

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**STİMÜLE EDİLMİŞ HASTALARDAN ELDE EDİLEN
İMMATÜR OOSİTLER'DE İN VİTRO MATURASYON
VE KÜMÜLÜS'LERİNDEKİ APOPTOTİK
FARKLILIKLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sinem DOĞAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL
2015

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/07/2015

Prof. Dr. Tülay İrez
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Özgür Öktem
Koç Üniversitesi
üye

Prof. Dr. Emir Tan
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
üye

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 çalışmayla 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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sinem DOĞAN

Her zaman yanımda olan sevgili eşim ve canım aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bıkmadan gösterdiği bilimsel yol gösterici tutumu ile bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocam Klinik Embriyoloji Bölüm Başkanı Sayın **Prof. Dr. Tülay İrez**'e;

Tezimin başlangıcından itibaren bilgi ve görüşlerini benimle paylaşan, yapım aşamasında bana yol gösteren ve mesleki hayatım boyunca yardım ve tecrübelerini esirgemeyen Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Labratuvar Sorumlusu **Dr. Necati Fındıklı**'ya;

İstatiksel değerlendirmelerde bana yardımcı olan sevgili hocam **Prof. Dr. Nurten Dayıoğlu**'na

Apoptozis bulgularını değerlendirmemde yardımcı olan **Meral Gültomruk**'a;

Bana verdiği emeklerden dolayı sevgili hocam **Prof. Dr. Süha Sönmez**'e;

Yüksek lisans eğitimin süresince bıkmadan usanmadan her türlü yardımına koşan, zor günlerimde yanımda olan ve hayatımın her anında yanımda olmasını istediğim eşim, **Bahadır Doğan**'a;

Hayatım boyunca beni hep destekleyen ve gösterdikleri sevgi ve anlayışla bugün burada olmamı sağlayan rahmetli babam **Aguş Ercan**, annem **Kadriye Ercan**, teyzem **Filiz Kalav** ve kardeşim **Onur Ercan**'a;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
TABLolar LİSTESİ	IX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. In Vitro Maturasyon(IVM)	4
2.2. Oogenezis	4
2.3. Oosit Maturasyonu.....	8
2.4. Nüklear Maturasyon	9
2.5. Sitoplazmik Maturasyon	11
2.6. KümüLüs Hücrelerinin İn Vitro Maturasyon Üzerine Etkileri	12
2.7. ICSI (Intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu).....	15
2.8. Embriyo Değerlendirmesi	16
2.8.1. Fertilizasyonun Değerlendirilmesi:.....	16
2.8.2. İkinci ve Üçüncü Gün Embriyo Değerlendirmesi	17
2.8.2.1. Erken Bölünme	17
2.8.2.2. Bölünme Hızı	18
2.8.2.3. Fragmantasyon	19
2.8.3. Dördüncü Gün Embriyo Değerlendirilmesi (Morula evresi)	20
2.8.4. Blastokist puanlama sistemi, (27)	20
2.9. Apoptozis'in Tanımı ve Temel Özellikleri	22
2.9.1. Apoptozis Mekanizmaları	26
2.9.2. Apoptozis'in Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	26
2.9.2.1. TUNEL Yöntemi.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28

3.1. Oositlerin Toplanması.....	28
3.2. Kümülsuların Değerlendirilmesi	28
3.3. Hyase (Yumurta Soyma İşlemi)	29
3.4. Mikroenjeksiyon.....	29
3.5. IVM (In Vitro Maturasyon) Medium Hazırlanması;.....	30
3.6. Apoptotik Değerlendirme İçin Yıkama ve Çalışma Protokolü;.....	30
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
6. ETİK KURUL KARARI	49
7. KAYNAKLAR	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2 1 Ovaryum – Gamatogenezis,	6
Şekil 2 2 Antral Folikül ve Graff Folikülü	8
Şekil 2. 3 Mayoz Bölünme	10
Şekil 2 4 Granüloza Hücrelerinde Östrojen Üretimi.....	13
Şekil 2 5 Kümüls Oophorus.....	14
Şekil 2 6 Mikroenjeksiyon İşlemi	15
Şekil 2 7 Birinci gün iki çekirdeğin izlendiği döllenmiş bir yumurta görüntüsü.....	16
Şekil 2 8 Erken bölünme gözlenen iki hücreli bir embriyo	17
Şekil 2 9 Embriyo Gelişimi	18
Şekil 2 10 Fragmantasyon Oranı Değerlendirilmesi	19
Şekil 2 11 Blastokist Değerlendirmesi	21
Şekil 2 12 Nekroz ve Apoptozisin elektron mikroskobu görüntüleri, (A) Nekroz, (B) Apoptozis (38).....	25
Şekil 2 13 Nekroz ve Apoptozisin karşılaştırılması (39).....	25
Şekil 3 1 Tunel Görüntüsü-Yeşil-Apotozis (+).....	31
Şekil 3 2 Tunel Görüntüsü-Mavi-Yeşil Kısmi Apoptozis.....	31
Şekil 3 3 Tunel Görüntüsü-Mavi Apoptozis (-).....	32

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4.1: Toplam 456 oosit'in MII ve immatür gruplarının dağılımı.....	34
Tablo 4.2: Çalışma gruplarında oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi.....	35
Tablo 4.3: Maturasyona bırakılan MI ve GV oositlerin % dağılımı.....	35
Tablo 4.4: Grupların hormon değerleri ile karşılaştırılması.....	35
Tablo 4.5: Gebelik pozitif ve negatif olguların bazal hormon düzeyleri açısından karşılaştırılması.....	36
Tablo 4.6: IVM uygulanmış gv lerde ortalama apoptozis oranı ile m2 lerde ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.....	36
Tablo 4.7: Gruplarda ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.....	36
Tablo 4.8: Gruplarda ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.....	37
Tablo 4.9: Matür ve immatür gv lerde ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.....	37
Tablo 4.10: Fertilize olan olmayan gv lerde ortalama apoptozis oranı karşılaştırması...37	
Tablo 4.11: 5. gün hücre sayısına göre gv lerde ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.....	38
Tablo 4.12: Fertilize olmayan matür GV'ler ile fertilize olan ve embriyo geliştiren gruplar arasında apoptozis.....	38
Tablo 4.13: GV Apoptozis'inin gebe olan ve olmayan gruplarda karşılaştırılması.....	38
Tablo 4.14: GV Apoptozis oranı ve gv apoptozis+gv şüpheli apoptozis oranı ile korelasyon analizi (Sperman's rho correlation).....	39

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

>	Büyüktür
°	Derece
<	Küçüktür
%	Yüzde
AMH	Anti Müllerian Hormon
BMP	Kemik morfogenetik proteinleri
bFGF	Temel fibroblast büyüme faktörleri
CSF	Koloni uyarıcı faktörler
dH2O	Distile su
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EGF	Epidermal büyüme faktörü
Fert.	Fertilizasyon
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GDF	Büyüme farklılaştırma faktörü
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GV	Germinal vezikül
GVBD	Germinal vezikül dağılması
HCG	İnsan Koryonik Hormonu
HEPES	N-(2 hidroksietil)-piperazin-N'-(2 etanosulfonikası)
ICM	İç hücre kitlesi (Inner cell mass)
ICSI	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IGF	İnsulin benzeri büyüme faktörü
IVF	İn vitro fertilizasyon
IVM	İn vitro maturasyon

KOK	Kümürlüs oosit kompleksi
LH	Luteinleştirici hormon
MPF	Metafaz destekleyici faktör
mm	Milimetre
M1	Metafaz I
M2	Metafaz II
NGF	Nöron büyüme faktörü
O ₂	Oksijen
OHSS	Ovaryan hiperstimülasyon sendromu
OMI	Oosit olgunlaştırma inhibitörü
PKO	Polikistik over
PKOS	Polikistik over sendromu
PBS	Fosfatlı tampon solüsyonu
pH	Asitlik sabiti
PVP	Polivinil piroolidon
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TNF	Tümör nekroz faktörü
TUNEL	“TdT-mediated dUTP-FITC nick end-labeling”
ZP	Zona pellusida

ÖZET

Doğan S., (2015) Stimüle Edilmiş Hastalardan Elde Edilen İmmatür Oositler’de İn Vitro Maturasyon ve Kümüls’lerindeki Apoptotik Farklılıkların Değerlendirilmesi, Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2015.

Bu çalışmada, stimüle edilmiş siklulardan elde edilen İmmatür (G.V) oositler de in vitro maturasyon (IVM) sonrası matür hale gelen ve gelmeyen oositlerin kümülüs hücrelerindeki apoptotik farklılığın embriyo gelişimi üzerine etkisinin değerlendirilmesi ile bunlardan yarar sağlama yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Medicana Hastanesi IVF merkezinde tedaviye giren hastalardan oosit aspirasyonu sonrası elde edilen 46 adet immatür oositte elde edilen kümülüs hücreleri apoptozis açısından değerlendirildi. Hastaların bazal hormon değerleri alınarak çalışmaya dahil edildi. İn vitro maturasyon sonrası maturasyonunu tamamlayan oositlere ICSI uygulaması yapılarak fertilizasyon ve embriyo gelişimi incelendi.

ICSI uygulaması sonrası 2. gün %39,1 (3-4 hücre aşamasında embriyo), 3. gün %43,4 (5-8 blastomer aşamasında embriyo), 5. gün ise % 21.7 morula ve % 6.5 blastokist aşamasında embriyo gelişti. Bu çalışmada M2 aşamasında olan oositlerden elde edilen kümülüs hücrelerindeki apoptozis, GV oosit kümülüs apoptozisinden düşük bulundu ($p < 0.0001$). IVM uygulanan tüm immatür oositlerde maturasyon %56,1, 2PN oluşumu %63,0 olarak bulundu. Maturasyona bırakılan GV oositlerde matür hale gelen veya gelmeyen grupta kümülüs apoptozisi farklı bulunmadı ($p > 0.5$). IVM uygulanan GV’lerde embriyo geliştiren grupta 2PN oluşumu %35,4 olarak gözlemlendi.

Oosit maturasyonu ve embriyo gelişiminin 3. gün LH değeri ile ve HCG günü E2 değeri ile arasında pozitif ilişki bulunduğu görülmüştür. ($P=0.021$, $p=0.020$). Ancak bazal hormon değerlerinin gebeliği öngörmediği anlaşılmıştır. Bazal LH değerlerinin GV oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi ile ilişkisi görüldü ($p=0.021$). HCG günü E2 değerinin, maturasyonu tamamlayıp embriyo geliştiren GV oosit grubunda yüksek olduğu saptandı ($p=0.020$).

Çalışmamızda stimüle edilmiş IVF siklulardan elde edilen immatür oositlerin kullanılabilirliği düşük düzeyde de olsa kanıtlanmıştır. İmmatür oositlerin embriyo geliştirme potansiyeli ise apoptozis parametresi ile açıklanamayacağı anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İn vitro maturasyon, Apoptozis, Kümülüs Hücreleri, E2, LH

ABSTRACT

Doğan S., (2015) Evaluation of Apoptotic Differences in Cumulus Cells and In Vitro Maturation of Immature Oocytes From Stimulated Cycles, Yeni Yuzyil University Institute of Health Science, Histology and Embriyology, Clinical Embriyology Graduate Program, Istanbul, 2015.

The purpose of this study is to investigate the effect on embryo development of the apoptotic difference of mature and immature oocytes in the cumulus cells of immature (G.V) oocytes after in vitro maturation (IVM) from stimulated cycles and to develop methods to get providing benefit from these.

In our study, cumulus cells, which were obtained from 46 immature oocytes, have been evaluated from apoptosis point of view and these cumulus cells have been obtained by oocyte aspiration from the patients who got their treatment in Medicana Hospital IVF Center.

After ICSI process application to these 46 immature oocytes, in 2nd day 39.1% (3-4 cell embryo), in 3rd day 43.4% (5-8 cell embryo) and in 5th day 21.7% morula and 6.5% blastocyst embryo has been evolved. In this study, it has been found that apoptosis value of cumulus cells of M2 oocytes is lower than the apoptosis value of cumulus cells of GV oocytes ($p < 0.0001$). In all of the immature oocytes after IVM, maturation rate has been seen as 56.1% and 2PN rate as 63.0%. There was seen no difference in apoptosis rate of cumulus cells between mature and immature oocytes after in vitro maturation to GV oocytes ($p > 0.5$). 2PN rate was observed as 35.4% on the in vitro matured GV's which have developed embryos.

It was seen that there is a positive relation between LH values in 3rd day and E2 values in HCG days during oocyte maturation and embryo development ($P = 0.021$, $p = 0.020$). However, it was understood that the basal hormone values do not foreseen the pregnancy. It was seen that basal LH values has an interaction with GV oocyte maturation and embryo development ($p = 0.021$). In addition to that, It was observed that the GV oocyte group which was completed its maturation and developed embryos, has high E2 values on HCG days. ($p = 0.020$)

In our study, it has been proven albeit at low levels that the availability of in vitro maturation of immature oocytes obtained from stimulated cycles. Moreover, it has been

understood that the potential of immature oocytes on embryo development could not be explained by the apoptosis parameter.

