N Engl J med*, 333:853-861
16. Stein, I.F., Leventhal, M.L. (1935). Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries, *Am J Obstet Gynecol*, 29:181-9
17. Stein, I.F., Cohe, M.R. and Elson, R.E. (1948). Result of bilateral ovarian wedge resection in 47 cases of sterility, *Am J Obstet Gynecol*, 58:267-273
18. Zawadzki, J.K., Dunaif, A. (1992). Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome, In: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Merriam GR (eds). *Polycystic ovary syndrome*, Boston: Blackwell Scientific Publications, 377-84
19. Aziz, R., Ehrmann, D., Legro, R.S., Whitcomb, R.W., Hanley, R., Fereshetian, A.G., et al. (2001). Troglitazone improves ovulation and

- hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial, *J Clin Endocrinol Metab*;86:1626-1632.
20. Nestler, J.E., Jakubowicz, D.J., Evans, W.S., Pasquali, R. (1998). Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome, *N Engl J Med*, 338:1876-1880.
 21. Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop (2004). Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 81:19-25.
 22. Goldzieher, J.W., Gren, J.A. (1961). The polycystic ovary I. Clinical and histological features, *J Clin Endocrinol Metab*, 22:325-338.
 23. Hatch, R., Rosenfield, R.L., Kim, M.H., Tredway, D. (1981). Hirsutism: implications, etiology, and management, *Am J Obstet Gynecol*, 140:815-830.
 24. Williamson, K., Gunn, A.J., Johnson, N., Milsom, S.R. (2001). The impact of ethnicity on the presentation of polycystic ovarian syndrome, *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 41:202-206.
 25. Carmina, E., Koyama, T., Chang, L., Stanczyk, F.Z., Lobo, R.A. (1992). Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? *Am J Obstet Gynecol*, 167:1807-1812.
 26. Bjorntorp, P. (1988). The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease, *Acta Med Scand Suppl*, 723:121-134
 27. Pasquali, R., Casimirri, F., Cantobelli, S., et al. (1993). Insulin and androgen relationships with abdominal body fat distribution in women with and without hyperandrogenism, *Horm Res*, 39:179-187.
 28. Dunaif, A., Segal, K.R., Futterweit, W., Dobrjansky, A. (1989). Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome, *Diabetes*, 38:1165-1174.

29. Legro, R.S., Finegood, D., Dunaif, A. (1998). A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome, *J Clin Endocrinol Metab*, 83:2694-2698.
30. Polson, D.W., Adams, J., Wadsworth, J., Franks, S. (1988). Polycystic ovaries-a common finding in normal women, *Lancet*, 1:870-872.
31. Chang, R.J., Katz, S.E. (1999). Diagnosis of polycystic ovary syndrome, *Endocrinol Metab Clin North Am*, 28:397-408.
32. Sohrabvand, F., Ansari, Sh., Bagheri, M. (2006). Efficacy of combined metformin-letrozole in comparison with metformin-clomiphene citrate in clomiphene-resistant infertile women with polycystic ovarian disease, *Hum Reprod*, 21:1443-1445.
33. Franks, S. (1989). Polycystic ovary syndrome: a changing perspective, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 31:87-120.
34. Rebar, R., Judd, H.L., Yen, S.S., Rakoff, J., Vandenberg, G., Naftolin, F. (1976). Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome, *J Clin Invest*, 57:1320-1329.
35. Yen, S.S. (1980). The polycystic ovary syndrome, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 12:177-207.
36. Kaiser, U.B., Sabbagh, E., Katzenellenbogen, R.A., Conn, P.M., Chin, W.W. (1995). A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:12280-12284.
37. Gilling-Smith, C., Willis, D.S., Beard, R.W., Franks, S. (1994). Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries, *J Clin Endocrinol Metab*, 79:1158-1165.
38. Nahum, R., Thong, K.J., Hillier, S.G. (1995). Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro, *Hum Reprod*, 10:75-81.
39. Moran, C., Knochenhauer, E., Boots, L.R., Aziz, R. (1999). Adrenal androgen excess in hyperandrogenism: relation to age and body mass, *Fertility and Sterility*, 71:671-674.

