



T. C.

**YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Klinik Embriyoloji Programı

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ICSI UYGULAMALARINDA KÜMÜLÜS HÜCRE KÜLTÜRÜ VE  
SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

**YAVUZ ŞAHİN**

Tez Danışmanı

**Prof. Dr. TÜLAY İREZ**

**İSTANBUL-2017**



**T. C.**  
**YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Klinik Embriyoloji Programı

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ICSI UYGULAMALARINDA KÜMÜLÜS HÜCRE KÜLTÜRÜ VE  
SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

**YAVUZ ŞAHİN**

Tez Danışmanı

**Prof. Dr. TÜLAY İREZ**

**İSTANBUL-2017**

**T.C.  
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Histoloji Embriyoloji Ana Bilim Dalı  
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri  
tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir



Tez savunma tarihi :23.01.2017

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Hüsniye DOĞRUMAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Üye

Prof. Dr. Gül BAKTIR

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi  
Üye

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	II
BEYAN	III
TABLolar	IV
KISALTMALAR	V
BEYAN	VI
Önsöz	VII
GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oogenez	3
2.1. Folikülogenez	5
2.2.a. Primordial Folikil	5
2.2.b. Preantral Folikül	6
2.2.c. Antral Folikül	8
2.3. Oosit maturasyonu	9
2.4. Kümülüs Oosit Kompleksi ve Embriyo İlişkisi	11
2.5. Kümülüs hücreleri	12
2.6. Hücreler arası matris	17
2.7. Pentraksin 3	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Hasta Gurubu	24
3.2. Yöntem	25
3.3. Hastaların hazırlanması	27
3.4. İstatistiksel değerlendirmeler	27
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ	37
7. ÖZET	38
8. SUMMARY	40

## **TABLÖLAR**

Tablo 7.1 : Kontrollü over sitümülasyon yapılan hastaların temel özellikleri

Tablo 7.2 : Transfer gününe göre gebelik ilişkisi

Tablo 7.3 : Oosit kalite derecelendirilmesi ve gebelik arasındaki ilişki

Tablo 7.4 : Regresyon analizi

Tablo 7.5: Embriyo kalite derecelendirilmesi ve Pentraksin (ng/MI) 3 düzeyi arasındaki ilişki

Tablo 5.3 : Elisa testinin hassasiyet değerleri

## **KISALTMALAR**

IVF: İn vitro fertilizasyon

ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

OPU: Oosit toplanma işlemi

OMI: Oosit maturasyonu inhibitörü

FSH: Folikül stimüle edici hormon

LH: Lüteinizan hormon

HCG: İnsan koryonik gonodotropini

ng : Nano gram

ml: Mili litre

HA: Hyarulonik Asit

## **BEYAN**

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

YAVUZ ŞAHİN



## Önsöz

Bu çalışmada tez danışmanlığımı yürüten, bana akademik birikimiyle her zaman destek olan saygı değer hocam Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tülay İREZ' e, tezimin laboratuvar çalışmalarını yürüttüğüm SBÜ Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Laboratuvarının birbirinden değerli ekibine, tezimin hazırlanma aşamasında istatistiksel çalışmalara destek veren Doç. Dr. Enis ÖZKAYA'ya, motivasyonumun düşmesine asla fırsat vermeyen Uzm. Dr. Beyhan SAĞLAM'a içtenlikle teşekkürlerimi sunarım. Verdiği huzur ve sonsuz güven ile en büyük destekçim kıymetli eşime ve kendimi varlıklarıyla her zaman güçlü hissettiğim sevgili kızlarıma sonsuz teşekkür ederim...

## 1. GİRİŞ

Yardımcı üreme tedavilerinde kullanılan teknolojiye en çok yardımcı olan durumlardan biri yüksek implantasyon yeteneğine sahip embriyonun seçimidir. Günümüzde kullanılan seçim basamakları; büyüme oranlarını kapsayan morfolojik kriterler, erken klivaj durumu, fragmentasyon derecesi ve son olarakta blastosistin düzenidir(1). Ancak seçime dair tahmini boyut hala sınırlı bir durumdadır. Çıkan teknolojik gelişmelerle oosit ve embriyo seçimi için invitro fertilizasyonda uygulamalı kullanılabilen yeni biyolojik belirteçler keşfedilmiştir(2).

Objektif ve öngörü potansiyeli yüksek, aynı zamanda başarılı bir fertilizasyonun gerçekleşmesi için destekleyici biyolojik göstergelerin varlığına ihtiyaç vardır. Özellikle oositin doğru seçimi'nin sağlanabilmesi için hem canlılığını sürdürüp hem de moleküler analizinin gerçekleştirilebilmesi pek mümkün değildir bu yüzden oositin etrafındaki folikül sıvısı veya kümülüs ooforus kompleksi bu tür analizler için oldukça uygundur(3). Kümülüs hücreleri oosit kalitesi ve başarılı embriyonun transfer için çok yönlü bir kullanım alanı sergilemektedir. Nitekim bu konuda kümülüs hücrelerinin apoptoz oranları dahi kullanılmıştır(4).

Kümülüs hücreleri oositin mevcut yeteneği mayotik maturasyonu, fertilizasyon ve embriyonik gelişim parametreleri için birer biyolojik belirteç olarak değerlendirilebilir(5). İn vivo şartlarda kümülüs ooforus kompleksinin gelişemediği durumlarda implantasyon başarısızlıklarının olduğu görülmüştür(6). Kümülüs hücreleri bu gibi çalışmalar için kullanılırken kendi yapısal donanımlarında araştırma konusu olmuştur. Özellikle kümülüs hücrelerinde bulunan hücresel dış yapısının oluşumu kümülüs hücrelerinin kalitesi hakkında bilgi vermesi adına incelenmiştir. Pentraxin 3 (ng/ml) adlı

proteinin bahsedilen hücre dışı matriksin oluşumundaki rolü adına; Kümülüs hücreleri ve hücre dışı matriksinde bulunan pentraxin 3 (ng/ml) proteininin oluşturduğu ağı ekstrasellüler matriksin montajıyla ve bu gelişiminde oosit maturasyonu ve başarılı fertilizasyon için imkan sağladığı görülmüştür(7). Pentraxin 3 (ng/ml) proteininin kümülüs hücrelerinde sağladığı optimal genişlemenin doğurganlık adına önemli olduğunu gösteren bir çok araştırma yapılmıştır(8). Çalışmamızda in vitro koşullarda oositlerden oosit etrafından hücrelerin uzaklaştırılması sonrası alınan kümülüs hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu ile elde ettiğimiz kültür sıvısı süpernatantında pentraxin 3 (ng/ml) proteininin analizi yapılarak; oosit maturasyonu, fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarıyla ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Oogenez

Dişi germ hücrelerinin gelişerek olgunlaşmasını gerçekleştirdikleri süreç; oogenesis olarak tanımlanmaktadır. Overlerin gamet oluşumunda ovaryan foliküler gelişim süreci olan folikülogenez ve steroid hormonların yapımı ve salınımını kapsayan steroidogenez gibi etkin iki önemli rolü vardır(9). Overlerin reproduktif fizyolojideki en önemli fonksiyonu olan bu iki süreç çok çeşitli basamaklardan geçerek gerçekleşir. Gebeliğin 5-6. haftalarında genital kabartıya doğru göç eden primordial germ hücrelerine oogonia denir. Oogonialar intrauterin dönemin 6 ile 8. haftaları arası hızlı bir mitotik çoğalma sürecine girerler. İntrauterin dönemin 4. ayında başlayan insan oositindeki mayoz bölünme, folikül hücrelerince salgılanan OMI (oosit maturasyonu inhibitörü) nedeniyle profaz 1'in diploten evresinde primordial folikül olarak beklemelerini sağlar.

Bunlar oogenezisin prenatal evresinde gerçekleşmektedir. Yenidoğan bir kız çocuğunun over korteksinde 700.000 ile 2 000 000 civarında primordial folikül bulunmaktadır. Süre gelen atreziler sebebiyle bu sayı puberteye kadar 400.000 e kadar düşebilmektedir(10). Oogenezin Postnatal evresi; atreziye uğramayan primordial foliküllerin puberte ile birlikte başlayan folikülogenezi sağlayarak ovulasyona kadar gideceği süreçtir.

### 2.2. Folikülogenez

Primordial folikülün seçimiyle başlayarak, ovulasyona kadar geçen süreci folikülogenez olarak tanımlayabilmek mümkündür. Folikülogenez evrelerini primordial folikül, preantral folikül, antral (tersiyer) folikül ve preovulatuvar folikül olmak üzere dört safada sıralayabiliriz.

Foliküller puberte süreciyle artan gonodotropin seviyelerinin etkisiyle gelişip olgunlaşmalarını sürdürürler. Reprodüktif dönemi boyunca bir kadın, fertilizasyon potansiyeli gösterebilecek yetkinlikte yaklaşık olarak 400-500 adet matür oosite sahip olabilir. Gonodotropinlerden FSH ve LH'ın doğrudan etkisi altında gelişen foliküllerde; antral folikül topluluğunun gelişimiyle birlikte foliküllerin belli bir kısmı yükselen FSH 'a yanıt verebilirken, birçoğu erken antral evrede ölmektedir. Yani; kadınların cinsel olgunluk dönemlerinde foliküllerin bazıları atrezi ve apoptozise uğrayabilirken bazıları da gelişimlerini sürdürebilme imkanı bulabilirler.

İnsan granuloza hücreleri folikülogenez süresince oositlerin büyüme ve gelişmesi adına oldukça büyük öneme sahiptirler. Ayrıca endometrial gelişim ve ovulasyon için gerekli hormonların sekresyonunda etkin rolleri mevcuttur(11) .

Granüloza hücreleri ovaryumdaki etkin fonksiyonları ile in vitro çalışmalar için kullanılabilir bir model meydana gelebilmesi açısından kadın üreme sisteminde oldukça önemlidirler(11).

Nitekim yardımcı üreme teknikleri ve in vitro kültür metotlarındaki ilerleme ile birlikte insan granuloza hücreleri; sürdürülebilir kültürlerin oluşturulabilmesi konusunda oldukça elverişli bir konuma erişmişlerdir(12) .

Ovaryen foliküler gelişimin adımlarını tanımlayan yegane anahtar; morfolojik değişimlerdir. Bu değişimlerin ilk; yumurta ve foliküler

öncesi hücrelerden oluşan primodial foliküller değişimdir(13). İkinci değişim ise primordial foliküllerin aktive olarak preantral havuzdaki etkin büyümeye geçişleridir. Preantral gelişim; tek katlı granuloza hücrelerinden çok katlı hücre tabakasına geçişle sağlanır.

Üçüncü değişim olarak tanımlayabileceğimiz Preantral formdan, antral foliküle geçişte ise üç tane yapı taşı sayılabilecek ve oldukça önemli gelişimsel basamak vardır. Bu gelişimsel basamak; preantral granuloza hücrelerinden kümülüs hücrelerine geçiş için gerekli olan morfolojik ve fonksiyonel ayrışmalardır. Bu iki hücre tipi birbirlerinden fenotipik olarakta farklıdır(15).

#### 2.2.a Primordial Folikül

Over korteksinde bulunan foliküller, gelişimlerini burada sürdürürler. Primordial folikül, mayotik profazın diploten evresinde gelişimi durdurulmuş ve etrafı tek katlı, iç formu granuloza hücreleriyle çevrili oositin meydana gelmektedir. Çapları 0.04 mm civarında olan bu foliküller bağımsız bir kanlanmaya sahip olmadıkları için endokrin sistemden aktif biçimde etkilenmezler. Yetişkin ovaryumu inaktif primordial foliküllerden oluşan bir rezerve sahiptir(15) .