Key words: In vitro maturation, Apoptosis, Cumulus cells, E2, LH

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite toplumun %10-15'ini ilgilendiren bir sorundur (1). İnfertil hastaların tedavisinde günümüzde önemli gelişmeler elde edilmiştir. Özellikle yardımcı üreme ve laboratuvar tekniklerinin gelişmesiyle infertilite tedavisindeki başarı oranları artmış ve daha çok infertil çiftin sağlıklı bir bebeğe sahip olabilmesi sağlanmıştır. Yaklaşık 50 yıldır bilim dünyasının üzerinde durduğu laboratuvarında kaliteli embriyo elde etmeye yönelik çalışmalarda önemli mesafeler alınmış ve umut vadeden teknikler geliştirilmiştir.

IVF (in vitro fertilizasyon) uygulamalarında gonadotropinlerin kullanımı ile çok sayıda folikül elde edilmekte foliküllerden elde edilen oositlerin ise % 20 sine yakın bir oranda maturasyonunu tamamlamamış olduğu gözlenmektedir. Bu oranın polikistik over hastalarında daha da yükseldiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (2).

IVM, immatür oositlerin laboratuvar koşullarında olgunlaştırılması için kullanılan tekniklerden bir tanesidir ve genellikle polikistik over (PKO) teşhisi koyulmuş hastalarda IVF tedavisine bir alternatif olarak, stimüle edilmemiş sikluslarda tercih edilmektedir (3). IVM sadece polikistik overli hastalar için değil, aynı zamanda zayıf over cevabı veren hastalar için de iyi bir tedavi seçeneğidir (4). Stimüle edilmiş sikluslarda germinal vezikül (GV) aşamasında veya metafaz 1 (M1) aşamasında bulunan oositlerin in vitro maturasyonu konusunda sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır. IVF tedavisi sırasında alınan gonadotropinlerle zayıf over cevabı veren ve aynı siklusda in vitro maturasyon tekniği ile tedaviye yanıt veren vakalar gözlenmiştir (4). Farsi M. M. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada stimüle edilmiş sikluslardan elde edilen GV oositlerin % 46'sının matür hale geldiği ve bunların da yaklaşık olarak % 25'inde mayoz bölünme ile ilişkili anomali olduğu gösterilmiştir (5).

Apoptozis; genetik olarak programlanmış hücre ölümüdür. Memelilerin fizyolojik olaylarında önemli bir role sahiptir. Özellikle foliküler atrezi, uterus adaptasyonu ve embriyonun implantasyonu için hazırlanması ve birçok patolojik durumlarda görev aldığı gösterilmiştir (6). Birçok çalışmada, atrezik foliküllerden alınan kümülüs-oosit kompleksleri'nden elde edilen embriyolarda blastokist aşamasına ulaşma oranının az olduğu görülmüştür Apoptozis'in, ovaryumda oositler adına patolojik bir durumun oluşmasına neden olan ve normalden farklı olan foliküler gelişim sürecinin çok önemli bir parçası olduğu, aynı zamanda korpus luteumun luteolizisini de sağlayan mekanizma

olduğu ileri sürülmektedir (6). Granuloza hücreleri, apoptozisten etkilenen ilk hücrelerdir. Önceki çalışmalara göre, gonadotropinlerin azlığı ovaryumda kuvvetli atreziye yol açmaktadır. Foliküler gelişimin primordial safhalarında ise apoptozisten ilk etkilenen hücre oositlerdir. Apoptozis, embriyonun rahime yerleştirilmesinden önce ve sonra önemli bir rol oynar. Yerleştirmeden önce blastosellerin oluşumuna katkıda bulunurken, yerleştirmeden sonra ise çoğu erken bölünme sırasında olmak üzere embriyonun hücre kaybetmesine neden olur. Kümüls hücrelerindeki apoptozis oranı, kesin olmamakla beraber, embriyo gelişim potansiyeli için önemli bir yer tutuyor olabilir. Kümüls hücrelerinin, sinyal salınımı ve düzenlenmesi fonksiyonları ile oosit olgunlaşması ve döllemede önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (4).

Filho P. A. S. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada GnRh – agonist ve GnRH - antagonist tedaviler uygulanan hastaların kümüls hücrelerindeki apoptozis oranı iki gruba ayrılarak flow- sitometri cihazında analiz edilmiştir. Canlılık, apoptozis, ölü kümüls hücre oranları, fertilizasyon ve implantasyon oranları iki grup arasında karşılaştırılmıştır. Gebelik ve implantasyon oranları arasında bir fark olmadığı ancak HCG günü ölçülen östradiol düzeyi ile kümüls hücrelerinin apoptozisi arasında bir bağlantı olduğu izlenmiştir (7). Granülosa ve kümüls hücrelerinin oosit maturasyonunda önemli bir role sahip olduğu, granülosa hücrelerindeki apoptozisun veya nekrozun oosit kalitesi ve gelecekteki embriyo kalitesini belirleyebileceği, granülosa hücreleri ile kötü IVF/ICSI sonuçları arasında bir korelasyon olabileceği gözlenmiştir (4).

Bu çalışmada stimüle edilmiş IVF döngülerinden elde edilen GV oositlerin maturasyon düzeyleri ve fertilizasyon, embriyo geliştirme kapasiteleri, buna bağlı olarak kümüls apoptozis ile bağlantısının olup olmadığı konusunda araştırma yapılması amaçlanmıştır. Stimüle edilmiş döngülerden elde edilen GV oositlerin maturasyonu sonrası pek çoğunun gelişim potansiyellerinin bulunmamasına rağmen, bu potansiyeli muhtemel etkileyen faktörlerden apoptozis üzerinde çalışılarak, gelişim potansiyeli yüksek oositlerin önceden öngörülebilir olabileceği konusunda araştırma yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, bahsedilen çalışmalara benzer bir şekilde tedavi ile uyarılmış döngülerden alınan immatür oositlere IVM yöntemi uygulanmıştır ve embriyo gelişimleri yönünden gözlenmiştir. IVF laboratuvarında, IVM sonrası matür hale gelen oositlere ICSI işlemi uygulandıktan sonra fertilizasyon, erken bölünme, fragmentasyon ve

blastomer eşitliği yönünden takip edilmiştir. M2 ve GV oositlerin kümülsuları slaytlarlam (polysinli) üzerine yayılarak apoptozis tayin kiti ile flow-sitometri cihazında her hasta için iki yüz adet kümülüs hücresi sayılarak apoptozis yönünden incelenmiştir.

Tedavi ile uyarılmış döngülerden elde edilen GV oositlerin maturasyonu sonrası pek çoğunun gelişim potansiyellerinin bulunmamasına rağmen, bu potansiyeli muhtemel etkleyen faktörlerden apoptozis üzerinde çalışılarak, gelişim potansiyeli yüksek oositlerin önceden öngörülebilir olabileceği konusunda araştırma yapılması amaçlanmıştır.

Böylece, stimüle edilmiş siklulardan elde edilen immatür oositlerin değerlendirilmesi, bunlardan yarar sağlama yöntemlerinin geliştirilmesi ve kümülüs-oosit kompleksi incelenerek IVM öncesi oosit maturasyon yeteneğinin önceden öngörülmesi amaçlanmıştır. Çalışma ayrıca polikistik over tanısı koyulmuş ve zayıf over yanıtı veren infertil çiftelere yönelik tedavilerde umut vadeden teknikler geliştirmeyi amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. In Vitro Maturasyon(IVM)

IVM gonadotropin stimülasyonu uygulanmadan, overlerden immatür oositlerin alınarak in vitro ortamda matürasyonunu tamamlamayı amaçlayan bir yardımcı üreme tekniğidir (5). Büyümüş fakat fonksiyonel olarak yetersiz, ovulasyon aşamasına gelmemiş folliküllerden (10-12 mm) oosit aspirasyonu ile oositler izole edilir. İmmatür oositlerin büyük bir kısmı IVM ile nüklear ve sitoplazmik matürasyonunu tamamlar. IVF ve ICSI uygulaması ile fertilize olurlar. IVM'de overlerin stimüle edilmemesi ile hem tedavi masrafları hem de tedavi komplikasyonları minimale indirilmesi sağlanır. Yan etkilerinin ve maliyetin düşük olması ve siklusun daha az hasta takibi gerektirmesi yönünden avantajlı bir yöntemdir. Ancak gebelik oranları in vitro fertilizasyona oranla daha düşüktür (6). Ve bu büyük bir dezavantajdır. IVM yardımcı üreme tekniği olarak kullanılmasının yanında fertilitenin korunması ve yumurta bağıışı programlarında da kullanılabileceği düşünülmektedir (2). Polikistik over ve polikistik over sendromu tanısı alan ve daha önceden OHSS öyküsü bulunan hastalar IVM için en iyi seçilmiş gruptur. IVM, üzerinde daha çok çalışılması gereken ve gelecek için ümit vaat eden bir yöntemdir (2, 8)

2.2. Oogenezis

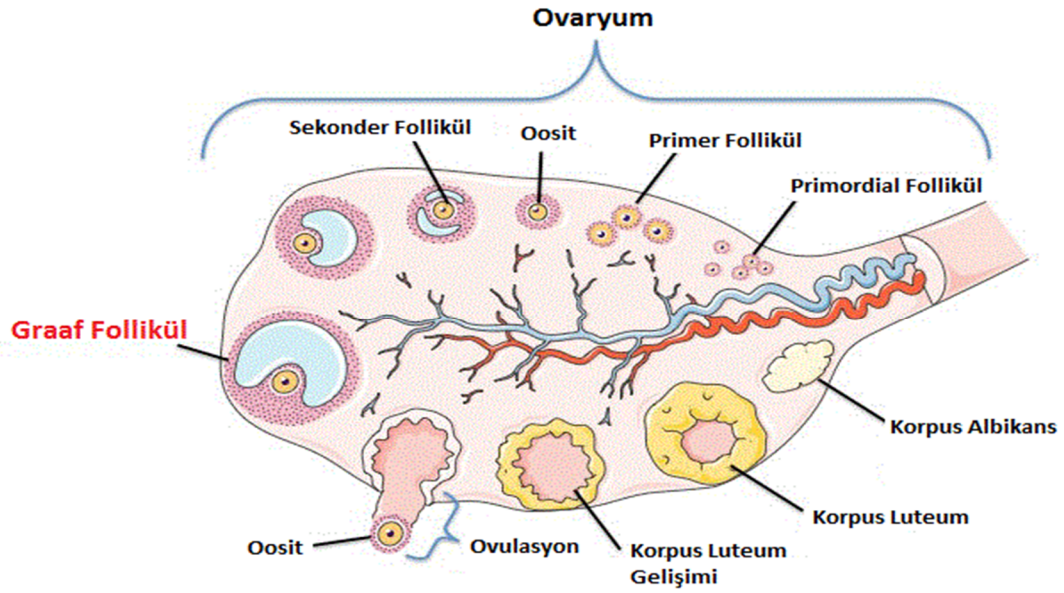
Gametlerin gelişim ve oluşum sürecine “Gametogenezis” denir. Primordiyal germ hücreleri gametlerin gelişimine neden olur. Primordiyal germ hücreleri, ilk olarak intrauterin 3. haftasının sonunda yolk kesesi duvarının allantoise yakın olan kısmında görülür. Transmisyon elektron mikroskop (TEM) ile görüntülendiğinde hücrelerin 15-20 µm çapında ve yuvarlak şekilli olduğu görülecektir. Ayrıca, eksantrik yerleşimi olduğu ve ince granüler kromatine sahip nükleusu gözlemlenebilir. Bir veya iki adet, geniş nükleolusu bulunur. Primordiyal üreme hücrelerinin sitoplazmasında az sayıda organel bulunur. Nükleusa yakın oval veya yuvarlak şekilli, tübülo-veziküler kristallara sahip mitokondriyolar bulunur. Tek bir Golgi Aygıtı, perinüklear yerleşimli granüler endoplazmik retikulum sisternaları, serbest ribozom, polizom ve veziküller içerir.

Bunların yanı sıra sitoplazmasında yağ damlacıkları ve glikojen partikülleri de bulunur. Primordiyal üreme hücreleri ve etrafındaki somatik hücreler arasında yakın temas alanları gözlenebilir (9).

4. haftanın başı veya 3. haftanın sonlarında primordiyal üreme hücreleri ameboid hareketlerle gonadlara göç eder. Primordiyal üreme hücrelerinin gonadlara ulaşamaması durumunda, bu hücreler dejenere olurlar. Gonadların gelişmesi için primordiyal germ hücrelerinin gonadlara ulaşması gerekmektedir. Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaştıkları anda, oogoniumlara farklılaşırlar ve mitoz bölünme ile hızla çoğalarak oogoniumların sayıları artar.