40. Yildiz, B.O., Woods, K.S., Stanczyk, F., Bartolucci, A., Aziz, R. (2004). Stability of adrenocortical steroidogenesis over time in healthy women and women with polycystic ovary syndrome, *J Clin Endocrinol Metab*, 89:5558-55562
41. Yildiz, B.O., Gedik, O. (2004). Assessment of glucose intolerance and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome, *Reprod Biomed Online*, 8:649-656.
42. Dunaif, A. (1997). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis, *Endocr Rev*, 18:774-800.
43. Burghen, G.A, Givens, J.R., Kitabchi, A.E. (1980). Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease, *J Clin Endocrinol Metab*, 50:113-116.
44. Legro, R.S., Spielman, R., Urbanek, M., Driscoll, D. (1998). Strauss JF 3rd, Dunaif A. Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome, *Recent Prog Horm Res*, 53:217-256.
45. Yildiz, B.O., Yarali, H., Oguz, H., Bayraktar, M. (2003). Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome, *J Clin Endocrinol Metab*, 88:2031-2036.
46. Crosignani, P.G., Nicolosi, A.E. (2001). Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity, *Hum Reprod Update*, 7:3-7
47. Delilbasi, L., Balaban, B., Ayaz, B. (2000). Gametler (Sperm/Oosit) Fertilizasyon ve Embriyoner Gelisim, Serono Yayinlari.
48. Dattena, M., Ptak, G., Loi, P., Cappai, P. (2000). Survival and viability of vitrified in vitro and in vitro produced bovine blastocysts, *Theriogenology*, 53:1511-1519.
49. Edashige, K., Asano, A., An, T.Z., Kasai, M. (1999). Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture, *Cryobiology*, 38:273-280.
50. Palasz, A.T., Mapletopt, R.J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances, *Biotechnol Adv*, 14:127-149.

51. Uechi, H., Tsutsumi, O., Morita, Y., Takai, Y., Taketani, Y. (1999). Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development, *Hum. Reprod*, 14:2827-2832.
52. Martinez, A.G., Matkovic, M. (1998). Cryopreservation of bovine embryos: slow freezing and vitrification, *Theriogenology*, 49:1039-1049.
53. Van Den Abbeel, E., Camus, M., Van Waesberghe, L., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C. (1997). A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen, *Hum. Reprod*, 12:1554-1560.
54. Van Wagendonk-De Agtendonk-De Leeuw, A.M., Den Daas, J.H.G., RALL, W.F. (1997). Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification of one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution, *Theriogenology*, 48:1071-1084.
55. Rall, W.F., Fahy G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos, *Nature*, 313:573-574.
56. Sagirkaya, H., (2001). Değişik gelişim dönemlerinde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması (Doktora Tezi). U.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
57. Goa, D., Critser, J.K., (2000). Mechanisms of cryoinjury in livin cells, *ILAR*, 41:186-187.
58. Massip, A. (2001). Cryopreservation of embryos of farm animal, *Reprod Dom Anim*, 36:49-55.
59. Eroglu, A., Russo, M.J., Biegonski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H., Toner, M., (2000). Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells, *Nature Biotechnology*, 18:163-167.
60. Agca, Y. (1994). Post-thaw survival and pregnancy rates of intact and biopsied and sexed in vitro produced bovine embryos after vitrification (Master Thesis). University of Wisconsin Madison, Madison WI, USA.

61. Alvarenga, M.A., Alvarenga, F.C., Moreira, R.M., Cesarino, M.M. (2000). Acrozomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Vet J*, 32:541-545
62. Katkov, I.I., Katkova, N., Crister, J.K., Mazur, P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations, *Cryobiology*, 37:325-338
63. Woods, E.J., Gilmore, J.A., Liu, J. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods, *Hum Reprod*, 15:335-343.
64. Yoon, T.K., Kim, T.J., Park, S.E. et al. (2003). Live birth after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization embryo-transfer program, *Fertility and Sterility*, 79:1323-1326.
65. Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C. et al. (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report, *Human Reproduction*, 14:3077-3079.
66. Yoon, T.K., Chung, H.M., Lim, J.M. et al. (2000). Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization embryo-transfer program, *Fertility and Sterility*, 74:180-181.
67. Kartberg, A.J, Hambiliki, F., Arvidsson, T., Stavreus-Evers, A., Svalander, P. (2008). Vitrification with DMSO protects embryo membrane integrity better than solution without DMSO, *Reproductive BioMedicine Online*, 17:378-384.
68. Lim, J.M., Ko, J.J., Hwang, W.S., Chung, H.M., Niwa, K. (1999). Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants, *Theriogenology*, 51:1303-1310.
69. Bağış, H., Odaman, H., Sagırkaya, H., Dinnyes, A. (2002). Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos, *Mol Reprod Dev*, 61:173-179