Fetal evrede primordial foliküllerin gelişimi epitel yüzeyinden ovigerous kordun invajinasyonu ve oogonia ayrımıyla gerçekleşir(16). Hatta erken aşamada da bu kordlar, bir bazal lamina ile çevresindeki stromadan ayrılır. Primordial folikül içerisindeki tomurcuk yapıdaki bu kordların her biri foliküler bazal lamina tarafından kapsüllenmiş olan büyüyemeyen oosit ve bölünemeyen öncül granuloza hücreleri içerir.

İlk olarak primordial foliküllerin az bir miktarı nedeni bilinmeyen bir mekanizma ile günlük aktive edilir ve böylelikle oosit büyümeye, granuloza hücreleride ayrılmaya başlar. Granuloza hücrelerinin ayrışması için oositin etrafındaki hücre tabakasının sayısı artar ve bazal lamina böylelikle genişler(17).

Granuloza hücrelerini Kuboidal formda çoğalması artık primordial folikülün değişerek primer foliküle dönüşmesidir. Oositin maturasyonu, ovulasyonun sağlanabilmesi ve fertilizasyonun gerçekleşmesi gibi süreçlerde farklılaşmış olan granuloza hücreleri gereklidir(18).

Günümüzde; primer folikülün ovulasyona kadar geçireceği sürecin 85 gün olduğuna inanılmaktadır(19). Bu sürecin FSH' a verilecek yanıt için büyüme dönemi olan kısmı, oldukça uzun olur ve gonodotropinlerden tamamen bağımsız olarak gerçekleşir. İnsan ovaryan foliküllerine bağlı yürütülen çalışmalarda, FSH reseptörleri için gerekli gen ekspresyonu primordial folikülün büyümesi başlayınca gerçekleştiği görülmüştür( 20).

#### 2.2.b Preantral Folikül

Bu safhada oosit büyür ve zona pellusida ile çevrili bir hal alır. Granuloza hücreleri gerekli proliferasyonlarını sağlayarak teka hücrelerine ait tabakalaşmalarını sürdürürler. Bu tabakalardan teka interna; kübik formda hücrelerden oluşan ve gelişmiş bir vaskülele ağa sahip iç tabaka iken, teka eksterna ise vaskülarizasyonu olmayan bir bağ dokusu olarak dışta bulunan tabakadır.

Bu teka hücre tabakalaşması ile gerçekleşen büyüme; artan östrojen yapımıyla uyum içerisinde gonodotropinlere bağımlı bir biçimde devam eder. Preantral foliküle ait granüloza hücreleri androgen ve progesteronlardan ziyade, daha çok östrojen yapımını sağlamaktadır. Ovaryuma ait östrojen yapımını sınırlayıcı bir faktör gibi çalışan aromataz enzim sistemi, androjenleri östrojene çevirir. Bu aromatazasyonu aktive eden FSH; hem östrojen yapımını başlatıp hem de hücre büyüme ve diferansiyasyonunu sağlayacak olan proteinlerin kodlanmasında gerçekleştirir. Bu şekilde; östrojenle gösterdiği sinerjik mitotik etki ile hücreleri büyümeleri için uyarılmaktadır(21).

Preantral ve antral foliküllerde LH hormonu reseptörleri yalnızca teka hücrelerinde bulunurken, FSH hormonu reseptörleri sadece granüloza hücrelerinde bulunur(22).

Granüloza hücrelerine özgü FSH reseptörleri preantral evreye kadar henüz bulunmamaktadır(20). Bu durumun nedeni; folikül stimüle edici hormona (FSH) kendi östrojenik mikro çevrelerini oluşturabilmek amacıyla belirli bir miktarda androgen aromatazasyonu yapabilmek için ihtiyaçlarıdır(23).

Bir folikülün başarısı bu aromatazasyonda saklıdır; androjenik mikro çevrenin östrojenik mikroçevreye dönüştürülebilme yeteneği bu başarının en önemli unsurudur(24). Bu açıdan granüloza hücrelerindeki FSH reseptör içeriği ile östrojen yapımı bir nevi sınırlandırılmaktadır. FSH ve östrojenin granüloza hücrelerindeki sinerjistik etkisi ile proliferasyon ve mitotik etki gerçekleşerek granüloza hücre sayısının artışı da sağlanmış olur.



FSH'in varlığında folikül sıvısındaki ana madde östrojenken, aksi durumda folikül sıvısında androjenlerin hakimiyeti söz konusudur(25). Yüksek orandaki östrojenin varlığındaki bir folikülde gerçekleşen başarılı dönüşümlerin sayesinde artık ovulasyonu sağlayacak olan folikülün seçimine işaret edilmektedir ve bütün bu aşamaları bazı istisnalar hariç tek bir folikül başarabilmektedir(26).

Siklus ortasına kadar normal şartlarda LH folikül sıvısı içerisinde bulunmamaktadır. LH' in antral sıvı ve plazmadaki erken dönemde yükselişi granüloza hücrelerindeki mitotik aktivitenin azalmasına, dejeneratif değişikliklerin oluşumuna ve androjen düzeyinde artışa neden olmaktadır. Bu açıdan FSH ve Östrojenin hakimiyeti granüloza hücrelerinin artışı ve dolayısıyla foliküler büyüme için çok gerekli bir durumudur.

Granüloza hücrelerinde yüksek proliferasyonun sağlanmış olması ve dolayısıyla sağlıklı bir oositin varlığının oluşabilmesi için; antral sıvı içerisinde yüksek östrojen konsantrasyonunun ve düşük miktarda da androjen konsantrasyonunun olması gereklidir(27). Yüksek androjenik ortam granüloza proliferasyonunu engellemekte ve oositte meydana gelebilecek dejenerasyonları uyarmaktadır.

### 2.2.c Antral Folikül

Preantral folikülden antral foliküle geçişin aşamaları sürdükçe kavite oluşturma eğilimide artmaktadır. FSH ve östrojenin sinerjik etkisi sayesinde granuloza hücrelerinin interselüler boşluklarında folikül sıvısı birikimi artar. Bu sıvı birikimiyle oluşan yapıya antrum adı verilir. Bu yapının oluşumu antral folikülünde belirteçdir. Bu safhada; granuloza hücrelerinden oositi çevreleyen kısımdakiler kümülüs ooforusu oluşturur.

Kümüls hücreleri oositle olan yakın ilişkileri ile mineral desteği sağlamak ve maturasyon için gerekli uygun mikroçevreyi oluşturarak sonraki süreç için gelişimsel destekleri sağlarlar(28).

Antral fazda ayrıca oositin yeteneklerinden; nükleer maturasyonun tam olarak sağlanması, ve sitoplazmik maturasyonun gerçekleşmiş olması gibi moleküler sürecin doğru koordinasyonu da gerçekleşir(29).

### 2.3. Oosit maturasyonu

Mayoz bölünme süreciyle oluşan oosit maturasyonu, nükleer ve sitoplazmik olmak üzere iki formda gerçekleşir. Oositin nükleer maturitesinin anlaşılabilmesi; kümüls korona hücre kitlesinin oositin etrafından kaldırılması sonrasında ilk polar cisimciğın görülmesiyle mümkün olabilmektedir.

Nükleer maturasyonu; germinal vezikülün bozulması, kromatin kondensasyonu, mayotik spindle oluşumu, homolog kromozomların ayrılması, sitoplazmanın bölünmesi ve ilk polar cisimciğın atılması, 2. Mayozun gerçekleşerek metafaz aşamasında fertilizasyon için bekleyen oosit olarak tanımlamak doğru olur.

Mayoz 1 in profazının diploten evresinde bekleyen oositlerde nükleer zar ve germinal vezikül bozulmamış durumdadır. Gonodotropin yükselmesi ile birlikte oositin sakin evresi sona erer ve germinal vezikül bozulur. 1. Mayoz bölünmenin profaz evresi homolog kromozomların eşleşmesi ve rekombinasyonu ile tamamlanmış olur. Kondanse formda mayotik iğ oluşumu ve metafaz plağında aynı hizada homolog kromozom çiftleri dizilimi gerçekleşir.

Homolog kromozomların ayrılması metafaz 1 in tamamlaması ile gerçekleşir ve sitoplazma bölünerek ilk polar cisimcik atılır. Bu gelişmeyi takiben oositte 2. Mayoz bölünme başlar ve oosit metafaz aşamasında iken ovule olur. Oosit ikinci mayozun metafaz iki evresinde fertilizasyonun gerçekleşme sürecine kadar bekler. Sperm'in oositi fertilize etmesiyle 2. Mayoz tamamlanır.

Fertilizasyon ile tamamlanan 2. Mayozla artık ikinci polar cisimcikte meydana gelmiş olur. Oositlerin Metafaz 2 evresine ulaşamayanlar fertilizasyon fonksiyonuna sahip olamadıkları gibi embriyo bölünmesine giremezler.

Sitoplazmik maturasyon, nüklear maturasyona göre daha az anlaşılır bilgilere sahiptir. Sitoplazmik olgunlaşmanın yetersiz olduğu durumlarda ortaya çıkan sitoplazmik anomalilerin derecesinin fertilize olma kabiliyeti ve ardından gerçekleşecek embriyonal gelişim kapasitesi üzerine etkisi hala tartışma konusudur(30). Bir görüşe göre sitoplazmik anomalilerin dişi gamet hücrelerinde gözlemlendiği zamanla çok uyumlu olduğu düşünülmektedir. Örneklenecek olursa; fertilizasyon başarısızlığı ve anöplöidi ile maturasyonun erken döneminde var olan sitoplazmik anomalilerle ilişkili olduğu düşünülmektedir(31) .

Fertilizasyonun olmasına rağmen gelişimsel başarısızlıklarında maturasyonun ileriki evrelerinde var olan anomalilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bütün bunların yanında sitoplazmik anomaliler açısından yapılan araştırmalarda ortaya çıkan sonuç; birkaç dismorfik yapının embriyo

gelişim parametreleri üzerinde etkin rol üstlendiğidir. Maturasyonun erken evrelerinde Germinal vezikülün dağılımı ve sitoplazmada maturasyon için bir etkileşim oluşturduğu muhtemeldir.

Buna bağlı olarak bağımsız gerçekleşebilen yönlerinde olduğu düşünülse de sitoplazmik maturasyon; nüklear maturasyonun gerçekleşmesiyle oositin fertilizasyon ve embriyonik gelişim süreçleri için gerekli donanıma sahip olması durumuyla anlaşılabilir(32) .

Özellikle fertilizasyonun gerçekleşebilmesinde uygun koşulların oluşabilmesi için nüklear ve sitoplazmik maturasyonun birlikte gerçekleşmesi gereklidir. Bu iki önemli adımın asenkronizasyonu farklı şekilde oosit anomalilerine neden olduğu belirlenmiştir(33).

#### 2.4 Kümüls Oosit Kompleksi ve Embriyo İlişkisi

Gametlerin kalitesi embriyo için en önemli unsurdur. Günümüz şartlarında yürütülen yardımcı üreme tedavilerinde; gametler morfolojik kriterlere göre değerlendirilmektedir. Oositelerin ışık mikroskobu düzeyinde incelenerek görülebilen morfolojik düzensizlikler fertilizasyon için doğru oositin seçimi için kullanılabilmesinin elverişli olduğu iddiası söz konusudur.(34) Fakat morfolojik değerlendirmeler embriyonun kalitesini yüksek ölçüde tahmin edebilmemizi sağlayan bir kriter değildir.