Oogoniumlar bölünerek çoğalırlar ve hücreler arası köprüler sayesinde birbirleri ile ilişki kurarlar (9). Oogenezis, postnatal olgunlaşma ve prenatal olgunlaşma olmak üzere iki bölümde incelenebilir. İntrauterin evresinin 4. ayından sonra, oogoniumlardan primer oositler oluşmaya başlar. Bu sırada, oogonia ve primer oosit kümeleri folliküler hücreler tarafından sarılmaya başlanır. İntrauterin evresinin 7. ayından sonra, follikül hücreleri her primer oositi ayrı olarak sarmıştır. Bu yapıya primordiyal follikül adı verilir. Folliküler hücreler ve üreme hücreleri arasında desmozom ve geçit bağlantıları (Gap junction) oluşmuştur. Bununla beraber, tek katlı yassı folliküler hücreleri çevre bağ dokudan ayıran bazal lamina da oluşumunu tamamlamıştır. Bu aşamada, sadece primordial folliküller görülür ve mitoz bölünme ile çoğalma artık sona ermiştir. Primer oositlerin ileri gelişimi follikül hücrelerince salgılanan OMI (oosit olgunlaştırma inhibitörü) faktör aracılığı ile puberteye kadar engellenir ve I. mayozun profazında diploten evresinde duraklar. Oluşan primordial folliküllerin bir kısmı atrezi ile kaybolur ve doğuma kadar primordiyal follikül sayısı bir miktar azama olur (9 - 12).

Yeni doğanın over korteksinde 700.000-2.000.000 civarında primordiyal follikül bulunur ve atrezi nedeniyle bu sayı puberteye kadar 400.000'e kadar düşer. Puberte ile birlikte hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle her menstruel siklus başında 5-15 follikül gelişmeye başlar ancak bir (nadiren de birden fazlası) ovulasyon aşamasına kadar ilerleyebilir. Menapoz over korteksinde hiç follikül kalmadığı zaman ortaya çıkar ve yaklaşık 400-500 follikül, puberteden menapoza kadar ovule olabilir (9 - 13).



Şekil 2 1 Ovaryum – Gamatogenesis,

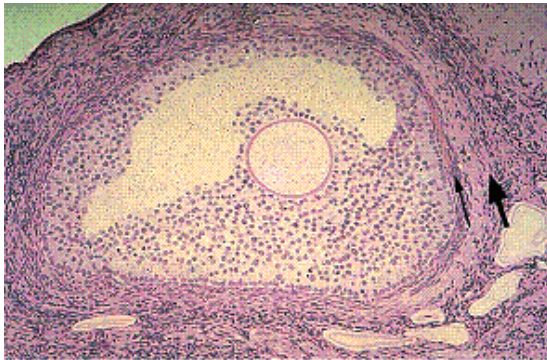
(<https://www.repropeia.org/sites/repropeia/files/ovulation-final.jpg>)

Folikülogenezis ve oosit maturasyonu aynı zamanlarda gerçekleşir. Overin dışı tek katlı kübik epitel ile çevrilidir ve epitel altında tunika albuginea (bağ dokusu yapısında) yer alır. Onun da altında korteks, daha iç kısımda ise medulla yerleşir. Folliküller gelişimini over korteksinde sürdürür. Mayozun profaz I. aşamasında beklemekte olan primer oosit ve onu çevreleyen tek katlı yassı folliküler hücreler primordiyal follikülü oluşturur. Pubertede, primer follikülleri gonadotropinlerin etkisi ile önce tek katlı kübik ardından çok katlı kübik hücreler haline alarak oluşur. Bu evrede follikül hücrelerine granüloza hücreleri denmektedir. Granüloza hücreleri arasında zona pellüsida da oluşmaya başlar. Granüloza hücreleri arasında boşluklar şekillenerek antrumu meydana getirir. Folliküle artık sekonder veya antral follikül adı verilmektedir. Granüloza hücreleri dışında bazal lamina vardır ve bunun dışı bakan yüzeyinde bulunan stromal hücrelerden teka interna ve teka eksterna tabakaları gelişir. Follikülün en gelişmiş haline Graaf Follikül denir ve ortada geniş bir antrum vardır. Antrumun bir kenarında ortada primer oosit, primer oositi çevreleyen zona pellüsida ve etrafındaki granüloza hücreleri tarafından oluşturulmuş korona radiyata hücreleri bulunur. Antrum etrafında, çok katlı kübik hücrelerce oluşturulan granüloza tabakası yer alır. En dış tabakada ise teka interna

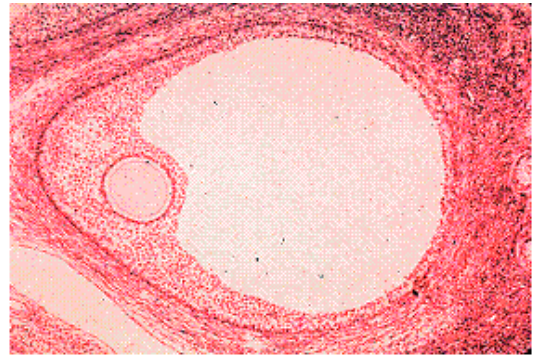
ve teka eksterna yer alır. Teka hücrelerinde gelişen folliküllerden bir tanesi baskın folliküldür ve ovulasyon aşamasına kadar gelebilir. Ovulasyonu takiben antral boşluk kanla dolar ve sonrasında bağ dokusu yapısını alır. Granüloza hücreleri kıvrımlı bir hal alır ve granüloza lutein hücrelerini oluşturur. Bunun yanı sıra, teka interna hücreleri de teka lutein hücrelerini oluşturmaya başlar. Korpus luteum, gebelik oluşmaz ise korpus albicansı oluşturur (9 - 12). Follikül gelişiminde puberteden sonra hipotalamustan salgılanan GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon), hipofizden salgılanan FSH (follikül uyarıcı hormon) ve LH (luteinleştirici hormon) , ayrıca overde sentezlenen otokrin ve parakrin etkili büyüme faktörleri anti-Müllerian hormon (AMH), kemik morfogenetik protein 6 (BMP6), kemik morfogenetik protein 7 (BMP7), kemik morfogenetik protein 15 (BMP15), c-Kit, epidermal büyüme faktörü (EGF), büyüme farklılaştırma faktörü 9 (GDF9), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), rol alır. Bu faktörler; oosit, granüloza hücreleri ve teka hücrelerinde sentezlenip salınabilir. Anti-Müllerian hormon folliküllerin granüloza hücrelerinde sentezlenerek parakrin etki gösteririp diğer folliküllerin gelişimini engellemesi ve baskın follikülün belirlenmesi açısından diğer faktörlerden ayrı bir yere sahiptir (14 - 17). Primer follikül oluştuktan sonra folliküllerin ileri gelişimi FSH, LH ve büyüme faktörlerinin etkisi ile olmaktadır. Büyüme faktörlerinden BMP-6, BMP-15, GDF-9, ve c-Kit oosit kaynaklıdır. AMH, EGF, bFGF, inhibin, aktivin, BMP-2, BMP-5, BMP-6 granüloza hücrelerince salgılanır. Bu faktörlerin tamamı, otokrin ve parakrin etkiye sahiptir ve uyum içerisinde fonksiyon gösterirler. FSH etkisiyle gelişen granüloza hücreleri östrojen salgılar. Serum seviyesi artmakta olan östrojen, menstrüel siklus sonunda artan östrojenin luteinleştirici hormon (LH) üzerindeki negatif geri bildirim etkisinden farklı olarak, ilk önce pozitif geri bildirim etki ile LH salınımını uyarır. LH ovulasyonun gerçekleşmesi ve ovulasyondan sonra oluşan korpus luteumdan progesteron salgılanabilmesi için kilit role sahiptir. LH salınımı ile oosit olgunlaşması başlar ve LH en üst seviyeye ulaştıktan yaklaşık 10-12 saat sonra ovulasyon gerçekleşir. LH ve progesteron prostaglandinleri ve proteolitik enzimleri aktive ederek follikül duvarındaki kollajenin yıkılmasını, kümülüs hücre ekspansiyonunu ve ovulasyonun gerçekleşmesini sağlar (13, 15, 16, 17).

2.3. Oosit Maturasyonu

Mayoz Bölünme; dişi üreme hücresinin kromozom sayısını ($2n$) yarıya düşürerek, haploid (n) sayıda kromozoma sahip yeni hücrelerin oluşumuyla sonlanan, bir hücre bölünme çeşididir. Dişi üreme hücresinde, mayoz bölünme intrauterin dönemin 4. ayında başlar ancak follikül hücrelerince salgılanan OMI nedeniyle puberteye kadar profaz I'in diploten evresinde beklemede kalır. Mayoz bölünmede ilerleme, puberteden sonra gonadotropinlerin (özellikle de LH) etkisi ile başlar. Ovulasyondan önce mayoz I tamamlanır. Bunu takiben 2. mayoz bölünme başlar ve ovulasyon mayoz II'nin metafaz evresinde gerçekleşir. Fertilizasyon oluncaya kadar mayoz bölünmede ki bu ikinci duraksama devam eder ve mayoz bölünmenin tamamlanabilmesi fertilizasyonun gerçekleşmesi gerekir (15, 16). Oosit maturasyonu, üreme hücresinin mayoz bölünme sırasında profaz I evresinden metafaz II evresine kadar olan olaylar zinciri olarak kabul edilmektedir. Olgunlaşma süreci ise nüklear ve sitoplazmik maturasyon olarak incelenmektedir (13, 18, 20).



Antral Folikül



Graff Folikülü

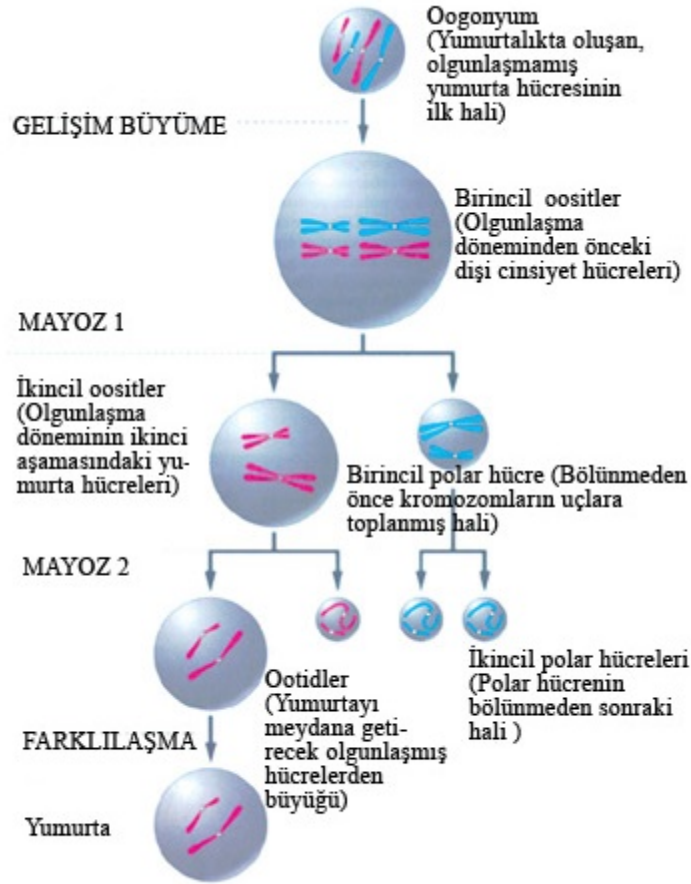
Şekil 2 2 Antral Folikül ve Graff Folikülü

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

2.4. Nükleer Maturasyon

Nükleer maturasyonun başlamasında LH tetikleyici bir özelliğe sahiptir, ancak maturasyonun devamı için östrojen başta olmak üzere steroidlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Profaz I'de bekleme halinde olan, çekirdek zarı henüz yıkılmamış hücre çekirdeğine germinal vezikül (GV) denilmektedir. Oosit olgunlaşmasında meydana gelen ilk olay hücre çekirdek zarının yıkılmasıdır (Germinal Vezikül Dağılması-GVBD). GVBD, LH uyarısı ile başlamaktadır. Bunu takiben, iğ iplikçikleri oluşumu, kromozom yoğunlaşması, homolog kromozomların metafaz plağı üzerinde yerleşmesi meydana gelmektedir. Metafaz I'in bitişinden sonra, anafaz I ve telofaz I oluşur ve bunun sonucunda asimetrik sitokinezis oluşarak sekonder oosit ve 1. polar cisim gelişir. İkinci mayoz bölünme İnterfaz evresine girilmeden başlar. Ovulasyon, 2. mayoz bölünmenin metafaz-II evresinde meydana gelen duraksama sırasında gerçekleşir. İkinci mayoz bölünme spermatozoon penetrasyonu ile tamamlanmış olur (13, 18, 19, 20).

Sonuç olarak, oluşan iki hücreden biri sitoplazma yönünden daha zengin olup gerçek oositir. İkinci hücre ise, sitoplazma yönünden daha fakir olmasına rağmen yine de mitokondri, ribozom ve kortikal granüllere sahiptir. Bu hücre 2. polar cisim adıyla isimlendirilir (13, 19, 20).