70. Mcgann, L.E. (1978). Differing action of penetrating and nonpenetrating agents, *Cryobiology*, 15:382-390.
71. Mcwilliams, R.B., Gibbons, W.E., Leibo, S.P. (1995). Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides, *Hum Reprod*, 10:1163-1171.
72. Arav, A., Hehu, D., Mattioli, M. (1993). Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes, *J Reprod Fertil*, 99:353-358.
73. Cabria, E., Anel, L., Herraez, M.P. (2001). Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm, *Theriogenology*, 52:623-635
74. Pugh, P.A., Ankersmith, A.E.L., MCGowan, L.T., Tervit, H.R. (1998). Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival, *Theriogenology*, 50:495-506.
75. Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre H., Dinyess, A., Keefer, C.L. (2003). Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solidsurface vitrification (SSV) methods, *Theriogenology*, 59:1839-1850.
76. Bagis, H., Aktoprakligil, D., Odaman H., Yurdusev, M.N., Turgut, G., Sekmen, S., Arat, S., Çetin, S. (2006). Stable transmission and transcription of Newfoundland ocean pout type III fish antifreeze protein (AFP) gene in transgenic mice and hypothermic storage of mouse gametes with AFP, *Mol Rep Dev*, 73:1404-1411
77. Rall W.F. (1992). Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications, *Anim Reprod Sci*, 28:237-245.
78. Duman, J.G. (1982). Insects' antifreezes and icenucleating agents, *Cryobiology*, 19:613-627.
79. Cseh, S., Corselli, J., Nehlsencannarella, S.L., Bailey, L.L., Szalay, A.A. (1997). The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages, *Theriogenology*, 48:43-50.

80. Park, S.P., Kim, E.Y., Oh, J.H., Nam, H.K., Lee, K.S., Park, S.Y., Park, E.M., Yoon, S.H., Chung, K.S., Lim, J.H. (2000). Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids, *Hum Reprod*, 15:1787-1790.
81. Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals, *Anim Reprod Sci*, 60/61:357-364.
82. Macfarlane, D.R., Forsyth, M. (1990). Recent insight on the role of cryoprotective agents in vitrification, *Cryobiology*, 27:345-358.
83. Kong, I. K., Lee, S. I., Cho, S. G., Cho, S. K., Park, C. S. (2000). Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocyst, *Theriogenology*, 53:1817-1826.
84. Merton, J. S., Oei, C., Otter, Z., Haring, R., Vajta, G. (2001). Effect of cryopreservation method (glycerol, ethylene glycol and open pulled straw) on in vitro survival of slaughterhouse and OPU derived IVP embryos, *Theriogenology*, 55:312.
85. Asada, M., Ishibashi, S., Ikumi, S., Fukui, Y. (2002). Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes, *Theriogenology*, 58:1199-1208.
86. Courtney, B.S., Lane, M., Gardner, D. K. (2006). The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth, *Hum Reprod*, 1:1-7.
87. European Society for Human Reproduction and Emryology [ESHRE] / American Society for Reproductive Medicine [ASRM], (2004).
88. Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S., Kato, O. (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination, *Reproductive BioMedicine Online*, 11:608-614.
89. Al-Hasani, S., Ozmen, B., Koutlaki, N., Schoepper, B., Diedrich, K., Schultze-Mosgau, A. (2007). Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reproductive BioMedicine Online*, Vol 14. No 3. 288-293.

90. Whittemore, A.S. (1993). Fertility drugs and the risk of ovarian cancer, *Hum Reprod*, 8:999-1000
91. Navot, D., Bergh, P.A. and Laufer N. (1992). Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment, *Fertility and Sterility*, 58:249-261.
92. Delvigne, A. and Rozenberg, S. (2003). Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), *Hum Reprod Update*, 9:1-20.
93. Schenker, J.G. and Weinstein, D. (1978). Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey, *Fertility and Sterility*, 30:255-268.
94. Hock, D.L. and Seifer, D.B. (2000). Ovarian hyperstimulation syndrome, *Infertil Reprod Med Clin North Am*, 11:399-417.
95. Schenker, J.G. and Ezra, Y. (1994) Complications of assisted reproductive techniques, *Fertility and Sterility*, 61:411-422 .
96. Brinsden, P.R., Wada, I., Tan, S.L., Balen, A. and Jacobs, H.S. (1995) Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome, *Br J Obste. Gynaecol*, 102:767-772.
97. Serour, G.I., Aboulghar, M., Mansour, R., Sattar, M.A., Amin, Y. And Aboulghar, H. (1998) Complications of medically assisted conception in 3,500 cycles, *Fertility and Sterility*, 70:638-642.
98. Aboulghar, M.A., Mansour, R.T., Serour, G.I., Elattar, I. and Amin, Y. (1992). Follicular aspiration does not protect against the development of ovarian hyperstimulation syndrome, *J. Assist Reprod Genet*, 9:238-243.
99. Rizk, B. and Smitz, J. (1992). Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation for IVF and related procedures, *Hum Reprod*, 7:320-327.
100. Balasch, J., Arroyo, V., Carmona, F., Llach, J., Jimenez, W., Pare, J.C. and Vanrell, J.A. (1991). Severe ovarian hyperstimulation syndrome: role of peripheral vasodilation, *Fertility and Sterility*, 56:1077-1083.
101. Yarali, H., Fleige-Zahradka, B.G., Yuen, B.H. and McComb, P.F. (1993). The ascites in the ovarian hyperstimulation syndrome does not originate from the ovary., *Fertil. Steril.*, 59: 657-661.