Morfolojik olarak anormal kabul edilebilecek embriyoların kromozomal anomalileri %70-80 oranında iken normal olanlarda oran %40'larda bulunmaktadır (35). İyi kalitedeki embriyonun belirlenmesi için günümüzde uygulanan IVF programlarında farklı farklı metodlar

önerilmektedir. Embriyo morfolojisinin temel alındığı embriyo değerlendirilmesinde; transfer gününe kadar yapılan çeşitli gözlemlerle implantasyon yeteneğinin en yüksek olduğu düşünülen embriyolar seçilmektedir. Bu morfolojik değerlendirmelerden biride Hyarülonik asit salınımı için genişlemiş granüloza hücreleri oluşmuş bir korona kitlesinin olması(34) durumudur.

Granüloza hücrelerinin oositin seçiminde göstereceği katkı ile buna bağlı gelişecek embriyonun potansiyeli ile yapılan gözlemlerde; korona radiata hücrelerindeki sitoplazmik uzantı yolları zona pellusidaya geçiş ve oositin maturasyon işlemlerindeki söz konusu değişimi bu gibi bağlantılar sağladığı (36) ve iletişim sağlayan bağlantılı yapılardaki aksaklıkların oosit sitoplazmik maturasyonunu ve bu nedenle balastosist oranlarını etkilediği görülmüştür(37). Embriyo seçiminde ıvf sonrası kullanılan kriterler; klivaj oranları ve hücre fragmentasyon düzeyleridir(38). Oosit ve kümülüs hücreleri arasında oositin büyümesi için çift yönlü kendi aralarında küçük moleküller ve besin geçişini sağlayan ve birlikte oositin erken embriyo gelişimini desteklemesi için moleküler bir mekanizma ile destekleyen karşılıklı geçiş vardır(39).

Bu karşılıklı iletişimin bir diğer kanıtıda; kümülüs ooforus farklılaşmasının oositten alınan sinyaller doğrultusunda gerçekleşmesi(40) ve ayrıca oosit gelişiminin son aşamalarında kümülüsler tarafından desteklendiği iyi bilinir(41). Bu yaklaşımla, oositin yeterli donanıma sahip olması ve fertilizasyon sonrası gelişimin öngörüsü adına kümülüs hücrelerinin kullanımı, embriyonik gelişim parametrelerini belirlemek için bir biyolojik bir belirteç olabilir(42).

Memelilerde oositler somatic hücrelerle karşılıklı bir ilişki içerisinde büyüme ve gelişmelerini sürdürürler. Preantral folikülde; oositin büyüme işleyişi tam olarak farklılaşmamış granuloza hücreleriyle yakın ilişkili olarak gerçekleşir.

Oositin son büyüme fazı olan foliküler antrumun oluşumunda granuloza hücreleri; fonksiyonel ve anatomik olarak iki ayrı tipte farklılaşırlar. Bunlardan ilki; başlıca steroidojenik etki sağlayan, folikül duvar hücrelerini oluşturan mural granuloza hücreleri diğer ise oositle yakın ilişki halinde olan kümülüs hücreleridir.(43) Antral kavitenin kenarında ovulasyona hazır bir formda granuloza hücreleriyle çevrili ovumun oluşturduğu tümsek yapıya kümülüs ooforus adı verilir(44).

Kendine ait sitoplazmik uzantıları ile zona pellusidayı geçerek oosit plazmolemmasına ulaşan kümülüs hücreleri; oositin maturasyonunda gerekli maddelerin birçoğunu sağlar. Kümülüs hücreleri endokrin ve parakrin özellikler taşıyan özelleşmiş hücrelerdir(45). Bu durumu destekleyen bir çalışmada; kümülüs hücreleri tamamen uzaklaştırılmış oositlerde maturasyonun düşük düzeyde bir oran ile gerçekleştiği fakat kümülüs hücrelerinden ayrılmamış oositlerde in vitro maturasyon oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür(46). Kümülüs hücrelerinin varlığının; mayotik maturasyon ve kümülüs hücre genişlemesinin sağlanabilmesi için gerekli olduğu çalışmalar oldukça çoktur (47).

Foliküler gelişim süresinde etrafında buldukları oositle yakın ilişki içerisinde olan kümülüs hücreleri, gerçekleşen apoptosiz artışı ölçüsünce oosit kalitesine katkılarını sürdürürler(48).

Kümülüs hücrelerinin büyümesi siklusun orta fazında ki LH hormonu veya dışardan alınan HCG hormonu ile gerçekleşir. Kümülüs hücrelerinde gerçekleşen bu büyüme fertilizasyon için ideal oositin varlığını oluşturabildiğinde bir göstergesidir(49).

Kümülüs hücreleri yüksek özelleşmiş zonal geçiş sağlayan çıkıntılar ve geçit bağlantılardan (gap junction) oluşmuş ayrıntılı bir donanıma sahip olan kümülüs oosit kompleksi denen yapıyı oluştururlar(50). Farklı inhibitör ve aktivatörler ile oosit üzerinde çok önemli etkileri olan kümülüs hücrelerinin oluşturduğu bu kompleks yapı ideal oositin seçiminde bir kriter olarak değerlendirilmektedir(51).

Oosit ile yakın ilişkide olarak granüloza hücrelerinden köken alan ve oosit ile sinyal iletişimine dair sağlam kanıtları bulunan kümülüs ooforus kompleksi; oositin sitoplazmik gelişiminin desteklenmesini sağlayarak sürekli olarak oosit ile iletişim halindedir. Oosit ve kümülüs ooforus kompleksi arasında yaygın bir ağ sistemi olan ve bu iletişimi sağlayan mekanizmalar geçit bağlantılardır(52).

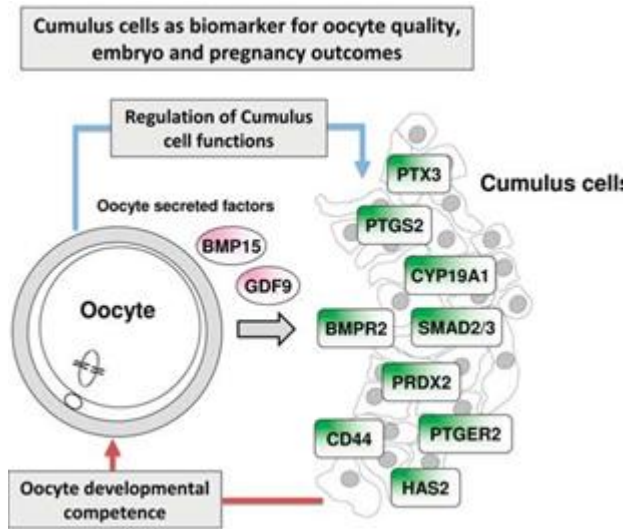
Birçok çalışmada kümülüs ooforus kompleksin fertilizasyonun gerçekleşmesi için yararlı etkilerinden; (53) spermin seçilmesi, penetrasyonu ve kapasitasyonunu teşvik etmesine dair bahsedilmiştir. (54) Kümülüs hücrelerindeki gelişimin in vitro şartlarda sperm aktivasyonu ve motilitesi için uygun şartların oluşumuna büyük katkı sağladığı ortaya koyulmuştur(55) .

Kümülüs ooforus kompleksinin başarılı bir fertilizasyon sürecinde oositin etrafına bulunurken gerçekleştirdiği yapısal düzenleme etkileri veya

kendi fonksiyonel yapısının infertilite üzerine etkisi oldukça çöktür. Bu duruma ilavaten kümülüs ooforus kompleksiin yapısal formunun tanımı fertilizasyon açısından bir sayısal öngörü skoru olarak kullanılabilmektedir.(56) Fakat ıvf öncesinde kullanılan tekniklerden oositin morfolojik olarak skorlanması ve kümülüs ooforus kompleksinin bahsettiğimiz skorlaması subjektif özellikler içerdiğinden dolayı şüpheli doğruluk gösterir ve bu durum embriyologların kendi kararına bırakılır(57).

Son yıllarda kümülüs ooforus kompleksinin gen ekspresyonuna dair yapılan çalışmalarda oositin maturasyonu, fertilizasyon yeteneği ve embriyo kalitesi hakkında öngörü değeri oluşturacak sonuçlara varmıştır(58).

Oositin yetkinliği üzerinde yapılan çalışmaların çoğu in vitro şartlarda yürütölmüştür. Kümülüs hücrelerinin oosit üzerine; mayotik maturasyon ve metabolik düzenlemede katkı sağlayan moleküler desteği sağladığı, oosit maturasyonunda etkili sinyalizasyonların oluşturulabilmesi ve sperm kapasitasyonu gibi önemli etkileri vardır. Bütün bunlar in vitro maturasyon süreçlerinde, kümüüslü ve kümüüsten arındırılmış oositlerde farklı gerçekleşen gelişim potansiyelleri olarak net bir şekilde görölebilmektedir(59).





Şekil 1: Oositin ve kümülüs hücreleri arasındaki karşılıklı ilişkinin anlatılmaktadır. Oositin kümülüs hücrelerinde yapmış olduğu düzenlemeler ve oositin gelişimsel kapasitesine kümülüs hücrelerinin verdiği katkılar gösterilmiştir(62).

Kümülüs hücreleri ve oosit arasındaki çift yönlü iletişimin gelişimsel anlamda çok önemli olduğuna dair çalışmalar söz konusudur(64). Bu iletişim; in vitro maturasyon sürecinde in vivo maturasyona göre stres altında yürümektedir. In vivo kaynaklı kümülüs ooforus kompleksi ile maturasyonu in vitro sağlanmış kümülüs ooforus kompleksinin gen ifadeleri ve hücresel işlevsellikleri açısından farklılıklar olması ve oosit gelişim kapasitesinin in vitro şartlarda etkilendiği görülmüştür. (65)Bu konu fareler üzerinde in vivo ve invitro kümülüs hücrelerinde gen ekspresyonları ve farklı başka çalışmalarda desteklenmiştir(66).

İn vivo şartlarda normal olarak oositin gelişmesi için kümülüs ooforus kompleksinin genişlemesi zorunludur, genişlemenin gerçekleşemediği durumlarda implantasyon potansiyeli oldukça sınırlı düzeydedir(67). Kümülüs ooforus kompleksinde gerçekleşen genişleme, hiyaluronik asit tarafından desteklenir(68).

Genişlemenin gerçekleşmesi esnasında kümülüs hücreleri, spermin penetrasyonuna ve fertilizasyona izin veren ve fimbriyal yakalamayı kolaylaştıran bütün bu olanaklara imkan veren hyalüronik asit sekresyonunu sağlar(69) .

Kümüls hücrelerindeki genişleme potansiyelini kadınların yaşına bağı olarak üreme konusundaki mevcut dezavantajları, yumurtanın fonksiyonel veya yapısal kalite düşüşünde etkileyebileceği düşünülmüştür(70). Kümlüs hücrelerinin oositin transportunda dahi önemli fonksiyonları olduğunun belirten çalışmalar mevcuttur.

Ovaryum yüzeyine dallanarak adeta bir saçak şeklinde uzanan fimriyaların ileri geri hareketi ve silyalar tarafından oluşturulan akımla oosit tuba uterinaya atılır(71). Tavşanlar üzerinde yapılan bazı deneysel çalışmalarda oositin fimbriyalar tarafından tutulup taşınma süreçlerini kolaylaştırılmasında oostin etrafını kuşatan hücrelerin rolü olduğu görülmüş. Bu duruma; fimbriya sillerinin yüzeyi ve kümlüs hücreleri arasındaki etkileşimi sağlayan bir moleküler mekanizmanın olduğu düşünülmüştür(72).

Nitekim bir çalışmada Ovulasyon öncesi neuroaminidaz ile muamele edilen fimbriyaların sillerinin yüzeyinde bulunan adheziv moleküllerini ayırdığı bu nedenle oositin fimbriyalar tarafından yakalanamadığı gözlemlenmiştir(73).