Şekil 2. 3 Mayoz Bölünme

<http://www.biyolojidersnotlari.com/mayoz-ve-eseyli-ureme-biyoloji-ders-notlari.html>

2.5. Sitoplazmik Maturasyon

Perivitellin aralık, birinci kutup cismin oluşmasıyla birlikte genişler ve şekillenir. Mitokondrilerin sayısında artış olur ve yapısal değişimleri gerçekleşir. Kortikal granül golgi komplekslerinden salınmaya başlar ve ooplazma granüllü bir hal alır. Oositin gelişimi ile birlikte, mitokondriler periferal bir konuma sahip olmaktadır ve sitoplazmik maturasyonda mitokondrilerin önemli bir role sahip oldukları bilinmektedir. Mitokondriler, hücre içi metabolik olaylarda, hücre proliferasyonunda hücre farklılaşmasında etkilidirler(13). Oosit ve follikül büyümesi, kromozom düzenlenmesi ve ovulasyon olaylarının eşzamanlı ve uyumlu bir biçimde gerçekleşmesi, başarılı bir fertilizasyon olması için gereken ana etmenlerdir.

Metafaz destekleyici faktör (MPF) bu noktada önemli bir rol oynamaktadır. MPF, oosit olgunlaşmasını tetikleyen bir faktördür. GVBD, kromozom yoğunlaşması ve iğ iplikçiklerinin oluşumu gibi bir seri olayın sorunsuz olarak başlamasında önemli bir role sahiptir (10).

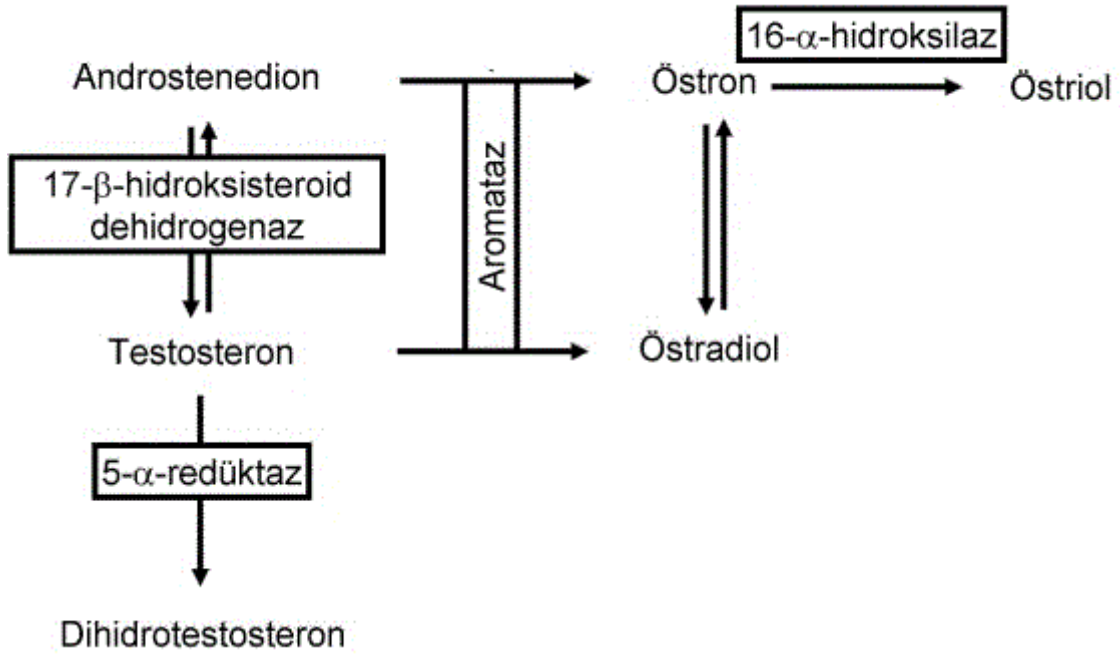
Zona pellusida ile çevrelenmiş primer oositin mayoz profazını erken tamamlamasını engellemek için bir mekanizma gerçekleşir. Bu mekanizmada OMI (oosit maturasyon inhibitörü) folikül hücrelerinden oosite geçer. OMI, bir foliküler hücre proteindir. Foliküler hücrelerin ince sitoplazmik bağlantıları zona pellusidayı geçerek oositin plazma membranı ile gap junctionlar aracılığı ile bağlantı kurar. Oositin spontan mayoz olgunlaşmaya girmesini engeller. Ovulasyondan hemen önce, mayotik profazın tamamlanmasını uyararak için , oosit kendisini matürasyon (olgunlaşma) başlatan faktör ile aktive eder.

MPF (cdc2-siklinB kompleksi), (matürasyon başlatan faktör) 1.metafaz evresinden önce çekirdek zarının yıkımını uyarır. MPF etkisi ile birinci kutup cisimi oluşur (21).

2.6. KümüLüs Hücrelerinin İn Vitro Maturasyon Üzerine Etkileri

Oositi çevreleyen granüloza hücreleri kümülüs oophorusu oluşturur. KümüLüs hücreleri, üreme hücrelerinin yeterli beslenmesi ve gelişim kapasitesine ulaşmasında önemli bir konuma sahiptir. (22, 23). Granüloza ve teka hücreleri, mayotik dinlenme boyunca üreme hücresinin ihtiyaçlarının karşılanmasına ve maturasyona başlayan üreme hücrelerinin gelişim kabiliyeti kazanmasında rol oynarlar. Granüloza hücreleri ile birlikte bu yapıya KümüLüs Oosit Kompleks (KOK) adi verilmektedir (23). Bütün bu hücreler ve oosit otokrin, parakrin hormonlar ve büyüme faktörleri sayesinde ilişki içindedirler. Ek olarak, kümülüs hücreleri ile oosit, gap junction adı verilen ve çok yakın hücreler arasında iyon geçişinin sağlandığı özel bölgeler aracılığıyla bağlantı kurarlar (24).

Granüloza hücrelerinde preovulatuvar dönemde FSH ve LH reseptör sayısı artarak follikül gelişimi uyarılır. Etki ilk olarak granüloza hücrelerinde üretilen E2 ile kuvetlenir. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF) I ve II'de FSH etkisi ile kuvvetlenmektedirler. IGF'ler granüloza hücre fonksiyonunda gonadotropinlerin etkilerini arttırırlar. IGF I'in sistemik dolaşımdan, IGF II'nin ise lokal olarak granüloza hücrelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir.- Artan IGF I'in etkisi ile; FSH etkisiyle birlikte progesteron ve östrojen sentezi artar, LH reseptörleri artar. Yeterli LH reseptörü oluşunca, LH direkt olarak granüloza hücrelerine etki ederek luteinizasyona ve progesteron oluşumuna neden olur. İnhibinin LH aktivitesini kuvvetlendirmesi sonucu androjen ve östrojen sentezi artış gösterir. Teka hücrelerine LH etkisi teka interna tabakası, bir androjen prekürsoru olan androstenediyonu salgılar. Testosteron üretimi için androstenediyon folikül hücrelerine taşınır. Daha sonra testosteron aromataz tarafından östradiole çevrilir. Yapılan granüloza hücrelerinin oositin in-vitro matürasyonuna da pozitif etkileri vardır. Bu hücreler salgıladıkları gonadotropinlerle ve reseptörler sayesinde oositin ilk etkileşimini sağlamaktadırlar (25).



Şekil 2 4 Granüloza Hücrelerinde Östrojen Üretimi

Östradiol-17beta (östradiol en etkin olan ve en çok bulunan ovaryum östrojenidir) ve granüloza ve granüloza lutein hücrelerinde üretilir. Daha az etkin bir östrojen olan östriol ise gebelik sırasında karaciğerde östrondan belli bir miktarda üretilir. Östron bunlar arasında etkinliği en az olanıdır, östradiyol ya da andrestenediyonun dönüştürülmesiyle yapılır.

Androjenler ve östrojenlerin prekürsoru olan progesteron, luteal hücrelerde ve foliküllerde sentezlenir. Zayıf olan androjenler (androstenediyon ve dehidroepiandrosteron) teka interna hücrelerinde üretilir. Ovaryumun diğer hormonları, relaksin, aktivin ve inhibindir. Relaksin hem ovaryum hem de plasentada üretilir. Relaksin, doğumu kolaylaştırmak için serviksin yumuşamasını sağlar (25).

Kümüls hücrelerinin yüzey arttırıcı sitoplazmik çıkıntıları ZP (Zona Pellusida) üzerinde oosit sitoplazma zarının mikrovillusları ile desmozom tipi ve gap-junction bağlantıları sayesinde oosite küçük moleküllerin ve kendi salgıladıkları az miktardaki gonadotropinlerin transportunu sağlar. Ayrıca reseptör artışını indüklemek suretiyle

östrojen, progesteron ve kısmen de androjen salgısında artışa yol açarak oosit olgunlaşmasına katkıda buldukları bilinmektedir (26).



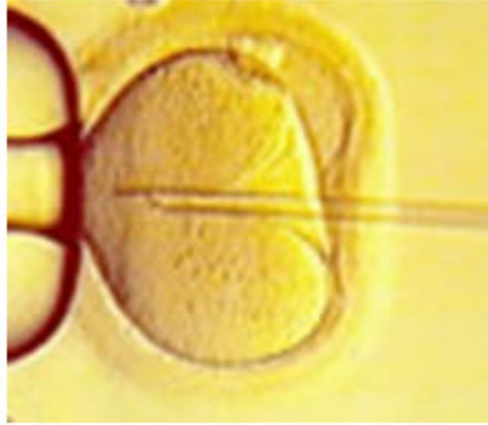
Şekil 2 5 Kümülüs Oophorus

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

2.7. ICSI (Intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu)

Ejekülasyon ile ya da testisten cerrahi yöntemlerle elde edilen sperm, “sperm hazırlama” teknikleriyle hazırlanır. Bir yumurtanın içine canlı bir sperm özel cihazlar kullanılarak ICSI yöntemiyle yerleştirilir. Günümüzde tüp bebek tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ICSI, tüp bebek tedavisinde döllenme aşamasında uygulanan bir tekniktir ve bunu amacı yumurtanın en başarılı şekilde ve en yüksek oranda döllenmesidir. Semen örneğindeki en kaliteli spermlerden biri belirlenir, sperm hücresinin kuyruğu hareketsizleştirilir ve hassas mikroskopik enjektörle alınır. Sperm, enjektör vasıtası ile yumurta hücresinin içerisine yerleştirilir. Bu işlemin uygulanmasından önce yumurta etrafındaki hücreler temizlenir. Olgun yumurta M2 aşamasında olmalıdır ve M2 aşamasında olan yumurta hücresi belirlenerek döllenme işlemi gerçekleştirilir. Daha sonra inkübatör olarak adlandırılan özel ortamlarda saklanılır.

ICSI işleminden bir sonraki gün, yumurtada iki pronukleus (çekirdek) gözlenmesi, yumurtanın döllendiği anlamına gelir. Bu çekirdeklerden biri anneden, diğeri ise babadan köken alır.



Şekil 2 6 Mikroenjeksiyon İşlemi

(Fotoğraf Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezi'nden alınmıştır)

2.8. Embriyo Değerlendirmesi

2.8.1. Fertilizasyonun Değerlendirilmesi:

Fertilize bir oosit 2 pronukleus (PN) ve 2 polar cisim içermelidir. İnseminasyon işleminden 16-18 saat sonra kontrol edilebilir.



şekil 2 7 Birinci gün iki çekirdeğin izlendiği döllenmiş bir yumurta görüntüsü

(Fotoğraf Medicana Bahçelievler Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır)

Pronkleer oositlerin morfolojik olarak normal olarak değerlendirilebilmeleri için her iki PN'nin sitoplazmada merkezi durumda, birbirine yakın ve eşit büyüklükte olması gerekmektedir.

ekirdeikler, küçük, çok sayıda ve dağınık olarak bulunmaktadırlar. Zamanla kaynaşır, sayıları azalarak büyürler ve sıklıca birbirlerine yapışarak yan yana sıralanırlar. alışmalar, ekirdeiklerin aynı sayıda ve aynı hizada olmasının daha yüksek embriyo geliştirme potansiyeline sahip olmalarını göstermektedir.(27).

2.8.2. İkinci ve Üçüncü Gün Embriyo Değerlendirmesi

Embriyo puanlama da, yüksek tutunma potansiyeline sahip embriyoları belirleyebilmek için, bölünme evreleri değerlendirilmelidir.

Bölünme evresinde; fragmantasyon oranı, blastomer boyutu, bölünme hızı, perivitellin alan, sitoplazmik görüntü, blastomerlerin nükleer durumu ve zona pellusida özellikleri değerlendirilmektedir (27).

2.8.2.1. Erken Bölünme

Yaklaşık yirmi saat sonra, fertilize olan yumurta bölünmeye başlayarak 2-hücreli bir embriyo oluşturmaktadır. Yirmi beşinci saatte, döllenmiş yumurtaların ortalama %20'si 2-hücreli evrede bulunmaktadır.

Erken bölünen embriyoların (ICSI işleminden 20 - 26 saat sonra) daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip oldukları bir kriter olarak değerlendirilmektedir (27).