102. Cantelli, B. and Recorari, R. (1999). Prevention of ovarian hyperstimulation syndrome.
103. Rizk, B. and Aboulghar, M.A. (1991). Modern management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum. Reprod.*, 6:1082-1087.
104. Rizk, B. and Aboulghar, M.A. (1999). Classification, pathophysiology and management of ovarian hyperstimulation syndrome, In Brinsden, P. (ed.) *In-Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. The Parthenon Publishing Group, New York, London, pp.131-155
105. D'Angelo, A. and Amso, N. (2002). Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review, *Hum Reprod*, 17:2787-2794.
106. Blankstein, J., Lunenfeld, B., Serr, D.M. and Mashiach, S. (1987). Ovarian hyperstimulation syndrome prediction by number and size of preovulatory ovarian follicles, *Fertility and Sterility*, 47:597-602.
107. Edwards, R.G. (1965). Maturation in vitro of human ovarian oocytes *The Lancet I*, 926-929.
108. Veek, L., Wothman, J., et al. (1983). Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization, *Fertility and Sterility*, 39:694-696.
109. Barnes, F., Crombie, A., Gardner, D., Kausche, A., Lacham-Kaplan, O., Suikkari, A.M., Tiglias, J., Wood, C. and Trounson, A.O. (1995). Blastocyst development and birth after in vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching, *Hum Reprod*, 10:3243-3247
110. Cha, K. and Chian, R.C. (1998). Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use, *Hum Reprod Update*, 4:103-120.
111. Chian, R., Gulekli, B., Buckett, W. and Tan, S. (1999). Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval from unstimulated women with infertility due to the polycystic ovary syndrome, *N Engl J Med*, 341:1624–1626.

112. Abdul-Jalil, A., Child, T., Phillips, S., Dean, N., Carrier, S. and Tan, S. (2001) Ongoing twin pregnancy after ICSI of PESA-retrieved spermatozoa into in vitro matured oocytes, *Hum Reprod*, 16:1424-1426.
113. Lin, Y.H., Hwang, J.L., Huang, L.W., Mu, S.C., Seow, K.M., Chung, J., Hsieh, B., Huang, S.C., Chen, C.Y. and Chen, P.H. (2003). Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes, *Hum Reprod*, 18:1632-1636.
114. Child, T., Phillips, S., Abdul-Jalil, A., Gulekli, B. and Tan, S. (2002) A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries, *Obstet Gynecol*, 100(4):665-670
115. Chian, R., Buckett, W., Too, L. and Tan, S.L. (1999). Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin, *Fertility and Sterility*, 72:639-642.
116. Tan S.L., Child, T.J., Gülekli, B. (2002). In-vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries: Predicting the number of immatur oocytes retrieved by early follicular phase ultrasound scan, *Am J Obstet & Gynecol*, 186:684-689
117. Kadoch, I.J., Fanchin, R., Frydman, R. et al. (2007). Controlled naturel cycle IVF: a novel approach for dominant follicle during an IVM cycle, *Biomedicine online*, 14:598-601.
118. Benkhalifa, M., Demiroglu, A., Ménéz, Y.J.R., Balashova, E., Abduljalil, A.K., Abbas, S., Giakoumakis, I., Gurgan, T. (2009). Natural cycle IVF and oocyte in-vitro maturation in polycystic ovary syndrome: a collaborative prospective study, *RBM online*, 18(1):20-36.
119. Barnes F.L., Kausehe, A., Tiglias, J. et al. (1996). Production of embryos from in vitro-matured primary human oocytes, *Fertility and sterility*, 65:1151-1156.
120. Yoon, H.G., Yoon, S.H., Son, W.Y., Lee S.W., Park, S.P., IM K.S., Lim, J.H. (2001). Pregnancies resulting from IVM oocytes collected from

woman with regular menstrual cycle, *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*, 18(6):325-329