Ayrıca tuba uterinada bulunan ampullanın çapı ovulasyonla atılan oosit ve etrafındaki hücrelerin birlikte oluşturduğu çap ile türler içerisinde değişiklik gösterebilmektedir(74). Örneğin insanlarda proliferasyonu sağlanmış kümlüs hücreleri nedeniyle daha geniş bir ampulla bölgesi bulunurken; (75) farelerde ise daha ince bir kümlüs ooforus bulunduğundan ampulla orta derecede bir genişliğe sahiptir(76).

## 2.6 Hücre Dışı Matris

Folikl logenez sürecinde meydana gelen değişiklikler ile hücrelerin sıralanış ve fonksiyonları açısından bir dizi değişikliklerin olduğundan bahsetmiştik. Ovulasyon  ncesi meydana gelen hücresel büyüme ve sayıca oğalmaların herbiri diğeri ile ilişkili seri işlemler dizisidir.

Tek katlı hücre tabakasından çok katlı ve sıralanış özellikli hücreler topluluğunun; ovulasyon ve sonrası yetkinliğin oosit açısından tam ve verimli olabilmesi için gerçekleşen  n hazırlıklardandır.

Kümülüs hücrelerinde gerçekleşen genişleme hemen hemen bütün memeli türlerinde araştırılmıştır. Bu genişlemenin infundibulum tarafından oositin alınabilmesine kazandırdığı işlevselliği yönünden ve oviduktaki fertilizasyon sürecine kattığı imkanlarda dahil olmak üzere bir çok çalışma yapılmıştır(77). Bu durumları destekleyici bazı çalışmalarda bileşimsel olarak yetkin ve tam bir kümülüs hücre matriks oluşumunun oosit kalitesiyle doğrudan ilişkili olduğu gözlemlenmiştir(78).

Hücre dışı matriks çapraz bağının fizikokimyasal özelliklere bağlı değişimleri ve fonksiyonel aktivitesi yeterince anlaşılamamıştır. Buna rağmen en açıklayıcı örnek olarak çapraz bağlanmış matriks; kümülüs oosit kompleksi matriksidir(79).

Hücre ve matriksin etkileşimiyle hücrelerin dış uyanarlara verdiği cevapların modülasyonları tarafından doğru ya da dolaylı olarak hangi hücrenin olduğunu anlamada önemli bilgiler verebilmektedir.

Araştırmacıların foliküler matriksten yana beklentileri; foliküllerin büyüme ve atrezi süreçlerinde hücre ve doku biyolojisi bağlamında gerçekleşen basamakların kontrolüne dair bilgi verebilmesidir(80).

Hücre dışı matriksin çok farklı rolleri bulunmaktadır. Bunlarda göç, bölünebilme, farklılaşma, hücre ölümü, hücre desteklenmesi gibi hücrenin şekil ve davranışsal etkilerini içerir. Bütün bu davranışlar foliküler gelişimle birlikte ortaya çıkar. Ayrıca besin, hormonlar ve hücre dışı sinyallerin hedef hücreye ulaşabilmesi matriksin bu transfere müdahalesiyle gerçekleşebilir. Matriks; foliküllerde bulunan büyüme faktörlerini bağlamaya yönelik yeteneklere de sahiptir(81). Hücre dışı matriks özelleşmiş mikro çevreyi sağlamada etkindir. Bu nedenle hücre ve doku arasındaki ikili fonksiyonları belirlemede etkindir(79).

Ovulasyon oranları (82), kümülüs hücrelerindeki sinyalizasyonun gerçekleşebilmesi (83), kümülüs ooforus kompleksinin yapışma ve invazyonel kapasitesi (84) ve moleküler filtrasyonun sağlanabilmesi açısından (85) kümülüs hücrelerindeki ekstrasellüler matriks; oldukça büyük önem arz etmektedir.

İn vivo şartlarda ki bütün olumlu gelişimlerin in vitro şartlarda yakalanabilceğini düşünmek doğru olmaz. Özellikle in vitro maturasyon sırasında kullanılan teknikler nedeniyle maturasyon ile oluşan kümülüs hücre matriksinin gelişimsel ve fonksiyonel olarak değişime uğradığını ve bu durumdaki oositlerin kalitesindeki düşüşten anlaşılacağı (86) düşünülmektedir.

İn vitro şartlarda hücrelerin moleküler temelde yeterliliklerinin oluşamayacağı kümülüs matrix gen ekspresyonlarının in vitro şartlarda kısaltıldığı açık olarak kanıtlanmasıyla doğrulanmaktadır. Bu eksiklik doğrudan oosit gelişimindeki zayıflık olarak ortaya çıkarmaktadır(87).

Kümülüs kompleksinin genişlemesi için yeni sentezlenen kümülüs hücre matriksinin üzerinde kalpainsin aracılı olarak kümülüs hücrelerinin göçünün sağlanabilmesi gereklidir. İn vitro şartlarda yapılan gözlemlerde kümülüs hücrelerindeki hareketliliklerin oosit üzerindeki etkileşimleriyle ilgili henüz bir belirginlik gözlemlenmemiştir(88).

Kümülüs hücrelerinin gelişimsel açıdan oosite besin maddelerin sağlanması ve substratların temini için sağladıkları metabolik destek yapılan son dönem çalışmalarıyla çok fazla önem arz etmektedir(89). Kümülüs hücrelerinde enerjinin sağlanması, ekstrasellüler matriks substratları, nükleik asit sentezi ve strese karşı koruma için kümülüs hücrelerinin birincil substratı glikozdur(90).

Kümülüs matriksinin kümülüs hücrelerinden oosite metabolik desteğin sağlanması için gerekli sinayalleri koruduğu ve kümülüs hücrelerindeki glikolitik metabolizmasının oosit tarafından regüle edilen genler tarafından sağlandığı gözlemlenmiştir(91,92). Kümülüs yelpazesinin yüksek oranda glikolitik aktiveye sahip olma gerekliliğini, oositin büyük çoğunlukta oksidatif fosforolizasyonu kullanması nedeniyle olduğu bilinmektedir(93).

İn vivo ve in vitro şartların oluşturduğu ortam bir kümülüs

ooforus kompleksinin gelişim yeteneği ve metabolik yetkinliğini doğrudan etkiler(94). Bu duruma verilebilecek en iyi örnek maternal hiperglisemi ve hiperlipidemisi olanların kümülüs ooforus kompleksi gelişimi ile dolaylı olarak embriyo gelişimi ve gebelik sonuçlarının tehlikede olmasıdır(95). Buna rağmen steroid sentezi ve kolesterol metabolizması haricinde kümülüs hücrelerinde ki lipid sentez metabolizması çok iyi bilinmemektedir(96).

İn vitro maturasyon süreçlerindeki eksik kalan metabolik desteğin glikolitik yol ile sağlandığının görüşü nedeniyle glikolitik eksikliklerin oositin gelişim potansiyelinde negatif etkiler doğuracağı düşünülmektedir(97). İn vitro maturasyon ile olgunlaşmış kümülüs hücrelerinde büyük olasılıkla glutamin fruktoz 6 fosfat transaminaz ve hiyarulonik asit sentetaz 2 ekspresyonunu inhibe edildiği için glikoz bağımlı hiyaluronik asit matriks üretimi hataları görülebilmektedir(98).

İn vivo şatlarda olgunlaşan matriksin, glikoz gibi metabolitlerin sınırlı difüzyonunu ve prostaglandin e2 için gerekli sinyal moleküllerini saptadığı görülmüştür. Kümülüs hücrelerindeki bu filtrasyon özelliği in vitro maturasyonda ekiltili olarak yürür(84).

## 2.7 Pentraksin 3

Pentraxinler siklik nümerik yapı ile korunan protein ailesindedir(99). C reaktif protein ve serum amyloid bileşeni olan klasik pentraksinler inflamasyonun aracılığıyla cevap olarak karaciğerde üretilen bir akut faz proteinleridir. (100)

Bu proteinlerden; Pentraksin 3 (ng/MI) somatik ve immun hücre tipleri tarafından eksprese edilen ve kümülüs hücrelerinde inflamasyonel uyarılara yanıt veren bir ekstrasellüler matriks proteindir.(101) Pentraksin 3 (ng/MI) proteini uzun pentraksin ailesinin bir prototipi olarak kadın kısırlığında çok kritik bir rol oynar(102).

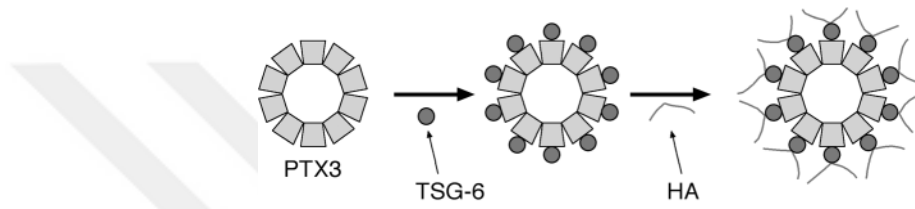
Son yapılan çalışmalarda kümülüs hücrelerinde bulunan ekstrasellüler matriksin kümülüs hücre stabilitesinin sağlanmasıyla pentraksin 3 (ng/MI) proteininin doğrudan ilişkisi olduğu gözlemlenmiştir(103). Ovulasyonda kümülüs matriks kısmının sentezi ve bir kaç saat sonra düşüşünün oosit ve kümülüs hücreleri tarafından proteaz üretiminin artışına rastlanmaktadır(104).

Pentraksin 3 (ng/MI) proteininin yetersizliğine bağlı olarak gelişen kümülüs hücrelerinin bütünlüğündeki kayıp hala bilinmemektedir. Pentraksin 3 (ng/MI) proteininin antiproteolitik aktivitesi ve folikül duvarındaki gerekli proteazdan ekstrasellüler matriksi ve oositi korumak için önemli fonksiyonları olduğu ortaya koyulmuştur(105).

Kümülüs hücrelerinde bulunan matriks tekrarlayan disakkaritlerden oluşan n-asetilglukozamin ve glukoronik asit içeren glikozaminoklikan formdaki hıyarulonik asit içermektedir. Hıyarulonik asitin (HA) üretim ve depolanması için bazı gonodotropinler aktif rol oynar(105).

Kümülüs ooforus un genişlemesi ve viskoelastik yapısını kazanması için gerekli büyük bileşen hıyarulonan (HA) dır(106).

Preovulatar fazda pentraxin 3 (ng/MI) proteini tsg 6 proteini ile bağlanarak çok kararlı bir hyaluronan ağı oluşturur(107). Bu ağ; ekstrasellüler matriksin montajı ve kümülüs hücrelerinin genişlemesiyle oositin maturasyonu, ovulasyon ile birlikte oositin follopian tüplerden etkin geçişin sağlanabilmesi ve başarılı fertilizasyonun gerçekleşebilmesine imkan sağlar(76).



Şekil 2: Kümülüs hücre matriksinde TSG 6 ile pentraksin 3 (ng/MI) bağlanarak hyarulonun ağı oluşturması(108).

Çalışmalara dair elde edilen raporlarda ovaryumdan çıkarılırken hatalı kümülüs hücresi donanımlarında eksik pentraksin 3 (ng/MI) proteini varlığı ovulasyon ve fertilizasyon için kusurlar oluşturduğu görülmüştür(109).

Son birkaç yıldır rapor edilen bulgulara göre kümülüs hücre matriksinin in vitro şartlarda elzem olmadığı fakat in vivo fertilizasyonda çok önemli bir anahtar rol üstlendiğini ortaya koymaktadır. (109) Knockout farelerinde yapılan çalışmalarda pentraxin 3 (ng/MI) proteininin azalmasına bağlı olarak kümülüs ooforus hücrelerinde genişleme ve in vitro fertilizasyon başarısızlıkları gözlemlenmiştir (76).