Şekil 2 8 Erken bölünme gözlenen iki hücreli bir embriyo

(Fotoğraf Medicana Bahçelievler Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır)

2.8.2.2. Bölünme Hızı

İyi kaliteli bir embriyonun, 2. günde (42-44. saat) 4-5 blastomer ve 3. günde (66-68. saat) en az 7 hücreye sahip olması gerekmektedir. Embriyo tutunma oranlarında, çok yavaş ya da çok hızlı embriyo gelişiminin olumsuz yönde etkisi olduğu bilinmektedir.



2 hücreli embriyo



4 hücreli embriyo



3. günde 8 hücreli bir embriyo

Şekil 2 9 Embriyo Gelişimi

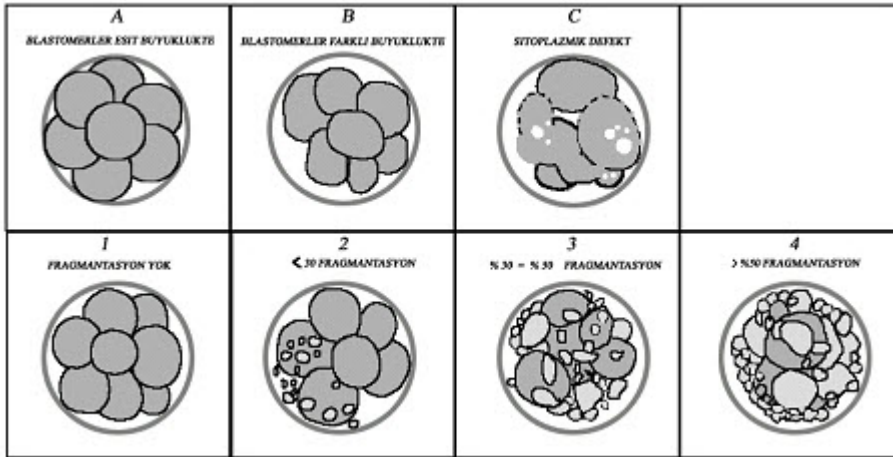
Fotoğraflar Medicana Bahçelievler Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır.

2.8.2.3. Fragmantasyon

Fragmantasyon anükleer, membrana bağlı bir ekstraselüler sitoplazmik yapı olarak tanımlanabilir. Fragmentlerin hücrelerden ayrımı öncelikle yapılmalıdır. Fragmantasyon insidansını değerlendirmek zordur.

1. Fragmantasyon yok,
2. %20'den az fragmantasyon,
3. %20-50 fragmantasyon,
4. %50'nin üzerinde fragmantasyon.

Embriyolar yukarıda belirtilen özellikler dikkate alınarak değerlendirildiğinde, 2. günde 4A1, 3. günde 8A1 en iyi kalitede embriyoyu ifade eder (27).



Şekil 2 10 Fragmantasyon Oranı Değerlendirilmesi

(<http://www.florence.com.tr/tupbebek/tup-bebek/624-embriyo-atlasi.html>)

2.8.3. Dördüncü Gün Embriyo Değerlendirilmesi (Morula evresi)

Bu evredeki bir embriyo ICSI işleminden sonra 92 ± 2 saattedir. Kompakt şekle geçmektedir ve klivajın dördüncü kısmına girmektedir. Day-4 embriyo morfolojisindeki çeşitlilik görünüşe göre dışlanacak hücreleri içerir, etkisi açık değildir. Bunun istisnası yarıdan fazla embriyonun dışlanmış olmasıdır ki böyle bir durum zayıf prognoza işaret eder.

2.8.4. Blastokist puanlama sistemi, (27)

Blastokist puanlama sistemi 3 parametreden oluşmaktadır.

1. Blastosel büyüklüğü

Erken blastokist: Blastosel embriyo hacminin yarısından daha az alan kaplar.

Blastokist: Blastosel embriyo hacminin yarısından daha fazla alan kaplar.

Tam blastokist: Blastosel tamamen embriyoyu kaplar.

Genişlemiş blastokist: Blastosel hacmi erken dönem embriyodan daha büyüktür ve zona incelmeye başlamıştır.

Çatlama (Hatching) başlamış blastokist: Blastokist zonadan dışarı çıkmaya başlamıştır.

Çatlamış blastokist: Hatching işlemi tamamlanmıştır. Trofoektoderm zonadan kurtulmuştur.

2. İç hücre kitlesi

A. Sıkıca paketlenmiş çok sayıda hücrelerden meydana gelmiş ve az sayıda hücreye sahip iç hücre kitlesi

B. Az sayıda hücreye sahip iç hücre kitlesi.

3. Trofoektoderm (dış hücre kitlesi)

- A. Tek katlı yassı ve çok sayıda epitel hücrelerinden meydana gelmiş bir trofoektoderm
- B. Gevşek olarak düzenlenmiş, az epitel hücrelerinden oluşan trofoektoderm
- C. Çok az sayıda ve büyük hücrelerden meydana gelen trofoektoderm (27).



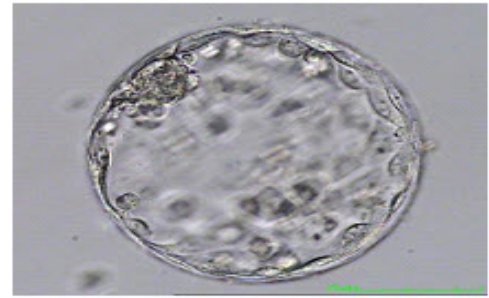
Genişlemiş blastokist



Hatching başlamış bir blastokist



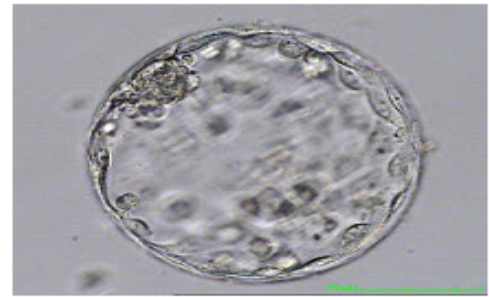
A sınıfı iç hücre kitlesi



B sınıfı iç hücre kitlesi



A sınıfı trofoektoderm



B sınıfı trofoektoderm.

Şekil 2 11 Blastokist Değerlendirmesi

(<http://www.florence.com.tr/tupbebek/tup-bebek/624-embriyo-atlasi.html>)

2.9. Apoptozis'in Tanımı ve Temel Özellikleri

Apoptozis, genetik olarak düzenlenen bir hücre ölüm programıyla hücrenin kendini öldürmesidir.(21). Gelişmiş organizmalarda, fonksiyonlarını kaybeden hücrelerin çevreye zarar vermeden programlı ölümü olarak tanımlanmaktadır (28, 29).

Bir hücrenin farklılaşma, bölünme, yaşam ya da ölüm konusundaki karar, hücre içi ve dışındaki faktörlerin etkileşimlerine göre değişir. Hücrenin ölümü yönündeki yol apoptozisle sonuçlanır. Hücrenin ölmesi, çoğalması ya da yaşamını bölünmeden sürdürmesini belirleyen üç ana etken vardır. Bunlar, besin maddeleri, büyüme faktörleri ve hücre dışından gelen sinyallerinin varlığı ya da yokluğuna bağlıdır. Ayrıca, dış etkenler nedeniyle DNA yapısının bozulması ölüm-yaşam kararının verilmesinde belirleyici rol oynar (30).

Mitokondri, hücre içi ya da dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Zar yapısının bozulması ile ATP zincirinde yer alan Sitokrom C, hücre sitoplazmasına geçerek inaktif halde bulunan Apaf-1 molekülüne bağlanarak aktif hale getirir ve Apoptozom adı verilen bir yapının oluşmasına neden olur. Apoptozom, kaspaz-9'u, kaspaz-9 da diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktive ederek apoptozisin gerçekleşmesine neden olur. Mitokondride dış zar potansiyeli Bcl-2 ailesi denilen bir protein grubu tarafından düzenlenir. İster hücre dışı isterse hücre içi mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir (31, 32, 33).

Apoptozis'e giden hücreler, hücreler arası bağlantılarını kaybederek büzülür, kromatin parçalanır ve hücre küçük apoptotik cisimler oluşturmak üzere yıkılır. Bu cisimler makrofajlar sayesinde fagosite edilir ve bu nedenle inflamasyon görülmez.

Ek olarak, Bax proteini, mitokondriyodan sitoplazmaya sitokrom c çıkışını uyarır diğer apoptotik proteazları aktive eder. Bax'ın etkisi bcl-2 proteinin bağlanmasıyla önlenir (21).

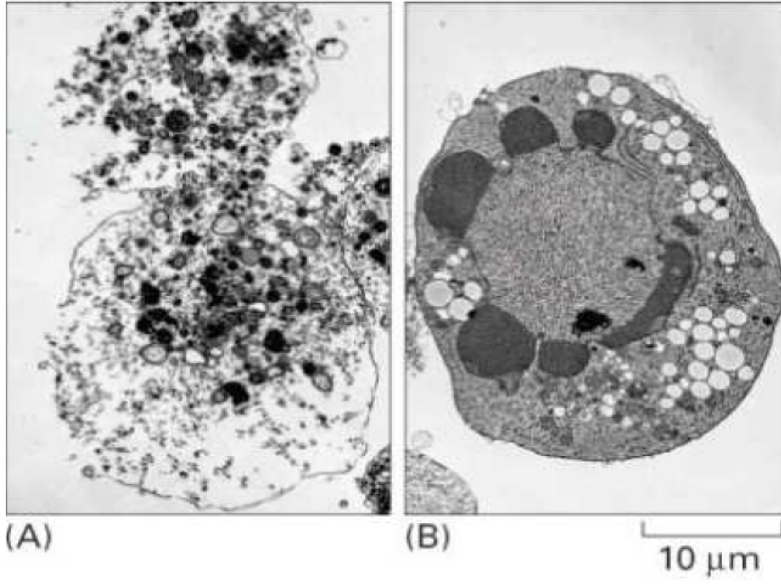
Diğer bir hücre içi faktör ise p53 proteindir. Asıl fonksiyonu, DNA bir şekilde hasar gördüğü zaman hücre siklusunu durdurup, hücrenin hasarlı DNA'sını tamir etmesidir. Bu yüzden gen koruyucusu olarak da tanımlanır. Ancak hasar büyükse bu kez p53 ters etki göstererek hücreyi apoptozise götürür. Ayrıca, IL-2, Koloni Uyarıcı

Faktörler (CSF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF), Nöron Büyüme Faktörü (NGF), Tümör Nekroz Faktörü (TNF) gibi maddelerin ortamda azalmasının yanı sıra, ilaçlar glukokortikoidler, virüsler, radyasyon, çeşitli antijenler de apoptozisi uyarabilir.

Ovaryumda Folikül atrezisi olarak bilinen işlem apoptozisdir. Hücrelerinin ölümü genetik olarak belirlenmiştir. İn vitro çalışmalarda, atreziye giden foliküllerden alınan kümülüsleri olan embriyolarda blastokist aşamasına ulaşmasının oldukça zayıf olduğu görülmüştür. Apoptozis, ovaryumda normal olmayan foliküler gelişim sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Atrezinin hücrel mekanizması, daha çok mRNA ve protein sentezi ile ilgilidir. Bu da, belirli bir düzen içerisinde hücrelerin sahip olduğu DNA materyalinin kaybı ve nükleer genomik havuzun dağılması ile sonuçlanır. Aynı zamanda apoptozis, korpus luteumun luteolizisini de sağlayan mekanizmadır. Granüloza hücreleri, apoptozisten etkilenen ilk hücrelerdir. Antral foliküllerdeki granuloza hücrelerinde apoptozisin başlaması hormonal kontrol ile birlikte parakrin / otokrin sinyallere bağlıdır. Geçmiş çalışmalara göre, gonadotropinlerin azlığı ovaryumda atreziye yol açmaktadır. Ayrıca, büyüme faktörleri de ovaryum gelişiminde önemli rol oynar. IGF, apoptozisin düzenlenmesi olayında önemli roller üstlenir. Granüloza hücrelerinde, androjenler apoptozisi uyarır. Teka hücrelerinde ise apoptozisin mekanizması halen araştırılmakla beraber kaspaz-1 ve Bcl-2'in sürece dahil olduğu bilinmektedir. Foliküler gelişimin primordial safhalarında ise apoptozisten ilk etkilenen hücre oositir. Oosit apoptozisini, parakrin faktörlerin uyardığı düşünülmektedir. Bu faktörlerin varlığı, foliküler aşamada gelişim yetersizliği olan oositlerin maturasyonunu engelleyen bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Apoptozis, embriyonun implantasyonundan sonra blastosöl oluşumunu da içeren birçok fonksiyonu yerine getirir. İmplantasyondan önce ise embriyo çoğu erken bölünme safhasında olmak üzere hücre kaybeder. Kümülüs hücrelerinde ki apoptozis frekansı ile oosit kalitesi arasındaki ilişki konusundaki çalışmalar çelişkili sonuçlara ulaşmıştır. Yine de, kümülüs hücrelerindeki apoptozis kesin olmamakla beraber, embriyo gelişim potansiyeli için bir işaret olabilir. Kümülüs hücreleri, oosit maturasyonu, sinyal salınımı ve düzenlenmesi fonksiyonları ve fertilizasyonunda kritik rol oynar (34 - 37).