121. Le Du, A., Kadoch, I.J., Bourcigaux, N., Doumerc, S., Bourrier, M.C., Chevalier, N., Fanchin, R., Chian, R.C., Tachdjian, G., Frydman, R., Frydman, N. (2005). In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience, *Human Reproduction*, 20(2):420-424
122. Nikas, G., Makrigiannakis, A. (2003). Endometrial pinopodes and uterine receptivity, *Ann N Y Acad Sci*, 997:120-123.
123. Pacey, A.A., Hill, C.J., Scudamore, I.W. Warren, M.A., Barratt, C.L.R., and Cooke, I.D. (1995). The interaction in vitro of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (Fallopian) tube, *Human Reproduct*, 10(2):360-366.
124. Ola, B., Li, T.C. (2006). Implantation failure following in-vitro fertilisation, *Current Opinion in Obstetrics and Gynaecology*, 18:440-445
125. Rogers, P., Leeton. (2000). Uterine receptivity and embryo transfer In: Trounson AO, Gardner DK, eds. *Handbook of in vitro fertilization*, 2 ed., CRC Pres, FL, 499-528.
126. Fitzgerald, C., Zimon A.E., Jones E.E. (1998). Aging and reproductive potential in women, *Yale J Biol Med*, 71(5):367-81
127. Krey, L., Liu, H., Zhang, J., Grifo, J. (2001). Fertility and maternal age strategies to improve pregnancy outcome, *Ann N Y Acad Sci*, 943:26-33.
128. Munne, S., Alikani, M., Tomkin, G., et al. (1995). Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities, *Fertility and Sterility*, 64:382-391.
129. Fahri, J., Ashkenazi, J., Feldberg, D., Dicker, D., Orvisto, R., Ben Rafael, Z. (1995). Effect of uterine leiomyomata on the result of in vitro fertilization treatment, *Hum Reprod*, 10:2576-2578.
130. Goldenberg, M., Sivan, E., Sharabi Z., Mashiach, S., Lipitz, S. and Seidman, D.S. (1995). Reproductive outcome following hysteroscopic

- management of intrauterine septum and adhesions, *Hum Reprod*, 10:2663-2665.
131. Child, T.J., Gulekli, B., Sylvestre, C., Tan, S.L. (2003). Ultrasonographic assessment of endometrial receptivity at embryo transfer in an in vitro maturation of oocyte program, *Fertility and Sterility*, 79(3):656-58.
 132. Speroff, L., Glass, R.H., Kase, N.G. (1994). Assisted reproduction. In Speroff, L., Glass, R.H., Kase, N.G., eds. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Baltimore, Williams & Wilkins, 1133-1148.
 133. Paria, B.C., Reese, J., Das, S.K., Dey, S.K. (2002). Deciphering the cross-talk of implantation, *Advances and challenges, Science*, 296(5576):2185-2188.
 134. Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J., Hesla, J. (1998). A prospective randomized trial of blastocyst and culture and transfer in in-vitro fertilization, *Hum Reprod*, 13:3434-3440.
 135. Sjöberg, O.N., Hamberger, L. (1999). *Blastocyst Development and Early Implantation*, Oxford University Press (Oxford), 29-35.
 136. Herrer, A., Rango, U., Beier, H. (2003). Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation, *Reprod Biomed Online*, 6(2):244-256.
 137. Tulsiani, D.R.P. and Abou-Haila, A. (2000). Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments, *Zygote*, 9:51-69.
 138. Li, H.P., Balmaceda, J.P., Zovues, C., Cittadini, E., Figueroa Casas, P., Johnston, I. and Asch, R.H. (1992). Heterotopic pregnancy associated with gamete intra-fallopian transfer, *Human Reproduction*, 7(1):131- 135.
 139. Reinhart, K.C., Dubey, R.K., Keller, P.J., Lauper, U and Rosselli, M. (1999) Xenoestrogens and phyto-oestrogens induce the synthesis of leukaemia inhibitory factor by human and bovine oviduct cells, *Mol.Hum.Reprod*, 5(10):899-907.