Kümülüs hücrelerindeki optimal genişlemenin doğurganlık için gerekliliği göz önüne alındığında pentraksin 3 (ng/MI) preteininin



işlevsel mekanizması ve regülasyonunu kümülüs hücrelerinin genişlemesiyle ilişkisi ovaryum biyolojisi adına oldukça önemli bir araştırma konusudur(8). Bu durumu destekleyen bir çok çalışmada gerçektende pentraksin 3(ng/MI) regülasyon seviyelerinin oosit kalitesi ve fertilizasyon oranları açısından pozitif bir korelasyon gösterdiği belirtilmiştir(110).

### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

Tablo 3.1. Kullanılan Kimyasal Madde Ve Çözeltiler

ÜRÜN	MARKA	KATALOG NO
G-1 Plus	Vitrolife	1540
G-IVF Plus	Vitrolife	1540
HTF Fertiliz. Med.	Life Global	3412
Global protein free cleavage Med.	Life Global	7051
Global protein free blast.Med.	Life Global	7051
HTF/HEPES Dış ortam Med.	Life Global	4345
Protein supplement	Life Global	8083
Hyaluonidase (Protein free)	Life Global	0530
Paraffin Oil (Protein free)	Life Global	4991
PVP	Life Global	1809
Human Pentraxin 3/TSG-14 Quantikine ELİSA	Life Global	

#### 3.1. Hasta Gurubu

Çalışmamıza Kasım 2015 ve Mart 2015 tarihleri arasında kısırlık tedavisi için Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Kliniğine başvurmuş 31 çift dahil edildi.

Açıklanamayan infertilite (Sperm değerleri normal kabul edilen erkek ve over rezervi normal, follopian tüp geçişi aktif olan, FSH hormonu serum düzeyinde 10 mIU/ml altında olan kadın) tanısı konmuş çiftlerden seçilmiştir.

### 3.2. Yöntem

Ovulasyon indüksiyonunu takiben antral folikül sayımı gerçekleştirildi ve HCG (Pregnyl) enjeksiyonunu takiben 36. Saatte yumurta toplama işlemi gerçekleştirildi.

USG eşliğinde toplanan oositler HTF Fertilizasyon medimu (Life Global) içerisinde 2-4 saat süresince inkübatör ortamında tutuldu. Daha sonra hyarulonidaz (Life Global) ile denudasyon işlemi yapılarak ICSI için hazırlandı. ICSI işleminden sonra oositler HTF fertilizasyon medyumunda (Life Global) bekletildi. ICSI işlemini takiben 16-18 saat sonra fertilizasyon kontrolü yapılarak ardından, global cleavage medyumunda (Life Global) embriyolar kültüre edildi. Embriyo değerlendirilmesi Alpha Eshre, ASRM 2011 konsensusuna göre yapıldı (111) . Hastalardan elde edilen embriyoların kümülatif değerlendirilmesi yapılarak %70 ve üzeri iyi embriyosu bulunan hastanın kümülatif değerlendirmesi 1, % 70 -%20 arasında olanlara 2, %20 ve altında iyi embriyo taşıyanlara ise 3 skor verilerek değerlendirmeye alındı.

Oositlerden granüloza hücrelerinin uzaklaştırılması işlemi sonrası arta kalan kümülüs hücreleri G-1 plus mediumu ( Vitro Life) ile iki kere yıkandı. Makler kamera yardımıyla yıkama mediumu içerisindeki hücreler sayılarak 5milyon/ml olacak şekilde ayarlanarak kültür kaplarına alındı ve üzeri 1 ml ye tamamlanacak şekilde G IVF Plus medyumunu (Vitro Life) eklenerek 24 saatlik bir inkübasyona tabi tutuldu. Kültür sonrası alınan hücre süspansiyonu 5.000 Rpm de 10 daki santrifüjlenerek süpernatantlar numaralandırılmış tüplere alınarak analizin yapılacağı süreye kadar dondurularak muhafaza edildi.

Semen analizi WHO 2010 kriterlerine göre yapıldı ve dansite gradient yöntemi ile iyi kaliteli spermier izole edildi (Who 2010). 18 mm ve üzeri folikül çapına sahip olan foliküllerden elde edilen oositler ICSI uygulanarak fertilizasyon gerçekleştirildi ve embriyo takibine alındı. Kültür ortamına ait bu süpernatantlar; Enzyme immunoassay (ELİSA) yöntemiyle analizleri yapılarak pentraxin 3 proteininin konsantrasyonu (ng/MI) hesaplandı. Numaralandırılmış polipropilen tüplere ( ½ oranında seyreltilmiş) kalibratör seyreltici eklendikten sonra, mikro plaka üzerindeki her kuyucuğa hazırlanan 20 µL standarttan koyuldu ve üzerine 100 µL Assay eklendi. Mikro plakanın eklenen numunlerin karışımı için 500 ± 50 rpm'de ayarlanmış yatay yörünge mikropakası çalkalayıcıda oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi.

Ardından her oyuğa 200 uL Human Pentraxin 3 Conjugate ekleyin. Yeni bir yapışkan şeritle örtün. Çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Işıktan koruyarak her göze 50 µL Stop Solution ekleyip, Kuyulardaki renk maviden sarıya dönmesini gözlemlendi. 450 nm ayalı optik okuyucuda sonuçlar değerlendirildi.

Tablo 5.3 Elisa testinin hassasiyet değerleri

Numune	Deney içi hassasiyet			Testler arası hassasiyet		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	40	40	40
Değer (ng/mL)	2.61	7.72	14.1	2.75	7.94	14.5
Standart sapma	0.10	0.28	0.62	0.17	0.39	0.60
CV (%)	3.8	3.6	4.4	6.2	4.9	4.1

### 3.3.Hastaların Hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen hastaların tümüne kontrollü ovaryan stimülasyon, olarak antagonist protokoller uygulandı. Ve folikülometrik takiplerle belirli büyüklüğe gelen foliküllerin ovule olmasının sağlanabilmesi için Rekombinant Koryonik Gonodotropin enjeksiyonu yapıldı.36 saat sonra ultrason yardımıyla oositlerin toplanma işlemi gerçekleştirildi.18 mm ve üzerinde olan foliküller toplandı.

### 3.4. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS 25 (Statistical Package for Social Science) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tamamlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında T testi, Mann Whitney-U ve Cqi-square testleri kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirildi.

#### 4. BULGULAR

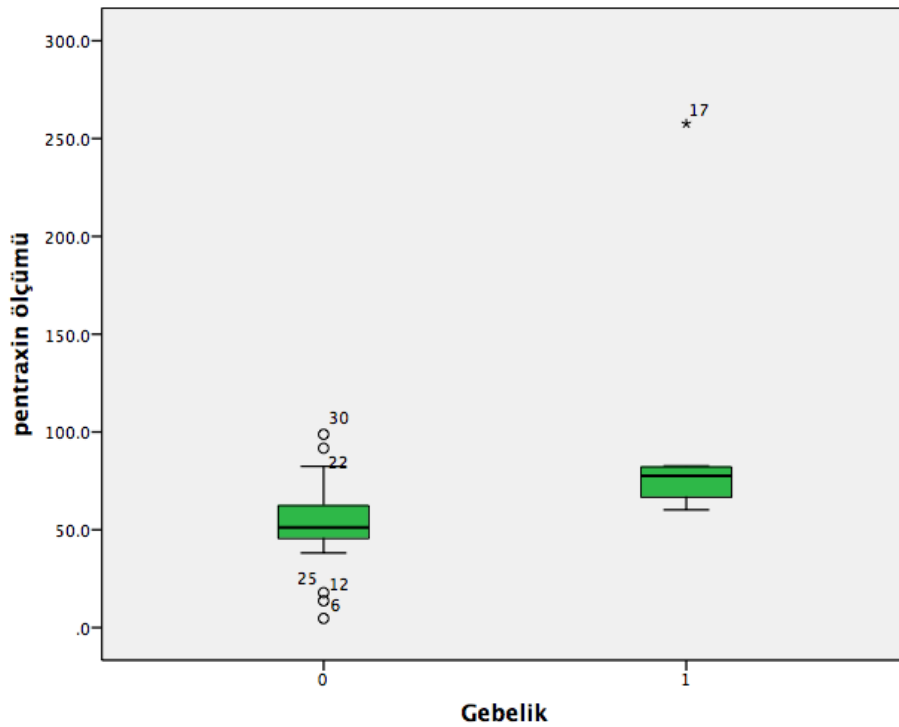
Çalışmamızda yumurtanın etrafındaki hücrelerden uzaklaştırılması sonrası alınan ve 24 saat inkübe edilerek kültürü yapılan kümülüs hücrelerinin, kültür sıvısında yapılan analizle pentraksin 3 (ng/ml) protein düzeyleri incelenerek embriyo kalitesi ve implantasyon açısından öngörü değeri incelenmiştir.

Hastaların oosit toplama işlemi sonrası yapılan denudasyon ile uygun şartlarda toplanan kümülüs hücreleri 24 saatlik bir inkübasyon sonrası kültür sıvısından alınan süpernatant pentraksin 3 (ng/ml) proteini ölçümü için analiz edilmiştir.

İki grubun demografik ve klinik karşılaştırılmasında; kümülüs hücre kültürü süpernatantında ölçülen Pentraxin 3 (ng/ml) protein düzeyleri anlamlı farklı saptanmıştır. Bununla birlikte kültür sıvısı Pentraxin 3 (ng/ml) düzeyleri gebe kalan grupta yüksek olarak izlenmiştir. (Tablo 7.1, Şekil 3-Şekil4)

Tablo 4.1: Kontrollü Over Sitümulasyonu Yapılan Hastaların Temel Özellikleri

	Gebelik yok		Gebelik var		P değeri
	Ortalama	Standart deviasyon	Ortalama	Standart deviasyon	
Yaş	30.00	3.833	32.00	3.512	0.182
Antral folikül	12.83	4.361	12.00	4.041	0.532
İnd.dozu	2158.33	945.058	2135.71	1113.352	0.800
İnd.günü	9.21	2.043	8.57	1.902	0.532
Endometrial kalınlık	10.97	2.426	9.90	0.993	0.274
Top.oosit	8.25	4.561	8.29	3.039	0.661
MII oosit	6.13	4.266	6.57	2.440	0.627
MIIoosit/Top oosit	0.71	0.26	0.79	0.14	0.438
M1	1.50	0.972	1.40	0.548	0.859
GV	3.25	2.053	2.00	1.414	0.533
Pentraxin3 (ng/ml)	53.228	21.9207	98.986	70.4547	0.005



Embriyonun transfer gününe göre, gebe kalan ve kalamayan grupların karşılaştırılmasında tablo 7.2 de herhangi bir farkın saptanmadığı belirtilmiştir.