Canlı organizmalarda ‘apoptozis’ ve ‘nekroz’ olmak üzere iki tip ölüm çeşidi vardır. Nekroz, klasik hücre ölümüdür ve fizyolojik şartlar altında meydana gelir. Hücre

içine Ca ve su girişı gözlenir. Fazla Ca girişinde, hücrelerde endonükleazlar aktifleşir ve DNA da kırıklar oluşarak nükleus zarı parçalanır. Fazla su girişinde ise hücreler şişer ve parçalanır (38, 39).



Şekil 2.12 Nekroz ve Apoptozisin elektron mikroskobu görüntüleri, (A) Nekroz, (B) Apoptozis (38)

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik özellikler	Hücre membran bütünlüğünün kaybı Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı, membranda cepchiklerinin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Hücresinin intakt mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4°C 'de gerçekleşebilir DNA rasgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4°C 'de gerçekleşmez DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni) Prelitik DNA fragmentasyonu (erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

Şekil 2.13 Nekroz ve Apoptozisin karşılaştırılması (39)

2.9.1. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisde görülen değişikliklerin çoğu, kaspazların aktive olmaları ile gerçekleşir. Apoptozisin indüklenmesinde, temel olarak 3 yol vardır. Bunlar

- 1- Mitokondriyal Yol ile Apoptozis (40)
- 2- Dış sinyaller Yolu ile Apoptozis (41, 42)
- 3- Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis (43 - 45)

2.9.2. Apoptozis'in Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi belirlemek için birden fazla yöntem kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda apoptozisin saptanmasında en çok kullanılan histokimyasal yöntemlerden biri olan TdT-mediated dUTP-FITC nick end-labeling (TUNEL) yöntemini kullandık.

Hücrede apoptozisi belirleme yöntemlerini şu şekilde sınıflandırabiliriz;

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

- Işık mikroskobu ile : Giemsa ve Hematoksilen ile boyama
- Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı ile : Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür ile boyama
- Elektron mikroskobu ile
- Faz kontrast mikroskobu ile

2. İmmünohistokimyasal yöntemler- Anneksin V Yöntemi

- TUNEL Yöntemi
- M30 Yöntemi
- Kaspaz-3 Yöntemi

3. Biyokimyasal yöntemler

- Agaroz Jel Elektroforezi
- "Western" Blotting
- Akım "Flow" Sitometre

4. İmmünojenik yöntemler

- ELISA
- Florimetrik Yöntem

5. Moleküler biyoloji yöntemleri [38]

2.9.2.1. TUNEL Yöntemi

Tunel yönteminde, DNA kırıklarının serbest 3'OH kısmı biotin, digoxigenin ya da florescein gibi nükleotidler aracılığı ile enzimatik etiketlerin bağlanması ile belirlenir (46). Apoptozis çalışmalarında yaygın kullanılan metotlardan biri olan Tunel, ilk kez 1992'de Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (46).

İşaretlenen hücreler, flow sitometri ya da immünohistokimyasal yöntemlerle incelenebilir.

Tunel metodu uygulanan doku kesitleri, hematoksiyen ile zıt boyama yapıldıktan sonra incelenir. Parafinle bloklanan kesitler ise, sırayla deparafine ve dehidrate edildikten sonra, çeşitli tamponların ve çözeltilerin kullanıldığı işlemlerden geçirilir (28).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Oositlerin Toplanması

Bu çalışmada 30 gönüllünün (38 yaş üstü ve endometriozis vakaları dahil edilmemiştir) oosit ve kümülüs hücreleri değerlendirilmiştir. Hastaların folikülleri belirli büyüklüğe geldikten sonra çatlatma iğnesi yapıldı ve 36 saat sonra yumurtalar toplandı. Yumurtaların toplama işlemi vajinal yoldan yapılan (transvaginal) ultrasonografi yardımıyla gerçekleştirildi. Foliküller vajene yerleştirilen bir ultrason probu ile görüntülendi. Vajen duvarından geçerek yumurtalığa doğru ilerletilen bir iğne aracılığı ile buradaki folliküllerin içindeki sıvı aspire edildi. Bu sıvı ile birlikte gelen yumurta stereomikroskop altında bulunarak toplandı. Yumurta toplama işlemi sırasında önceden hazırlanmış hepes tamponlu özel bir kültür mediumu (G-MOPS-plus) kullanıldı.

Bizim çalışmamızda da stimüle edilmiş siklulardan alınan immatür oositlere IVM yöntemi uygulanmıştır ve embriyo gelişimleri yönünden gözlenmiştir. IVF laboratuvarında, IVM sonrası matür hale gelen oositlere ICSI (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) işlemi uygulandıktan sonra fertilizasyon, erken bölünme, fragmentasyon ve blastomer eşitliği yönünden takip edilmiştir. M2(matür) ve GV (immatür) oositlerin kümülüsleri slaytlar-lam (polysinli) üzerine yayılarak apoptozis belirleyen kit ile flow-sitometri cihazında her hasta için iki yüz adet kümülüs hücresi sayılarak apoptozis yönünden incelenmiştir.

3.2. Kümülüslerin Değerlendirilmesi

Stereo mikroskop altında kümülüs oosit kompleksleri değerlendirildi. Maturasyon, oositleri çevreleyen kümülüs hücrelerinin genişlemesi bakımından değerlendirildi.

Buna göre kümülüs hücrelerinde genişleme olan oositler matür olarak kabul edildi. Olgun olan ve olmayan oositler olmak üzere iki gruba ayrıldı. Ve Yumurta toplama işleminden sonra, laboratuvarında özel (IVF-plus-vitrolife) kültür mediumu içine alınarak %6 CO₂ ve %5 O₂ ve 37 derece sıcaklığında bulunan inkübatöre kaldırıldı.

3.3. Hyase (Yumurta Soyma İşlemi)

Yumurta toplama işlemi sonrası (2-4 saat) hyaluronidase enzimi (vitrolife-hyase)ve 150 µl 'lik stripper pipet yardımı ile ayrı ayrı kültür kaplarında bulunan olgun olan ve olmayan oositlerin kümülüs hücreleri uzaklaştırıldı. Ve M2 oositler kültür mediumuna (G1.5 plus), Gv oositler ise IVM kültür mediumuna (Origio-Medicult) kaldırıldı.

Denüstasyon işlemi sonrası geriye kalan M2 ve GV oositlerin kümülüsleri ayrı olarak alındı ve santrifüjde yıkanarak hyase enzimi uzaklaştırıldı.

M2 oositlerin kümülüs hücreleri lam-slayt (polysine'li) üzerine yayılarak kurumaya bırakıldı ve en az bir saat fiksatifte bekletildi.(Apoptotik değerlendirme için)

GV oositlerin Kümülüs hücreleri aynı şekilde lam-slayt (polysine'li) üzerine yayılarak kurumaya bırakıldı ve en az bir saat fiksatifte bekletildi.(Apoptotik değerlendirme için)

3.4. Mikroenjeksiyon

Mikroenjeksiyon işlemi için petriye hareketli spermatozoonları içeren sperm havuzu yapıldı ve oosit damlacıkları ile sperm havuzu arasına polivinilpirolidon (PVP) içeren bir çizgi şeklinde havuz yapıldı, mineral yağ ile kaplanarak damlacıkların üzeri kapatıldı. M2 oositler inkübatörde bulunduğu petriden alınarak damlacıkların içine yerleştirildi. Sperm havuzuna swim-up yöntemi ile hazırlanmış sperm örneği pipet ile koyuldu ve hareketliliği ve morfolojisi en iyi olan spermeler seçilerek PVP havuzuna aktarıldı. Sonra sperm kuyrukları ICSI iğnesi ile immobilize edildi. M2 oositlere mikroenjeksiyon işlemi uygulandı ve 25 µl drop içeren G1.5 (vitrolife) kültür mediumuna kaldırıldı. 16-18 saat sonra fertilizasyon değerlendirildi. Fertilizasyon sonrası her gün embriyo değerlendirilmesi yapıldı.

GV oositler ise IVM mediumuna kaldırıldı. (Origio-Medicult IVM Medium).Yaklaşık 24 saat IVM mediumunda inkübe edilen GV oositler değerlendirildi. 24 saat sonra maturasyonunu tamamlayan oositlere mikroenjeksiyon işlemi uygulanarak 25 µl

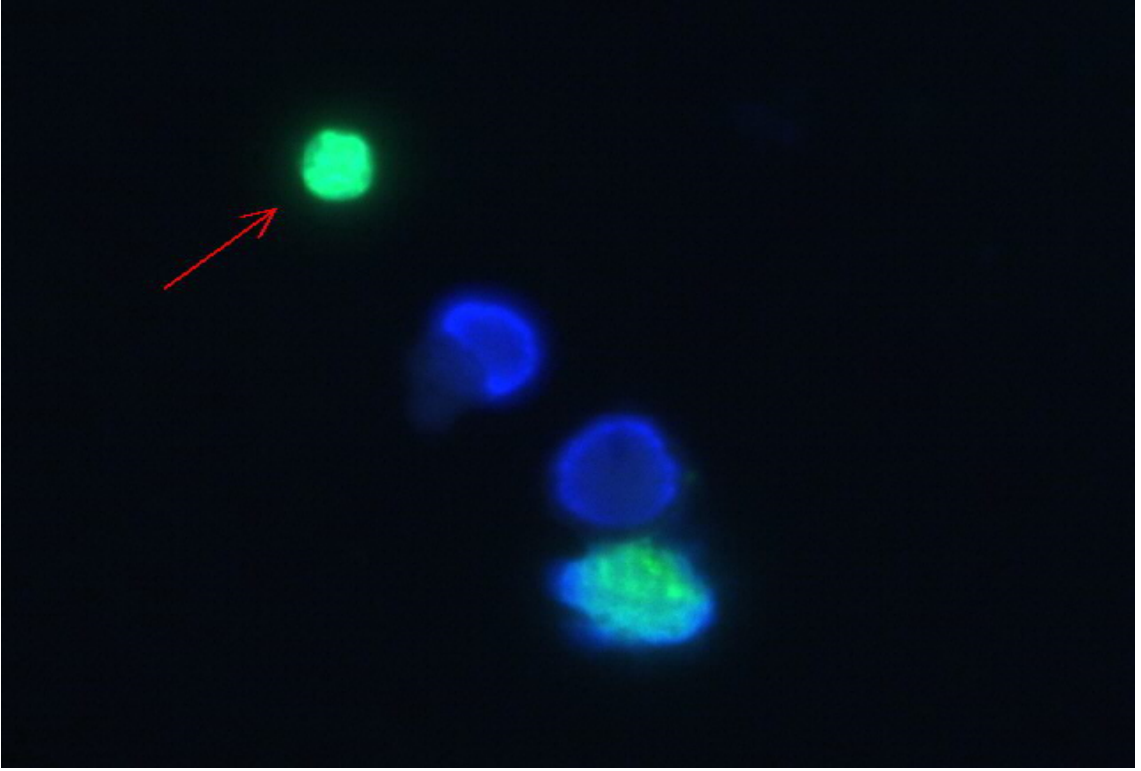
drop içeren G1.5 (vitrolife) kültür mediumuna kaldırıldı. 16-18 saat sonra fertilizasyon değerlendirildi. Fertilizasyon sonrası her gün embriyo değerlendirilmesi yapıldı.

3.5. IVM (In Vitro Maturasyon) Medium Hazırlanması;

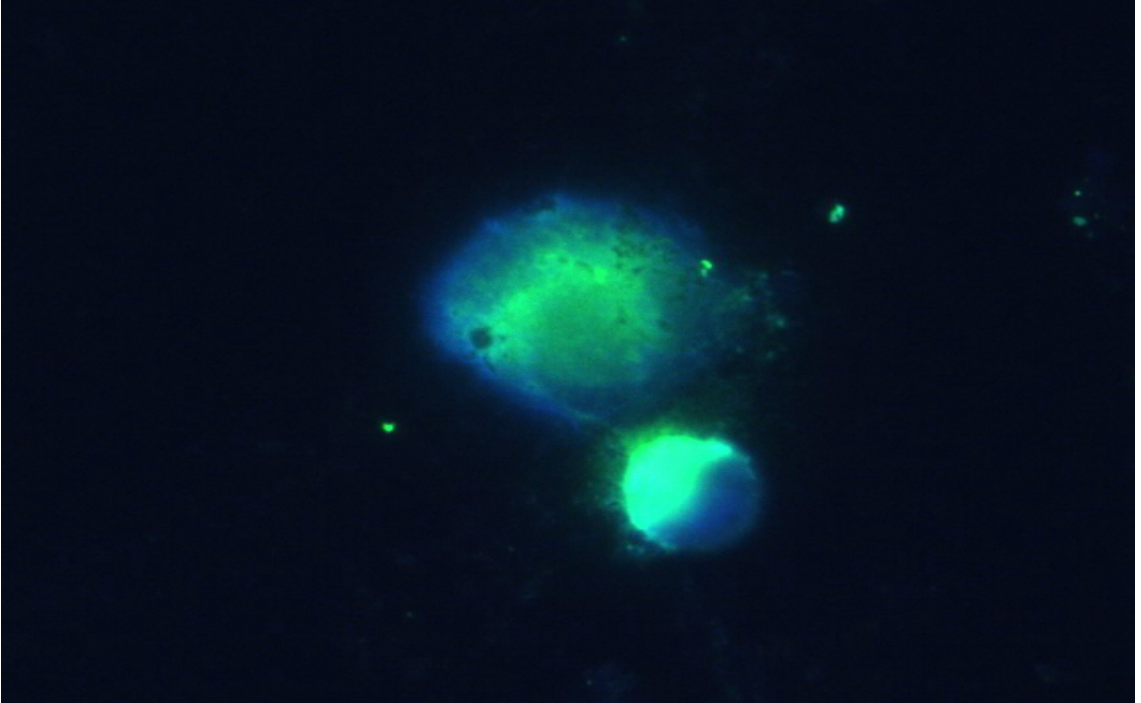
Oosit toplama işleminden bir gün önce 9 ml Origio IVM medium üzerine 1ml HSA (human serum albumin), 10 µl HCG (insan koryonik gonodatropin) ve 100 µl FSH (folikül stimulan hormon) eklendi. %5-%6 CO₂ ortamında inkübe edildi. İmmatür oositleri yerleştirmek üzere 25 µl drop içeren petri kabına koyuldu ve üzeri yağ ile kaplanarak inkübatöre kaldırıldı.