140. Velasquez, L.A., Maisey, K., Fernandez, R., Valdes, R., Cardenas, H., Imarai, M., Delgado, J., Aguilera, J. and Croxatto, H.B. (2001). PAF receptor and PAF acetylhydrolase expression in the endosalpinx of the human Fallopian tube: possible role of embryo-derived PAF in the control of embryo transport to the uterus *Human Reproduction*, 16(8): 1583-1587.
141. Tabibzadeh, S. (1991). Human Endometrium: An Active Site of Cytokine Production and Action. *Endocrine Reviews* vol.12 no.3.
142. Denker, H.W. (1993). Implantation: A Cell Biological Paradox, *J. Zoology*, 266:541-558.
143. Giudice, L.C. (1999). Implantation and endometrial function. Ed. Fauser, B.C.J.M.: *Molecular Biology in Reproductive Medicine*. Chapter 16 ,First ed., Parthenon Publishing, London/New York, 333-352.
144. Baycu, C., Özatik, O., Gürer F., İnalöz, S.S, Gürer, D. (2009). Endometriyum reseptivitesi tuba epitelinin oosit ve embriyo ile otokrin ve parakrin ilişkisine mi bağlıdır? *Anadolu Üniversitesi bilim ve teknoloji dergisi*, 10(1):133-139.
145. Gulekli, B., Buckett, W.M., Chian, R.C., Child, T.J., Abdul-Jalil, A.K., Tan, S.L. (2004). Randomized, controlled trial of priming with 10,000 IU versus 20.000 IU of human chorionic gonadotropin in women with polycystic ovary syndrome who are undergoing in vitro maturation, *Fertility and Sterility*, 82:1458-1459.
146. Zhao, J.Z., Zhou, W., Zhang, W., Ge, H.S., Huang, X.F. and Lin, J.J. (2009). In-vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries in infertile women with polycysticovary syndrome, *Fertility and Sterility*, 91(6):2568-2571.
147. McGee, E., Spears, N., Minami, S., Hsu, S.Y., Chun, S.Y., Billig, H. and Hsueh, A.J.W. (1997). Preantral Ovarian Follicles in Serum-Free Culture: Suppression of Apoptosis after Activation of the Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate Pathway and Stimulation of Growth and

- Differentiation by Follicle-Stimulating Hormone *Endocrinology*, 138(6): 2417-2424.
148. Mikkelsen, A.L. and Lindenberg, S. (2001). Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study, *Reproduction*, 122:587-592.
 149. Mikkelsen, A.L., Smith, S.D. and Lindenberg, S. (1999). In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming, *Human Reproduction*, 14(7):1847-1851.
 150. Tan, S.L., Steer, C.V., Royston, P., Pizk, P., Mason, B.A. and Campbell, S. (1990). Conception rates and in vitro fertilisation, *The Lancet*, 335(8684):299.
 151. Hershlag, A., Floch, J.A., DeCherney, A.H. and Lavy, G. (1990). Comparison of singleton and multiple pregnancies in IVF and ET, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 7(3):157-159.
 152. Papanikolaou, E.G., D'haeseleer, E., Verheyen, G. et al. (2005). Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture: a randomised prospective study, *Hum Reprod*, 20:3198-3203.
 153. Buster, J.E., Bustillo, M., Rodi, I.A., Cohen, S.W., Hamilton, M., Simon, J.A., Thorneycroft, I.H. and Marshall, J.R. (1985). Biologic and morphologic development of donated human ova by nonsurgical uterine lavage, *Am J Obstet. Gynecol*, 153:211-217.
 154. Olivennes, F., Hazout, A., Lelaidier, C., Freitas, S., Fanchin, R., de Ziegler, D. and Frydman, R. (1994). Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage, *Hum. Reprod*, 9:2367-2373.
 155. Artini, P.G., Valentino, V., Cela, V. et al. (2004). A randomised control comparison study of culture media (HTF versus P1) for human in vitro fertilization, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 116:196-200.

156. Veeck, L.L. (1992). Atlas of the human oocyte and early conceptus, Philadelphia: Williams – Wilkins.
157. Henry, S.A. (1985). Maturation of the human oocyte in vitro: nuclear events during meiosis (an ultrastructural study), Gamete Research, 12:237-251.
158. Galli C, et al. (1991). Development of immature bovine oocytes into viable embryos in vitro, Bull Assoc Anat Mar, 75:67-71.
159. Fukuii, Y., McGowan, L.T. (1991). Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro, Journals of Reproduction and Fertility, 92:125-132.
160. A.Trounson A., Anderiesz, C., MJones, G., Kausche, A., Lolatgis, N. and Wood, C. (1998). Oocyte maturation Human Reproduction, 13:52-62.
161. Cıncık, M., Sezen, S., Coskun, Ö., Korkmaz, C., Özsoy, H.M. (2000). Farklı Kültür Ve İnkübasyon Modellerinin Oosit İn-Vitro Maturasyonuna Etkileri, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 20:291-294.
162. Kadam, A., et al. (1991). A follicular fluid factor, inhibiting xenopus oocytes maturation, Endocr Res, 17(3-4):343-355.
163. Veede, L. (1998). Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In: Veede, ed. An Atlas of human Gametes and conceptuses, London, 46-51.
164. Claman, P., Armant, D.R., Seibel, M.M. et al. (1987). The impact of embryo quality and quantity on implantation and the establishment of viable pregnancies, Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 4:218-222.
165. Steer, R., Mills C.J., Tan, S.L. et al. (1992). The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer program, Human Reproduction, 7:117–119.
166. Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, Nature, 164: 666-667.

167. Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, *Reprod Fertil Dev*, 7:871-891.
168. Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Anim Reprod Sci*, 60:481-492.
169. Holt, W.T. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences, *Theriogenology*, 53:47-58.
170. Holt, W.T. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen, *Anim Reprod Sci*, 62:3-22.
171. Leibo, S.P., Brandley, L. (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa, In: C Gagnon (Ed), *The Male Gamet*. Cache River Press, St Louis, 502-515.
172. Edashige, K., Yamaji, Y., Kleinhans, F.W., Kasai, M. (2003). Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation, *Biol Reprod*, 68:87-94.
173. Whittingham, D.G., Leibo S.P., Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 °C, *Science*, 178:411-414.
174. Chen, C. (1986). Pregnancy report after human oocyte cryopreservation, *The Lancet*, 1(8486):884-886
175. Arakawa, T., Carpenter, J.F, Kita, Y.A., Crowe J.H. (1990). The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis, *Cryobiology*, 27 401-415.
176. Chian, R.C., Kuwayama, M., Tan, L., Tan, J., Kato, O., Nagai, N. (2004). High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification, *Journal of Reproduction and Development*, 50:685-696.
177. Trouson, A.O. (1990). Cryopreservation, *Br Med Bull*, 46(3): 695-708.
178. Lopatarova, M., Aech, S. Havlicek, V., Holy, L. (2002). Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated Cows, *Acta Vet Brno*, 71:93-99.

179. Leibo, S.P., Loskutoff, N.M. (1993). Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos, *Theriogenology*, 39:81-94.
180. Baguisi, A., Lonergan, P., Overstrom, E.W., Boland, M.P. (1999). Vitrification of bovine embryos: Incidence of necrosis and apoptosis, *Theriogenology*, 51:62.
181. MacFarlane, D.R. (1987). Physical aspects of vitrification in aqueous solutions, *Cryobiology*, 24:181-195.
182. Park, S.P., Kim, E.Y., Kim, D.I., Park, N.H., Won, Y.S., Yoon, S.H., Chung, K.S., Lim, J.H. (1999). Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grid, *Human Reprod*, 14:2838-2843.
183. Shaw, J.M., Kola, I., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O., (1991). An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution, *J Reprod Fertil*, 91:9-18.
184. Vajta, G., Boothi P.J., Holm, P., Greve, T., Callesen, H., (1997). Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method, *Cryo-Letters*, 18:191-195.
185. Zheu, S.E., Zeng, S.M., Yu, W.L., Li, S.J., Zhang, Z., Chen, Y.F. (2001). Vitrification of in vivo and in-vitro produced ovine blastocysts, *Animal Biotechnology*, 12:193-203.
186. Leeuw, F.E.D., Leeuw, A.M.D., Daas, J.H.G., Colenbrander, B.V., Erkleij, A.J (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing, *Cryobiology*, 30:32-44.
187. Palasz, A.T., Alkemade, S., Mapletoft, R.J. (1993). Sodium hyaluronate as a substitute for biological protein in bovine and mouse freezing. *Cryobiology*, 30:172-178.
188. Leibo, S.P., Oda, K. (1993). High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone, *Cryoletters*, 14:133-144.