Tablo 4.2 : Transfer Gününe Göre Gebelik İlişkisi

	<b>Gebelik yok</b>	<b>Gebelik var</b>	<b>Toplam</b>	<b>P değeri</b>
<b>2. gün</b>	3	1	4	0.417
<b>3. gün</b>	16	6	22	
<b>4. gün</b>	5	0	5	
<b>Toplam</b>	24	7	31	

Oosit derecelendirilmesi açısından 1. derecede kaliteye sahip oosit ve 2. derece kaliteye sahip oosit tablo 3' te karşılaştırılmıştır ve iki grup arasında Pentraxin 3 (ng/MI) protein düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanamamıştır. (82.8 versus 54.3) (Tablo 7.3 )

Tablo 4.3 : Oosit Kalite Derecelendirilmesi Ve Gebelik İlişkisi

	<b>Gebelik yok</b>	<b>Gebelik var</b>	<b>Toplam</b>	<b>P değeri</b>
<b>Oosit skoru 1</b>	7	3	10	0.495
<b>Oosit skoru 2</b>	17	4	21	
<b>Toplam</b>	24	7	31	

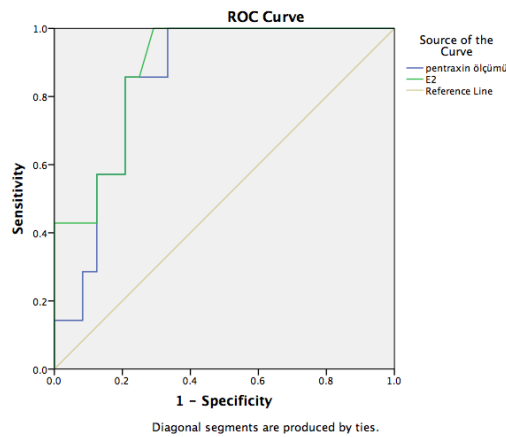
Çok değişkenli regresyon analizinde kümülüs hücre Pentraxin 3 (ng/MI) protein düzeyleri modele dahil edildiğinde Pentraxin 3 (ng/MI) proteinin (beta katsayısı:0372, P:0.013) gebelikle ilişkili olduğu saptanmıştır (Tablo 7.4 ).

Tablo 7.4: Regresyon Analizi

Model	Standardize olmayan katsayı		Standardize katsayı	t	P değeri
	B	Standart hata	Beta		
Sabit	-.358	.129		-2.782	.010
Pentraxin ölçümü	.004	.001	.385	2.796	.009

ROC analizinde kümülüs hücre kültürü sonrası alınan süpernatantta ölçülen Pentraxin 3 (ng/MI) proteini (AUC:0845, P:0.006 ) değeri gebelik için anlamlı bir şekilde öngörücü nitelik taşıdığı izlenmiştir.(şekil4 )

Gebeliği öngörmede optimal kümülüs hücre Pentraxin 3 (ng/MI) değeri 64.25 olarak saptanmıştır. Bu değer ile %86 sensitivite , %80 spesifisite değeri elde edilmiştir.



Şekil 4:



Embriyo derecelendirilmelerine göre ayrılan guruplarda bakılan kümülüs hücre Pentraxin 3 (ng/MI) düzeyi anlamlı olarak farklı saptanmıştır. En yüksek değerler iyi kalite embriyoyu oluşturan oositlere ait kümülüs hücre kültürü sıvılarında elde edilmiştir ( Tablo 7.5 ).

Tablo 4.5 : Embriyo kalite derecelendirilmesi ve pentraksin (ng/MI) 3 düzeyi arasındaki ilişki

	<b>N</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Standart Deviasyon</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>	<b>P Değeri</b>
<b>1.kalite embriyo</b>	20	77.9	44.4	48.80	257.60	0.028
<b>2.kalite embriyo</b>	7	39.3	16.5	13.67	55.00	
<b>3.kalite embriyo</b>	4	33.9	19.9	4.70	47.80	
<b>Total</b>	31	63.5	41.7	4.70	257.60	

## 5.TARTIŞMA

Başarılı bir fertilizasyon ve implantasyon için oositin kalitesi çok önemlidir. Oositin kalitesini değerlendirilmesinde otoritelerin tam fikir birliği sağlanmış olmasada genel görüş kümülüs oosit kompleksinin morfolojik değerlendirilmesidir.

Morfolojik değerlendirilmelerin görecelik oluşturması nedeniyle doğru oositin seçimi için farklı biyolojik belirteçlerin kullanılmasına dair ihtiyaç doğmuştur. Bu konuda oositle doğrudan değerlendirme imkanı bulunamayacağından oosite doğrudan pozitif katkıları olan ve oositle karşılıklı iletişim halinde olduğu kümülüs hücreleri mevcut ihtiyaç için çok önemli bir biyolojik belirteç görevi üstlenebilir(41).

Günümüzde kümülüs hücrelerinin, kültür ortamlarınca değerlendirilmeleri veya gen ekspresyonlarına dair yapılan çeşitli çalışmalarla, bu hücre grubunun oositin olgunlaşma ve embriyo potansiyeli adına çok önemli öngörüler yakalanmıştır(60).

Kümülüs hücrelerinin kendi potansiyel güçlerinin de bir şekilde doğru gelişimleriyle ilişkili olduğu aşıkardır. Kümülüs hücrelerinde bulunan ekstrasellüler matriksin bu hücelere kazandırdığı elastikiyet yeteneği hücrelerin genişlemelerine imkan sunmaktadır(105). Kümülüs hücrelerinin genişlemelerinin in vivo koşullarda sperm kapasitasyonu, oositin ovulasyon sürecinde infundibulum ile alınabilmesine sağlanan olanakla, ve ekstrasellüler matriksin oluşumunda büyük payı vardır(57, 76).

Kümülüs hücrelerinde ekstrasellüler matriksde domine olan ve kararlı bir ağ oluşturarak hiyaluronan bağlanmasına imkan veren pentraksin 3 proteini üreme sistemi için oldukça önemli bir proteindir.(76,78 ) Bir çok

çalışmada bu proteinin eksik olduğu kümülüs hücrelerinin çevrili olduğu oositlerde gelişimsel eksikliklerin olduğu gözlemlenmiştir(108). Zhang ve arkadaşları 2003 de kümülüs hücrelerinde gen ekspresyonlarına dair yaptıkları analizlerde ve Pentraksin 3 ekspresyonunun oosit kalitesi ile ilişkisini ortaya koyan çalışma yapmışlardır.(112).

Kümülus hücre fonksiyonu ile oositin gelişim potansiyeli arasındaki ilişki pek çok araştırmaya konu olmuştur. IVF uygulamalarında invaziv olmayan seçim yöntemleri gereklidir, bu nedenle indirekt olarak kümülüs granülosa hücrelerinin metabolizmaları üzerinde durulmaktadır.Bu amaçla R.A.Anderson ve arkadaşlarının 2009 da yaptıkları çalışmada 674 oositte elde ettikleri kümülüs hücrelerinde kantitatif RT-PCR yöntemi kullanarak gen ekspresyonları araştırıldı. BDNF ve GREM 1 ekspresyonlarının fertilizasyon ve embriyo kalitesi ile ilişkisi gösterildi(113).

K.M. Gebhardt ve arkadaşları insan kümülüs hücrelerinde gen ekspresyonlarının klinik gebelik ve canlı doğum ile ilişkisini incelediler ve tek embriyo transferlerinde aday molekül tespitini yapmak istediler(115). Bu amaçla metabolik süreci ilgilendiren ALDOA, LDHA, PFKP ve PKM2, sinyal işleminde etkili olan AHR, GREM1, PTGS2,STS ve hücre dışı matriks ile ilişkili HAS2, PTX3, TNFAIP6 ve VCAN genlerinin ekspresyonunu incelediler. Pentraksin 3 mRNA ekspresyonunun gebe olan grupta yüksek olduğunu buldular. VCAN,PTGS2 mRNA ekspresyonunun doğum ile sonuçlanan gebeliklerle pozitif ilişkisini saptadılar. Biz de Çalışmamızda kümülüs hücre pentraksin sekresyonunun embriyo kalitesi ile ilişkisini gösterdik ( tablo 5)

Çalışmamızda kümülüs hücre kültürlerinde pentraksin

sekresyonun implantasyon başarısına ulaşmış embriyo gruplarında yüksek olduğunu tespit ettik. Bu sonuç gen ekspresyonu çalışmalarını doğrulamaktadır. Çalışmamız sonucunda, yardımcı üreme tedavilerinde gametlerin doğru seçimi ve gebelik başarısına giden yolda yeterli olmayan morfolojik kriterlerin yanında pentraxin 3 gibi biyolojik belirteçlerin kullanılmasının gerekliliğini gördük(8).

Kümülüs ve granuloza gen ekspresyonları ve gebelikle ilişkisi konusunda Richard J Kordus ve Holly A LaVoie tarafından bir derlemede (114) bireysel oositle bağlantılı kümülüs ve Mural Granuloza hücreleri, biyolojik belirteçleri belirlemek için değerli bir kaynak olabileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmada özetle ovulasyon indüksiyon protokollerinin kümülüs ve mural granuloza hücrelerinde farklı gen ekspresyonlarına neden olduğu, yaş, vücut kitle indeksi ve diğer faktörler hasta seçimi konusunda granuloza hücresi biyobelirteçlerinin belirlenmesinde önemlidir.

Ayrıca sperm faktörünün de dikkate alınması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca canlı doğum için belirteçlerin tek folikül ile sınırlandırılması ve tek embriyo transferlerinde dikkate alınması gerektiğini araştırmacılar düşünmektedirler.

Konu ile ilgili çalışmalarda çoğunlukla mural granuloza ve kümülüs hücrelerinin oluşturduğu hücre topluluklarında gen ekspresyonu çalışmalarının yapıldığı anlaşılmaktadır. Oysaki mural granuloza ve kümülüs hücrelerinin bin üzerinde farklı gen ekspresyonlarını yaptığı çalışmalarla ortaya konmuştur(115).

Bizim çalışmamız açıklanamayan infertil olgularda yapıldı. Bu nedenle sperm faktörü elimine edilmiş olmaktadır. Ancak kuşkusuz implantasyon ile ilgili çok fazla faktörün bulunduğunu gözardı edemeyiz. Çalışmamız pentraksin 3 (ng/ml) proteinin önemini ortaya koymaktadır.



## 6. SONUÇ

Çalışmamızda açıklanamayan kısırlık tanısıyla kliniğimize başvuran çiftlerden oositlerin toplanması ve denudasyonu sonrası kalan kümülüs hücrelerinin kültürleri yapılarak pentraxin 3 (ng/MI) proteininin ölçümü yapılmıştır.

Kümülüs hücre kültürü yapılan oositlerin; ICSI işlemi sonrası, embriyonal gelişim ve implantasyon başarıları gözlemlenerek ölçümü yapılan pentraxin 3 (ng/MI) proteininin gebelik ve embriyo kalitesi ile olan ilişkisi araştırılmıştır.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında kümülüs hücrelerinde bulunan pentraxin 3 (ng/MI) protein konsantrasyonlarının, intrastoplazmik sperm injeksiyonu ile elde edilen embriyonun implantasyon kabiliyeti ve dolayısıyla gebelik ve embriyo kalitesi ile olan ilişkisini tanımlamada önemli bir belirteç olarak kullanılabileceği, fakat pentraxin 3 (ng/MI) proteinin öngörü etkisinin farklı çalışmalarla değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

## 7. ÖZET

Günümüzde yardımcı üreme tedavilerinde kullanılan tekniklerden kullanılan gamet ve embriyo değerlendirme kriterleri çoğunlukla morfolojik temellidir. IVF/ICSI uygulamalarının gebelikle sonuçlanan başarısı aslında birçok farklı faktörün etkisi altındadır. Oldukça çok sayıda olan bu faktörlerden en önemli olanlarından biri gametlerin doğru seçimidir. Bu çalışma oosit gelişim potansiyeline aktif destek veren kümülüs hücrelerinin doğru oositin seçimi, implantasyon ve gebelik öngörüsü olasılığında bir rolü olup olmadığını araştırmak amacı ile planlandı.

Bu çalışmada ICSI uygulanan olgularda embryo kültür ortamında bulunan pentraxin 3 konsantrasyonunun embryo implantasyonunu öngörmedeki prediktif değerinin tespiti amaçlandı. ICSI uygulanan 31 açıklanamayan infertil olgu çalışmaya dahil edildi. Prospektif olarak bazal ve over stimülasyon karakterleri değerlendirildi. Oosit toplanamayan veya fertilizasyonu olmayan olgular çalışmadan çıkarıldı.