3.6. Apoptotik Değerlendirme İçin Yıkama ve Çalışma Protokolü;

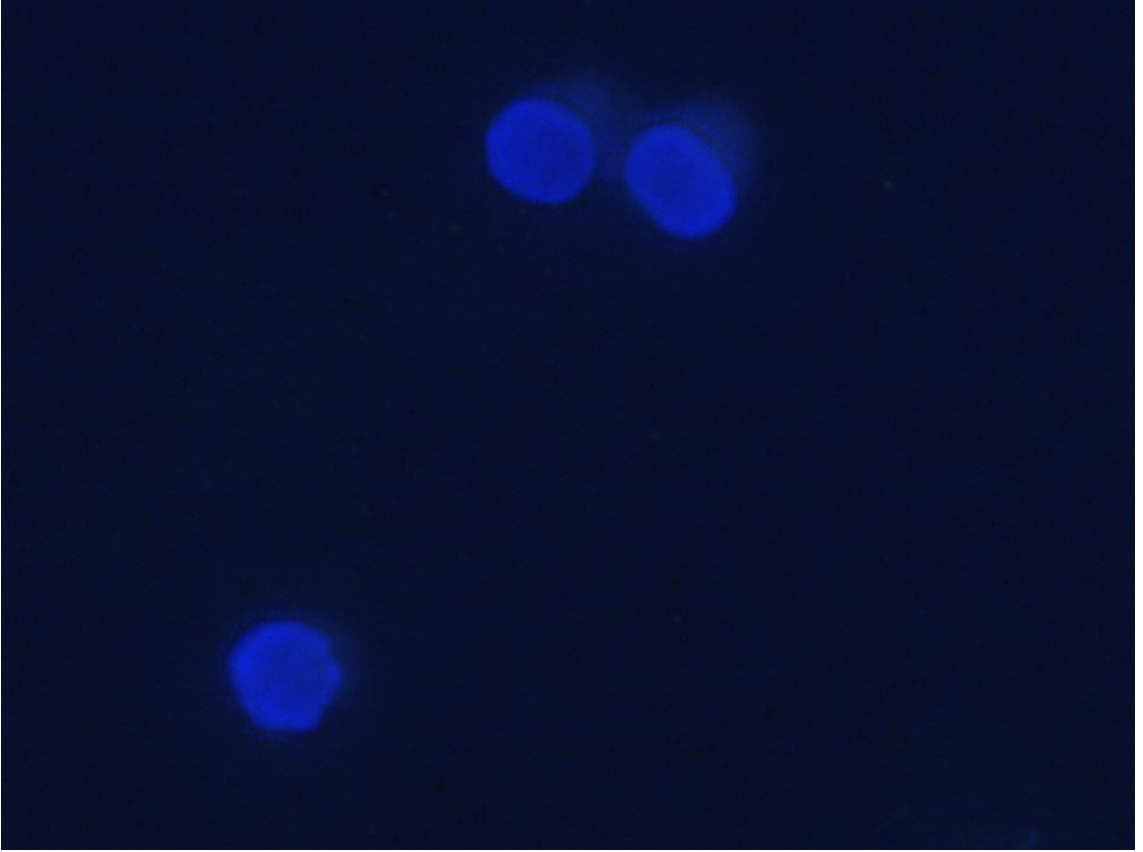
- i. Kümüllüsları yaymış olduğumuz slaytlar-lam buz üzerine konarak 2 dakika % 0.1 Triton-X/ %0.1 sodyum sitrat karışımında bekletildi (0.1 gr sodyum sitrat + 100ml dH₂O + 100 µl Triton-X)
- ii. 2 defa PBS ile yıkandı,oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- iii. Çalışılacak alan marker kalem ile işaretlendi ve işaretli alana 10 µl Tunel mix eklenerek lamel ile kapatıldı. (tunel mix: 1µl enzim solüsyonu + 9 µl label solüsyonu)(In Situ Cell Death Detection Kit,Fluorescein-Roche)
- iv. 37 derecede 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.
- v. Süre sonunda karanlıkta 3 defa PBS ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. (15-20dak.)
- vi. DAPI konularak analiz edildi. (200 kümülüs hücresi sayıldı.)
- vii. Yeşil ile boyananlar apoptozis (+), Mavi ile boyananlar apoptozis (-), Mavi-Yeşil boyananlar kısmi apoptozis olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1 TUNEL Görüntüsü-Yeşil-Apotozis (+)



Şekil 3.2 TUNEL Görüntüsü-Mavi-Yeşil Kısmi Apoptozis



Şekil 3.3 Tünel Görüntüsü-Mavi Apoptozis (-)

(Fotoğraflar Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezi'nden alınmıştır)

4. BULGULAR

Bu çalışmada maturasyonunu tamamlayan 46 GV oositten, ICSI sonrası 2. Gün 18(%39,1) ,3-4 hücre aşamasında embriyo, 3. Gün 20 (%43,4) 5-8 blastomer aşamasında embriyo, 5. Gün ise 10 morula(% 21,7) ve 3 blastokist (%6,5) aşamasında embriyo geliştirdi.

M2 oositlerden elde edilen kümülüs hücrelerindeki apoptozis GV kümülüs apoptozisinden düşük bulundu ($p < 0.0001$) IVM uygulanan tüm GV'lerde maturasyon %56,1, 2PN oluşumu %63,0 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1, 4.2).

Maturasyona bırakılan GV oositlerde matür hale gelen veya gelmeyen grupta kümülüs apoptozisi farklı bulunmadı ($p > 0.5$) IVM uygulanan GV'lerde embriyo geliştiren grupta 2PN oluşumu %35,4 olarak gözlemlendi (Tablo 4.2).

Oosit maturasyonu ve embriyo gelişiminin 3. gün LH değeri ile ve HCG günü E2 değeri ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır. (Tablo 4.5, $P=0.021$, $p=0.020$). Ancak bazal hormon değerlerinin gebeliği öngörmediği anlaşılmıştır (Tablo 4.5). Bazal LH değerlerinin GV oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi ile ilişkisi görüldü ($p=0.021$) HCG günü E2 değerinin maturasyonu tamamlayıp embriyo geliştiren GV oosit grubunda yüksek olduğu saptandı ($p=0.020$) (Tablo 4.5).

Toplam grubun ortalama GV apoptozis oranı ile ortalama M2 apoptozis oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. M2 lerde apoptozis oranı daha düşüktür (Tablo 4.2, 4.6) ($P=0.0005$).

İmmatür GV'ler ile matür GV'lerin ortalama apoptozis oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.7, 4.8, 4.9). Fertilize GV'ler ile fertilize olmayan GV'lerin ortalama apoptozis oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.10).

5. gün blastomer sayısı 10 'un altında olan matür fertilize GV'ler ile 10 ve daha fazla blastomere erişen GV'lerin ortalama apoptozis oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.11). Fertilize olmayan matür GV'ler ile fertilize olan ve embriyo geliştiren gruplar arasında apoptozis oranları anlamlılık göstermemektedir (Tablo 4.12).

GV apoptozisinin gebe olan ve olmayan gruplarda karşılaştırılması yapılmış, gebe olan grupta ve istatistiksel olarak anlamlı sınırına yakın daha düşük bir değer elde

edilmiştir (Tablo 4.13, P=0.059). Bu sonuç olgu sayısının artması durumunda anlamlılık sınırına ulaşılacağı düşüncesini getirmiştir.

GV apoptozis oranı ve GV apoptozis + GV şüpheli apoptozis oranı ile hormon değerleri ve diğer değişkenler arasında ilişki saptanamamıştır. Vaka sayısı yeterli olmadığı için non-parametrik yöntem olan Spearman R_o Korelasyon analizi uygulanmıştır (Tablo 4.14).

M2 apoptozisinin gebe olan ya da olmayan gruplarda farklılık göstermediği bulundu.

% GV oosit ile bazal FSH değeri arasında negatif , GV maturasyonu ile bazal LH değeri arasında pozitif korelasyon görüldü.

Tablo 4.1: Toplam 456 Oosit'in M2 ve immatür gruplarının dağılımı

	Sayı	%
Toplam folikül sayısı	532	
Toplam oosit	456	85,7
M2	321	70,4
M1	37	8,1
GV	98	21,5
ICSI yapılan M2	318	99,1
Döllenen M2	269	84,6
IVM uygulanan GV	98	100,0
24 saat sonra ICSI yapılan GV	51	52,0
ICSI'den 18 saat sonra 2PN oluşan GV	29	56
Morula Oranı	10	21,7
Blastokist Oranı	3	6,5

Tablo 4.2: Çalışma gruplarında oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi

	maturasyon + emb+		maturasyon + emb-		maturasyon- emb-	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
IVM uygulanan GV	82		11	-	5	-
24 saat sonra ICSI yapılan GV	46	56,1	5	45,5	-	-
ICSI'den 18 saat sonra 2PN oluşan GV	29	63,0	-	-	-	-

Tablo 4.3 :Maturasyona bırakılan M1 ve GV oositlerin % dağılımı

	maturasyon + emb+	+ maturasyon + emb-	maturasyon- emb-
	% (n)	% (n)	% (n)
M1	75,7 (28)	10,8 (4)	13,5 (5)
GV	83,7 (82)	11,2 (11)	5,1 (5)
M1+GV	81,5 (110)	11,1 (15)	7,4 (10)

Tablo 4.4: Grupların hormon değerleri ile karşılaştırılması

	maturasyon + emb+ (n=17)	maturasyon + emb- (n=8)	maturasyon- emb- (n=5)	Toplam (n=30)	(Kruskal-Wallis Test) χ^2	p
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$		
FSH_23	5,6 \pm 2,37	7,2 \pm 1,98	7,1 \pm 1,02	6,2 \pm 2,2	3,72	0,155
LH	9,1 \pm 3,55 #	6,50 \pm 2,5	4,7 \pm 1,16	7,6 \pm 3,42	7,68	0,021
E2	48,5 \pm 17,9	40,9, \pm 23,1	36,4 \pm 11,28	44,4 \pm 18,6	2,25	0,324
HCG günü_e2	3829,4 \pm 1439,1 #	2754,3 \pm 1383,8	1664 \pm 345,6	3181,8 \pm 1521,5	7,82	0,020

Tablo 4.5: Gebelik pozitif ve negatif olguların bazal hormon düzeyleri açısından karşılaştırılması

Gebelik	Negatif (n=15)	Pozitif (n=15)	Mann-Whitney U Test	
	$\bar{X}\pm S$	$\bar{X}\pm S$	z	p
LH	7,8±3,2	7,5±3,7	0,48	0,633
E2	42,6±18,1	46,2±19,7	0,73	0,468
FSH_23	5,9±2,3	6,6±2,1	0,69	0,493
HCG günü_e2	3145,3±1584,4	3218,3±1510,6	0,10	0,999

Tablo 4.6: IVM uygulanmış GV'lerde ortalama apoptozis oranı ile M2'lerde ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.

	Mean	t (Paired Samples Test)	p
GV apoptozis oranı (n=30)	0,52±0,10	6,25	0,0005
M2 apoptozis oranı (n=30)	0,33±0,15		

apoptozis oranı=yeşil/(mavi+yeşil+mavi-yeşil)

Tablo 4.7: Gruplarda ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.

	maturasyon + emb+ (n=17)	maturasyon + emb- (n=8)	maturasyon- emb- (n=5)	Mann-Whitney U Test	
	$\bar{X}\pm S$	$\bar{X}\pm S$	$\bar{X}\pm S$	z	p
GV apoptozis oranı	0,53±0,10	0,48±0,10	0,58±0,09	2,85	0,239
apoptozis_yesil + şüpheli apoptozis oranı	0,66±0,10	0,63±0,08	0,69±0,12	0,89	0,941

Tablo 4.8: Gruplarda ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.

	maturasyon + emb+ (n=17)	maturasyon + emb- & maturasyon- emb- (n=13)	Mann-Whitney U Test	
	$\bar{X}\pm S$	$\bar{X}\pm S$	z	p
apoptozis_yesil / toplam_hücre	0,52±0,10	0,51±0,10	0,25	0,802
apoptozis_yesil + şüpheli apoptozis oranı	0,66±0,10	0,65±0,09	0,23	0,818

Tablo 4.9: Matür ve immatür GV'lerde ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.