189. Bautista, J.A., Kanagawa, H. (1998). Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice, *Jpn J Vet Res*, 45:183-191.
190. Van Langendonck, A., Donnay, I., Labrique, V., Massip, A., Dessy, F., (1997). In vitro production of viable bovine blastocysts in media supplemented with rabbit originated products, *Theriogenology*, 48:1387-1395.
191. Trouson, A.O., Kirby, C. (1989). Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethylsulfoxide, *Fertility and Sterility*, 52(5):778-786.
192. Ullah, N., Shimizu, M., Izaike, Y., Anwar, M. (1997). Survival of bovine oocytes after exposure to ethylene glycol, *Theriogenology*, 47(1):357.
193. Glenister, P.H., Wood, M.J, Kirby, C., Whittingham, D.G. (1987). Incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen thawed oocytes fertilized in vitro, *Gamete Research*, 16:205-216.
194. Saito, H., Ishida, G.M., Kaneko, T. et al. (2000). Application of vitrification to human embryo freezing, *Gynecology and Obstetrical Investigations*, 49:145–149.
195. El-Danasouri, I., Selman, H. (2001). Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos, *Fertility and Sterility*, 76:400-402.
196. Kuleshova, L., Lopata, A. (2002). Vitrification can be more favorable than slow cooling, *Fertility and Sterility*, 78,:449-454.
197. Liebermann, J., Tucker, M.J. (2002). Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification, *Reproduction*, 124:483-489.
198. Antinori, M., Licata, M., Dani, G., Cerusico, F., Versaci, C., Antinori, S. (2007). Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries, *Reproductive Biomedicine Online*, 14(1): 72-79.

199. Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, S.P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes, *Reproductive Biomedicine Online*, 11(3):300-308.
200. Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, C., et al. (2003). Vitrification of human blastocysts with the Hemsli-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing, *Human Reproduction*, 18:1504-1511.
201. Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T. et al. (2003). Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles, *Human Reproduction*, 18:384-391.
202. Huang, C.C., Lee, T.H., Chen, H.H. et al. (2005). Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultrarapid vitrification, *Human Reproduction*, 20:122-128.
203. Choi, D.H., Chung, H.M., Lim, J.M., Ko, J.J., Yoon, T.K., Cha, K.Y. (2000). Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program, *Fertility and Sterility*, 74(4):838-839.
204. Pelkonen, S., Koivunen, R.M, Martikainen, H., Gissler, M., Hartikainen, A.L., Tiitinen A. (2008). Obstetric and perinatal outcome of children born after the transfer of cryopreserved and fresh embryos, *Abstracts of the Scientific Oral & Poster Sessions Program Supplement Fertility and Sterility*, *Abstracts of the Scientific Oral & Poster Sessions Program Supplement*, 90:64-65.
205. Kansal-Kalra, S., Molinaro, T.A, Sammel, M.D. (2008). Viable pregnancies following fresh versus frozen embryo transfer: is there a difference in the rate of serum human chorionic gonadotropin (hCG) rise? *Fertility and Sterility*, *Abstracts of the Scientific Oral & Poster Sessions Program Supplement*, 90:205.
206. Baker, H.W.G., Garrett, C., Breheny, S., Healy, D.L., Jaques, A., Halliday A.J. (2008). Outcomes after ART mainly occur with fresh not frozen embryo transfers: significance and implications? *Fertility and*

Sterility, Abstracts of the Scientific Oral & Poster Sessions Program Supplement, 90:29.

207. Chian, R.C., Gilbert, L., Huang, J.Y.J., Demirtas E., Holzer, H., Benjamin, A., Buckett, W.M., Tulandi, T., Seang, L.T. (2009). Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes, *Fertility and sterility*, 91(2):372-376.
208. Chian, R.C., Huang, J.Y., Gilbert, L., Son, W.Y., Holzer, H., Cui, S.J, Buckett, W.M., Tulandi, T., Tan, S.L. (2009). Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes, *Fertility and Sterility*, 91(6):2391-2398.
209. Noyes, N., Porcu, E., Borini, A. (2009). Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies, *Reproductive Biomedicine Online*, 18(6): 769-776.
210. Buckett, W.M., Chian, R.C., Holzer, H. (2007). Obstetric Outcomes and Congenital Abnormalities After In Vitro Maturation, In Vitro Fertilization, and Intracytoplasmic Sperm Injection, *Obstet Gynecol*, 110:885-891.
211. Banwell, K.M., Thompson, JG. (2008). In Vitro Maturation of Mammalian Oocytes: Outcomes and Consequences, *Semin Reprod Med*, 26:162-174.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Ebru ALÇOLAK
Doğum Yeri ve Tarihi	Almanya, 04/01/1984
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dili	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı 58140 Sivas
E-Posta Adresi	ebrualcolak@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durum

Lise	Seyhan Rotary Anadolu Lisesi 2002
Lisans	Çukurova Üniversitesi 2007
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi 2010

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Yönetim Kurulu Kararı ile Almanya'nın Schleswig-Holstein Üniversitesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İnfertilite ve İVF ünitesi tarafından desteklenmiştir.