OPU günü her bir olgudan mililitrede 5 milyon kumulus hücresi elde edilecek şekilde hücre süspanسیونları hazırlandı ve 24 saat inkübe edilmek üzere kültür kaplarına yerleştirildi. Inkübasyon sonrası alınan kültür sıvısı santrifüjlenerek elde edilen supernatant uygun ortamda saklandı. Kültür sıvısı süpernatantında pentraxin 3 (ng/MI) konsantrasyonu analiz edilerek çıkan sonuçlar ile embryo implantasyonu oranı arasındaki ilişki incelendi.

Kültür sıvısında bulunan pentraxin 3 (ng/MI) konsantrasyonu ile embryo implantasyon oranı arasında istatistiki olarak anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0.500$ , )

P=0.005). Embryo implantasyonu olan ve olmayan olgularda kültür sıvısı pentraxin 3 (ng/MI) oranları anlamlı düzeyde farklı idi, gebe olan grupta 1,85 katı daha yüksek bulundu (98.9 vs.53.2, P=0.005, Mann Whitney-U). Kültür medium pentraxin 3 (ng/MI) konsantrasyonu başarılı embryo implantasyonunun belirleyicisi olabileceği düşünülmektedir (AUC =0.845, P=0.006). % 86 sensitivite ve %80 spesifisite ile optimum eşik değeri 64.25 idi.

Çalışma sonucunda kümülüs hücre kültüründen alınan süpernantanttan pentraxin 3 (ng/MI) konsantrasyonunun başarılı embryo implantasyonunu öngörebilir nitelikte olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Oosit kalitesi, Kümülüs hücresi, Hücre dışı matriks, Pentraxin 3



Today gamete and embryo evaluation criteria used in assisted reproductive treatment techniques are mostly morphological basis. The chances of success in pregnancy are in fact influenced by many different factors. One of the most important of these factors, which are quite numerous, is the right choice of gametes. Cumulant cells that actively support oocyte development potential have been investigated as a predictor of correct oocyte selection, implantation and pregnancy prospects.

The aim of this study was to assess the predictive value of serum pentraxin 3 (ng/ml) concentrations on embryo implantation in women underwent ICSI cycles.

Our study included 31 women with unexplained infertility who were scheduled for ICSI cycles. All baseline and ovarian stimulation characteristics were recorded prospectively. Subjects with failed fertilization or no oocyte yield were excluded from the study. At the day of oocyte pick up, cumulus cells that corresponds to 5 million cells/ml were obtained from each participant to be analysed for pentraxin 3 (ng/ml) concentration. Association between the culture media pentraxin 3 (ng/ml) concentrations and embryo implantation were analysed.

There was a significant correlation between the culture media pentraxin 3 (ng/ml) concentrations and embryo implantation ( $r=0.500$ ,  $P=0.005$ ). There was a significant difference between women with and without successful interms of culture media pentraxin 3 (ng/ml) concentrations (98.9 vs.53.2,  $P=0.005$ , Mann Whitney-U). Culture media pentraxin 3 (ng/ml)

concentrations was a significant predictor for successful embryo implantation (AUC=0.845, P=0.006). Optimal cut off value was obtained at 64.25 with 86 % sensitivity and 80 % specificity.

The study concluded that the concentration of pentraxin 3 (ng/ml) from the supernatant from the cumulus cell culture was predictable for successful embryo implantation.

Key words: Oocyte quality, Cumulus cell, Extracellular matrix, Pentraxin 3

## 9. KAYNAKLAR

- 1)Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003; 9:251 – 262.
- 2)Hillier SG. Research challenge: what is the best non-invasive test of oocyte/embryo competence? *Mol Hum Reprod* 2008;14:665.
- 3)L. Matos, D. Stevenson, F. Gomes, J.L. Silva-Carvalho, and H. Almeida Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells: *Molecular Human Reproduction*, Vol.15, No.7 pp. 411– 419, 2009
- 4)Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:490 – 498.
- 5)McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2004;19:2869 – 2874.
- 6)Veek L (1999) *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. Parthenon, New York.
- 7)Salustri, A., Garlanda, C., Hirsch, E., De Acetis, M., Maccagno, A., Bottazzi, B., et al., 2004. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* 131, 1577– 1586.
- 8)Hsun-Ming C, Lanlan F, Jung-Chien C, Christian K, Ying-Pu S, Peter C.K. L. Growth differentiation factor 8 down-regulates pentraxin 3 in human granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 404 (2015) 82–90
- 9)Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr. Rev* 1996;17:121-155
- 10)Anvar A, Moussa MD. In vitro maturation of oocytes. *OBGYN.net advertisement*. january:2002
- 11) Ching-Yu Ch, Mei-Chi H, Hsin-Fu C, Li-Hui T, Chun-Ying Y, Lee S, Hsiang-Po H, Hong-Neng H and Hung-Chih K Granulosa cell-derived induced pluripotent stem cells exhibit pro-trophoblastic differentiation potential. *Chuang et al. Stem Cell Research & Therapy* (2015) 6:14
- 12) Kossowska-Tomaszczuk K, De Geyter C, De Geyter M, Martin I, Holzgreve W, Scherberich A, et al. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from

mature ovarian follicles. *Stem Cells*. 2009;27:210–9.

13) Soyal, S.M., Amleh, A., Dean, J., 2000. FIG $\alpha$ , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127, 4645–4654

14) Eppig, J.J., 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122, 829–838

15) Antczak M and Van Blerkom J (2000) The vascular character of ovarian follicular granulosa cells: phenotypic and functional evidence for an endothelial-like cell population *Human Reproduction* 15 2306–2318

16) Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ and McNatty KP (2002) Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep *Biology of Reproduction* 66 1134–1150

17) Rodgers RJ, Lavranos TC, van Wezel IL and Irving-Rodgers HF (1999a) Development of the ovarian follicular epithelium *Molecular and Cellular Endocrinology* 151 171–179

18) Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M & de Kruif A 2002 Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 61 414–424. (doi:10.1002/mrd.10102)

19) Gougeon A, Dynamics of follicular growth in human: a model from preliminary result, *Hum Reprod* 1:81,1986

20) Oktay K, Briggs DA, Gosten RG, Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles, *J Clin Endocrinol Metab* 82;3748, 1997.

21) Yong EL, Baird DT, Hillier SG, Mediation of gonadotropin-stimulated growth and differentiation of human granulosa cells by adenosin 3'5'-monophosphate: one molecule, two messages, *Clin Endocrinol* 37:51, 1992

22) Yamoto M, Shima K, Nakano R, Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle, *Hor Res* 37(Supply):5,1992

23) McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ, The production of progesterone, androgen, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro, *J Clin Endocrinology Metab* 49;687, 1979

- 24) Greisen S, Ledet T, Ovesen P, Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells, *Hum Reprod* 12 (Suppl):127,2001
- 25) McNatty KP, Markris A, DeGraziak C, Osathanondh R, Ryan KJ, steroidogenesis by recombined follicular cells from the human ovary in vitro, *J Clin Endocrinol Metab* 51:1286,1980
- 26) Goodman AL, Hodgen GD, The ovarian triad of the primate menstrual cycle, *Recent Prog Horm Res* 39:1, 1983
- 27) Andersen CY, Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization, *J Clin Endocrinol Metab* 77:1227; 1993
- 28) Eppig JJ 1991 Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *BioEssays* 13 569–574. (doi:10.1002/bies. 950131105)
- 29) Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L & Robert C 2003 The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reproduction Supplement* 61 117–129
- 30) Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech* 1990; 16:3244-346
- 31) Otsuki J, Okada A, Morimoto K, et al. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in M2 human oocytes. *Hum Reprod* 2004; 19:1591-1597
- 32) Swain EJ, Smith; Mechanism of oocyte maturation. In: Tan SL, Chian RC, Buckett WM editors. *In-Vitro Maturation of Human Oocytes, Basic Science to Clinical Application*, 1st ed. Montreal, Informa Health Care press. 2007; p: 83-101
- 33) Rienzi L, Ubaldi FM, Lacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Litwicka K, Greco E. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 2008; 90(5): 16092-1700.
- 34) Laura R, Basak B, Thomas E and Jacqueline M. The Oocyte. *Human Reproduction*, Vol.27, No.S1 pp. i2– i21, 2012
- 35) Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J and Cohen J (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 8,2185 – 2191.

- 36)Allworth AE & Albertini DF 1993 Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Developmental Biology* 158 101–112. (doi:10.1006/dbio.1993.1171)
- 37)Ali A, Paradis F, Vigneault C & Sirard M-A 2005 The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development* 71 358–367. (doi:10.1002/mrd.20281)
- 38)Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G and Gerris J (2001) Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum Reprod* 16,326– 332.
- 39) Zuccotti M, Giorgi Rossi P, Martinez A, Garagna S, Forabosco A, Redi CA. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. *Biol Reprod* 1998;58:700 – 704.
- 40)Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, Wigglesworth K, Oocyte control of granulosa cell development: how and why, *Hum Reprod* 12(Suppl):127,1997
- 41)Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47:23 – 32.
- 42)McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2004;19:2869 – 2874
- 43)Robert B. Gilchrist, Michelle Lane and Jeremy G. Thompson. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, Vol.14, No.2 pp. 159–177, 2008
- 44)Leeson TS, Leeson CR, Poparo AA. *Text/ Atlas Histology*.W.B Company.Harcourt Brace Jovanovich, 1988.
- 45)Russell DL, Salustri A, Extracelular matrix of the cumulus-oocyte complex.*Semin Reprod Med* 2006;24:17-227
- 46)Younis AI, Brackett BG, Fayrer HRA.Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation in vitro.*Gametes Res.*1989;23:189-201.
- 47)SoomAV, Kruif AD.Oocyte maturation, sperm capacitation and preimplantation development in the bovine:implications for in vitro production of embryos. *Reprod Dom Anim.* 1996;31:687-701.

- 48)Wit AA, Wurth YA, Kruip TA.Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci.* 2000; 78:1277-1283
- 49)Veek L (1999) *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses.* Parthenon, New York.
- 50)Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001;121:647 – 6
- 51)Hernandez-Gonzales I, Gonzales-Robayna I, Simada M, Vayne CM, Ochsner SA, White L, Richards JS, Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neural and immune-related genes:does this expand their role in the ovulation process. *Mol Endocrinol.* 2006;20: 1300-21
- 52)Furger C, Cronier L, Poirot C, Pouchelet M. Human granulosa cells in culture exhibit functional cyclic AMP-regulated gap junctions. *Mol Hum Reprod* 1996;2:541 – 548.
- 53)Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002;61:414 – 424.
- 54) Eisenbach M. Sperm chemotaxis. *Rev Reprod* 1999;4:56 – 66
- 55)Antczak M,Janathon V B, Linda G, London, Kluwer Academic Publishers,The synthetic and secretory behaviors (nonsteroidal) of the ovarian follicular granula cells: Parallels to cells of the endothelial cell lineage. *Essential IVF basic Research and Clinical Application.* Ed: 2004.
- 56)Lin Y-C, Chang S-Y, Lan K-C, Huang H-W, Chang C-Y, Tsai M-Y, Kung F-T, Huang F-J. Human oocyte maturity in vivo determines the outcome of blastocyst development in vitro. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:506 – 512.
- 57)Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006;12:608 – 615.
- 58)McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2004;19:2869 – 2874.
- 59) Hazeleger, NL, DJ Hill, RB Stubbings, and JS Walton 1995 Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their

developmental potential in vitro. *Theriogenology* 43 509-522.

60) Said A, Delphine H, John D.V, and Samir H Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes *Molecular Human Reproduction*, Vol.16, No.8 pp. 531– 538, 2010 Advanced Access publication on April 29, 2010 doi:10.1093/molehr/gaq032

61) Chian, RC, K Okuda, and K Niwa 1995 Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocyte derived from in vitro maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 38 37-48

62) Gilchrist, RB, M Lane, and JG Thompson 2008 Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14 159-177.

63) Gilula, NB, ML Epstein, and WH Beers 1978 Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* 78 58-75.

64) Tesfaye, D, N Ghanem, F Carter, T Fair, MA Sirard, M Hoelker, K Schellander, and P Lonergan 2009 Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. *Reprod Fertil Dev* 21 451-461

65) Veek L (1999) *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. Parthenon, New York

66) Russell, D. L., and Salustri, A. (2006) Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin. Reprod. Med.* 24, 217–227

67) Salustri A, Camaioni A and D'Alessandris C (1996) Endocrine and paracrine regulation of cumulus expansion. *Zygote* 4,313– 315

68) Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B and Grunfeld L (1991) Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* 337,1375– 1377.

69) Carslon BM. *Human Embriology and Developmental Biology*. Forth addition. Mosby elsevier, Philadelphia 2009.

70) Hardy DM. *Fertilization*. Academic Press, USA, 2002

71) Mahi-Braun CA and Yamagimachi R. Parameter influencing ovum pick up by oviductal fimbria in the golden hamster. *Gamete Res* 1983; 8:1-10

72) Bedford JM. What marsupial gametes disclose about gamete function in



eutharian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 569-580

73)Bred VG. How does sperm meet egg?- in marsupial. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 485-506

74)Bedfort JM, Mock OB, Philips DM. Unusual ampullary sperm cyrpts, and behavior and role of cumulus oophorus, in oviduct of the leats shrew. *Cryptosis Parva. Biol Reprod.* 1997 a;56:1255-1267

75)Salustri, A, C Garlanda, E Hirsch, M De Acetis, A Maccagno, B Bottazzi, A Doni, A Bastone, G Mantovani, P Beck Peccoz, G Salvatori, DJ Mahoney, AJ Day, G Siracusa, L Romani, and A Mantovani 2004 PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* 131 1577-1586.

76) Wathlet, S, T Adriaenssens, I Segers, G Verheyen, H Van de Velde, W Coucke, Ron El, P Devroey, and J Smitz 2011 Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. *Hum Reprod* 26 1035-1051.

77)Cohen, M., Klein, E., Geiger, B., and Addadi, L. (2003) Organization and adhesive properties of the hyaluronan pericellular coat of chondrocytes and epithelial cells. *Biophys. J.* 85, 1996–2005

79)Raymond J. Rodgers, Helen F. Irving-Rodgers and Darryl L. Russell. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* (2003) 126, 415–424

80)Hay ED (1991) *Cell Biology of Extracellular Matrix* 2nd Ed. Plenum Press, New York

81)Mittaz, L, DL Russell, T Wilson, M Brasted, J Tkalcevic, LA Salamonsen, PJ Hertzog, and MA Pritchard 2004 Adams-1 is essential for the development and function of the urogenital system. *Biol Reprod* 70 1096-1105.

82)Dunning, KR, LN Watson, VJ Zhang, HM Brown, AK Kaczmarek, RL Robker, and DL Russell 2015 Activatio of Mouse Cumulus-Oocyte Complex Maturation In Vitro Through EGF-Like Activity of Versican. *BiolReprod.*

83)Akison, LK, ER Alvino, KR Dunning, RL Robker, and DL Russell 2012 Transient invasive migration in Mouse cumulus oocyte complexes induced at ovulation by luteinizing hormone. *Biol Reprod* 86 125

84)Dunning, KR, LN Watson, DJ Sharkey, HM Brown, RJ Norman, JG Thompson, RL Robker, and DL Russell 2012 Molecular filtration properties of the mouse expanded cumulus matrix: controlled supply of metabolites and extracellular

signals to cumulus cells and the oocyte. *Biol Reprod* 87 89.

85) Dunning, KR, M Lane, HM Brown, C Yeo, RL Robker, and DL Russell 2007 Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. *Hum Reprod* 22 2842-2850.

86) Dunning, KR, LN Watson, VJ Zhang, HM Brown, AK Kaczmarek, RL Robker, and DL Russell 2015 Activation of Mouse Cumulus-Oocyte Complex Maturation In Vitro Through EGF-Like Activity of Versican. *BiolReprod*.

87) Kawashima, I, Z Liu, LK Mullany, T Mihara, JS Richards, and M Shimada 2012 EGF-like factors induce expansion of the cumulus cell-oocyte complexes by activating calpain-mediated cell movement. *Endocrinology* 153 3949-3959.

88) Dumesic, DA, DR Meldrum, MG Katz-Jaffe, RL Krisher, and WB Schoolcraft 2015 Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* 103 303-316.

89) Sutton-McDowall, ML, RB Gilchrist, and JG Thompson 2004 Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 128 313-319.

90) Hussein, TS, DA Froiland, F Amato, JG Thompson, and RB Gilchrist 2005 Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 118 5257-5268.

91) Sugiura, K, YQ Su, FJ Diaz, SA Pangas, S Sharma, K Wigglesworth, MJ O'Brien, MM Matzuk, S Shimasaki, and JJ Eppig 2007 Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* 134 2593-2603.

92) Thompson, JG, M Lane, and RB Gilchrist 2007 Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Society for Reproduction and Fertility Supplement* 64 179-190.

93) Dumesic, DA, DR Meldrum, MG Katz-Jaffe, RL Krisher, and WB Schoolcraft 2015 Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* 103 303-316.

94) Chang, AS, AN Dale, and KH Moley 2005 Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 146 2445-2453.

95) Thompson, JG, RB Gilchrist, and ML Sutton-McDowall 2014 The metabolism

of the ruminant cumulus- oocyte complex revisited. In AM J.L. Juengel, C. Price, L.P. Reynolds, M.F. Smith, R. Webb (ed.), *Reproduction in Domestic Ruminants VIII*. Leicestershire, UK.: Context Products.

96) Kind, KL, KM Banwell, KM Gebhardt, A Macpherson, A Gauld, DL Russell, and JG Thompson 2013 Microarray analysis of mRNA from cumulus cells following in vivo or in vitro maturation of Mouse cumulus-oocyte complexes. *Reprod Fertil Dev* 25 426-438.

97) Caixeta, ES, ML Sutton-McDowall, RB Gilchrist, JG Thompson, CA Price, MF Machado, PF Lima, and JBuratini 2013 Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 146 27-35.

98) Emsley, J., White, H. E., O'Hara, B. P., Oliva, G., Srinivasan, N., Tickle I. J., Blundell, T. L., Pepys, M. B. and Wood, S. P. (1994). Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature* 367, 338-345

99) Steel, D. M. and Whitehead, A. S. (1994). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today* 15, 81-88.

100) Breviario F., d'Aniello E. M., Golay J., Peri G., Bottazzi B., Bairoch A., Saccone S., Marzella R., Predazzi V., Rocchi M. (1992) Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.* 267, 22190–22197 [PubMed: 1429570]

101) Varani, S., Elvin, J. A., Yan, C., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Horton, H. F., Byrne, M. C. and Matzuk, M. M. (2002). Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol. Endocrinol.* 16, 1154-1167.

102) D'Alessandris, C., Canipari, R., Di Giacomo, M., Epifano, O., Camaioni, A., Siracusa, G. and Salustri, A. (2001). Control of mouse cumulus cell- oocyte complex integrity before and after ovulation: plasminogen activator synthesis and matrix degradation. *Endocrinology* 142, 3033-3040.

103) Russell DL, Salustri A, Extracelularmatrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med* 2006;24:217-227

104) Salustri, A., Yanagishita, M., Underhill, C. B., Laurent, T. C. and Hascall, V.C. (1992). Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev. Biol.* 151, 541-55

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

106) Antonietta S, Cecilia G, Emilio H, Marika De A, Alessia M, Barbera B, Andrea D, Antonio B, Giovanna M, Paolo Beck P, Giovanni S David J. M Anthony J. Day, Gregorio S, Luigina R and Alberto M PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* 131, 1577-1586.

107) Varani, S., Elvin, J. A., Yan, C., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Horton, H. F., Byrne, M. C. and Matzuk, M. M. (2002). Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol. Endocrinol.* 16, 1154-1167.

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

109) Huang, X., Hao, C., Shen, X., Zhang, Y., Liu, X., 2013. RUNX2, GPX3 and PTX3 gene expression profiling in cumulus cells are reflective oocyte/embryo competence and potentially reliable predictors of embryo developmental competence in PCOS patients. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11, 109.

110) ALPHA, ESHRE *Reprod Biomed Online.* 2011 Jun;22(6):632-46. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.02.001. Epub 2011 Apr 11.

111) Xingqi Z, Nadereh J, Randall B. B, Edmond C, Magdy M, Ralph R. K Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality *Fertility and Sterility* Volume 83, Issue 4, Supplement, April 2005, Pages 1169–1179)

112) Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne R A L , Thong K J, de Sousa and S Pickering P A, Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy *Reproduction* October 1, 2009 138 629-637

113) K.M. Gebhardt *fertil steril* 2011

114) Richard J K and Holly A L, Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle *Reproduction* February 1, 2017 153 R69-R83)

115) Burnik PT, Vrtacnik BE, Maver A, Kopitar AN & Lovrecic L 2015b  
Transcriptomic analysis and meta-analysis of human granulosa  
and cumulus cells. PLoS ONE 10 e0136473. (doi:10.1371/journal.  
pone.0136473)



## 11. ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Yavuz ŞAHİN
2. **Doğum Tarihi:** 10.08.1982
3. **Ünvanı :** Biyolog
4. **Öğrenim durumu:** Atatürk Üniversitesini S.H.M.Y 2001-2003  
Atatürk Üniversitesini Fen Fak.2008-2013
5. **İş Tecrübesi:** 2007-2012 Erz. Palandöken Dev. Hastanesi  
2012-2014 Yozgat KHB  
2015- Zeynep Kamil Eğt.Arş. Hastanesi



ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA  
HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU



ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"İCSI uygulamalarında kümüls hücre kültürü ve sonuçlarının değerlendirilmesi"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
		SIGORTA
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>
	İLAN	<input type="checkbox"/>
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 157	Tarih: 06.11.2015
-----------------	---------------	-------------------

Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmann/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.  
İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayşenur CELAYİR

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Başkan Prof. Dr. Ayşenur CELAYİR	Çocuk Cerrahisi	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Cetin ÇAM	Kad. Hast. ve Doğum	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Güner KARATEKİN	Neonatoloji	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Op. Dr. Mehmet KÜÇÜKBAŞ	Kad. Hast. ve Doğum	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Sağ. Bak. Hizm. Müdürü Dr. Yeliz DOĞAN MERİH	Doğum ve Kadın Hastalıkları	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hülya CABADAK	Biyofizik	Marmara Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Fulya İlçin GÖNENÇ	Hukuk	Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Günay CAN	Halk Sağlığı	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yard. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ	Farmakoloji	Marmara Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yard. Doç. Dr. Ayten ARIKAN	Tıp Tarihi ve Tıp Etiği	Yeni Yüzyıl Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Ahmet ÇETİNALP	Memur	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur CELAYİR  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.



ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA  
HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU



ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"ICSI uygulamalarında kümülüs hücre kültürü ve sonuçlarının değerlendirilmesi"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	Zeynep Kamil Mah. Op.Dr.Burhanettin Üstünel Sok. No:4/3 Üsküdar 34668
	TELEFON	0216 391 06 80
	FAKS	0216 343 92 51
	E-POSTA	www.etikkurulsekretarya@zeynepkamil.gov.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Tülay İREZ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Biraai Üniversitesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur CELAYİR  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.