	Immatür GV (n=8)	matür GV (n=22)	Mann-Whitney U Test	
	$\bar{X}\pm S$	$\bar{X}\pm S$	z	p
GV apoptozis oranı	0,54±0,09	0,51±0,10	0,71	0,48
apoptozis_yesil + şüpheli apoptozis oranı	0,68±0,09	0,64±0,10	0,92	0,36

Tablo 4.10: Fertilize olan olmayan GV'lerde ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.

	fertilize olmayan GV (n=13)	fertilize GV (n=17)	Mann-Whitney U Test	
	$\bar{X}\pm S$	$\bar{X}\pm S$	z	p
GV apoptozis oranı	0,51±0,10	0,52±0,10	0,25	0,802
apoptozis_yesil + şüpheli apoptozis oranı	0,52±0,10	0,66±0,10	0,23	0,818

Tablo 4.11: 5. gün Hücre sayısına göre GV'lerde ortalama apoptozis oranı karşılaştırması.

	Hücre sayısı<10 (n=11)	Hücre sayısı>=10 (n=6)	Mann-Whitney U Test	
	$\bar{X}\pm S$	$\bar{X}\pm S$	z	p
apoptozis_yesil / toplam_hücre	0,49±0,08	0,58±0,10	1,71	0,087
apoptozis_yesil + şüpheli apoptozis oranı	0,66±0,10	0,66±0,10	0,35	0,725

Tablo 4.12: Fertilize olmayan matür GV'ler ile fertilize olan ve embriyo geliştiren gruplar arasında apoptozis oranları

	fertilize olmayan (n=13)	fertilize ve 5. gunde<10 hücre (n=11)	fertilize ve 5. gunde>10 hücre (n=6)	Mann-Whitney U Test	
	$\bar{X}\pm S$	$\bar{X}\pm S$	$\bar{X}\pm S$	z	p
apoptozis_yesil / toplam_hücre	0,51±0,10	0,49±0,08	0,58±0,10	2,56	0,278
apoptozis_yesil + şüpheli apoptozis oranı	0,65±0,096	0,66±0,10	0,66±0,10	0,11	0,948

Tablo 4.13: GV Apoptozis'inin gebe olan ve olmayan gruplarda karşılaştırılması

Gebelik	Negatif (n=15)	Pozitif (n=15)	Mann-Whitney Test	
			Z	p
GV apoptozis_orani	0,55±0,09	0,49±0,10	1,89	0,059
GV apoptozis+ şüpheli oranı	0,67±0,08	0,64±0,11	1,27	0,206

Tablo 4.14: GV apoptozis oranı ve GV apoptozis + GV şüpheli apoptozis oranı ile korelasyon analizi (Spearman's rho correlation).

		FSH_23	LH	E2	HCG günü_ e2	M2_fertilizasy on_oranı	GV_fertilizasy on_oranı	PN2_1.gün / IVM-GV sayısı
GV_apoptozis oranı	r	-0,20	0,12	0,04	0,09	-0,09	0,00	0,00
	p	0,278	0,536	0,828	0,648	0,637	0,986	0,986
	n	30	30	30	30	30	30	30
GV apoptozis + şüpheli oranı	r	0,01	-0,05	0,00	-0,29	-0,24	0,17	0,17
	p	0,951	0,778	0,984	0,126	0,200	0,368	0,368
	n	30	30	30	30	30	30	30

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda maturasyonunu tamamlayan immatür oositlerin %52'sinde maturasyon gerçekleştiği, ICSI sonrası %56 oranında fertilize olduğu, 2. günde %39,1 3-4 hücre aşamasında embriyo, 3. gün %43,4 5-8 blastomer aşamasında embriyo, 5. Gün ise morula gelişiminin %21,7 ve blastokist gelişiminin %6,5 oranında olduğu görülmüştür (Tablo 4.1, 4.2). Oosit in vitro maturasyonu genellikle stimüle edilmemiş sikluslarda PKO olgularında uygulanmaktadır. 2012 de Kyoto ART kliniğinde yapılan bir IVM uygulamasında 15 polikistik over hastalıklı olgunun oositlerinde maturasyon oranı % 44,2 olarak ve % 66.4 fertilizasyon elde edilmiştir. 2012 Kasım ve Ocak ayları arasında Kyono ART kliniğinde IVM üzerine bir çalışma yapılmıştır. 15 adet polikistik over sendromlu ,yaş aralığı genel olarak 31 -32, LH seviyeleri ortalama 5.3, FSH seviyeleri ortalama 5.4 ve E2 seviyeleri ortalama 36.1 olan hastalar üzerinde yapılan araştırmada ortalama beklenen folikül sayısı 57.9,ortalama alınan oosit sayısı 19.8(317/16), maturasyon oranı opu sonrası 26-28 saat sonra %44.2 (140/317), Fertilizasyon oranı %66.4 (93/140)olarak saptanmıştır (47).

Bu sonuç stimüle edilmiş ve edilmemiş IVF sikluslarında oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi konusunda benzerlik olduğunu göstermektedir. Oosit in vitro maturasyonu OHSS riski olan hastalara, OHSS hikayesi olan hastalara, gonadotoksik tedavi gören hastalara, veya fazla E2 nin zararlı olabileceği hormona duyarlı tümörü olan hastalarda uygulanabilmektedir (5).

IVM ilk olarak 1935 yılında Pincus ve Enzmann tarafından tavşan oositlerinde uygulanmıştır (48). 1965 yılında Edwards farelerde, koyunda, sığır oositlerinde ve insan oositlerinde denemiştir (49, 50). 1991 yılında ilk defa Cha donörden alınan IVM oositlerinden gebelik elde etmiştir (51). 1994 yılında Trounson PKO olan tedavi uygulanmamış bir hastadan IVM ile gebelik elde etmiştir (52). Virant-Klun ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada ise normal IVF sikluslarından elde edilen immatür oositlerin çoğu kalıtsal olarak anormal olarak saptanmıştır. Araştırmacı yaklaşık olarak 2766 gende aberrant anormal gen ekspresyonu gözlemiş ve ICSI işleminden sonra ise sınırlı gelişim gösterdiklerini ifade etmiştir (53). 2010 yılında Reichman D. E. ve ark. stimüle edilmiş siklulardan elde edilen immatür oositlerin in vitro matürasyon sonrası fertilizasyon potansiyellerini, embriyo gelişimini ve gebelik sonuçlarını incelemişlerdir. Aynı siklulardan elde edilen 263 immatür oosit ve 234 matür oosit üzerinde yapılan bir

çalışmadır. Fertilizasyon oranları incelendiğinde IVM mediumuna koyulan oositlerde %62.1, matür oositlerde %64 olarak gözlenmiştir. 2.gün embriyo değerlendirmesinde IVM grubunda ki embriyoların %28.3'ü, M2 grubunda ki embriyoların %54.3'ü dört hücreye ulaşabilmiştir. Fragmantasyon oranları incelendiğinde IVM grubundaki embriyolarda %65.2, M2 grubundaki embriyolarda ise % 30 olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak kümülüsleri soyulmuş ve 24 saat IVM etkisinde kalmış GV oositlerin kullanımı ve mitotik maturasyon bakımından durumunun soru işaretleri içermekte olduğu konusunda tartışmalar gelişmiştir (2).

2013 tarihinde Yalçinkaya E. ve ark. zayıf over cevabı veren bir hasta da in vitro maturasyon tekniği kullanılarak iptal olmaktan kurtulan bir vakayı sunmuşlardır. Bu vakanın sonucu olarak IVM'in sadece polikistik overli hastalar için değil , aynı zamanda zayıf over cevabı veren hastalar içinde iyi bir tedavi seçeneği olabileceği ileri sürülmüştür (4). Aynı yıl Bi Shin S. ve arkadaşları kontrollü ovaryan hipersitümüle edilmiş siklulardan elde edilmiş immatüre oositlerin fertilizasyon potansiyellerini değerlendirmek üzere 463 siklus içeren bir çalışma yapmışlardır. M1 den M2 ye dönen oositlerde fertilizasyon oranları %37, M2 oositerde ise %72.3 olarak gözlenmiştir. M1-M2 grubunda gelişen embriyolar sadece beş hastaya transfer edilmiştir. Bunlar arasında sadece bir adet gebelik gözlenmiş ve bu da biyokimyasal olarak sonuçlanmıştır (54).

In vitro maturasyon uygulamasında, doğal adet döngüsü takip edilir, 3-6 gün için FSH kullanılır ve 9-10.günlerde oosit toplanır.Oosit toplama işleminden önce 10000 IU hCG uygulanır. Yani tedavi FSH ve hCG nin kombinasyonundan oluşmaktadır (5). IVM mediumları oosit kümülüs hücre kompleksinin kültürü için yüksek metabolik gereksinimi karşılama amacı ile oluşturulmuştur. İki tip IVM mediumu vardır . 1.si yıkama , ikincisi inkübasyon öncesi mediumdur. > 28 saat 2. mediumda oositler inkübe edilir.(maturasyon medium genellikle FSH, HCG ve serum proteinleri ile desteklenir) FSH ve LH takviyesi yapılan Sage IVM mediumunda kısa sürede daha yüksek maturasyon oranı gözlenmiştir (Farsi M. M. ve ark.). Bu çalışmada stimüle edilmiş siklulardan elde edilen GV oositlerin IVM sonrası maturasyonları değerlendirilmiş ve mikroenjeksiyon uygulanmıştır.Toplamda 18-37 yaş arası 26 hasta ile çalışılmıştır.Standart uzun protokol uygulanmış, immatür olarak alınan oositler 24-30 saat arası IVM mediumunda bekletilmiştir.Ve IVM sonrası matür hale gelen oositlere mikroenjeksiyon işlemi uygulanmıştır. Maturasyon, fertilizasyon ve klivaj oranları kaydedilmiştir. Yaklaşık

olarak GV oositlerin %70 'i M2 olmuştur. Ancak fertilizasyon ve klivaj oranları matür oositlere oranla daha düşük olarak gözlenmiştir. IVM ile kültüre edilen embriyolardan sadece 3 vakaya transfer işlemi uygulanmış ve sadece bir hasta gebe kalmıştır. Bu çalışmada, GV oositlerin IVM'i sonucunda ikinci günde elde edilen 4 hücreli grade 1 embriyo ile gebelik elde edilebileceği gözlenmiştir (5) Bizim çalışmamızda ise IVM uygulanan tüm GV'lerde maturasyon %56,1, 2PN oluşumu %63,0 olarak bulunmuştur. Bu bulgu da literatürde elde edilen bulgularla yakınlık göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda genel olarak fertilizasyon oranı incelendiğinde GV oositlerde %60, M1 oositlerde ise %67.2 olarak gözlenmiştir. İkinci günden itibaren embriyoların fragmentasyon oranının arttığı gözlenmiştir. 2013'te Alvarez yapmış olduğu bir çalışmada M2 oositlerin fertilizasyon oranı %70.7, IVM mediumunda bekletilen M1 oositlerin fertilizasyon oranı ise %55.7 olarak görülmüştür (55). Aynı çalışmada M2 oositlerden elde edilen klinik gebelik oranı %33.1 IVM mediumunda bekletilen M1 oositler için ise %12.4 olarak gözlenmiştir. Düşük oranı ise IVM mediumunda bekletilen M1 oositleri içeren grupta yüksek oranda gözlenmiştir. Coticchio G. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir diğer çalışmada M2 oositler ve in vitro maturasyon uygulanan oositler arasındaki maturasyon, fertilizasyon, gebelik ve implantasyon oranları incelenmiş, gebelik ve implantasyon oranları IVM uygulanmayan M2 oositlerde daha yüksek oranda gözlenmiştir (3).

Sonuç olarak, IVM'in özellikle PKOS, OHSS riski olan, östrojene duyarlı tümörleri olan hastalarda uygulanabileceği, HCG, LH ve FSH takviyesinin maturasyon ve gebelik oranlarını arttırdığı gözlenmiştir. Kümüls oosit kompleksinin maturasyon üzerine etkisi bulunmakta olduğu, implantasyon ve gebelik oranlarının daha düşük olduğu kabul edilmiştir. Bununla birlikte IVM ile herhangi malformasyonu ya da gelişim bozukluğu gözlenmeyen yaklaşık 2500 çocuk doğmuştur (5).

Bu çalışmada M2 oositlere ait kümüls hücrelerinde apoptozis, stimüle edilmiş siklulardan elde edilen germinal vezikül aşamasındaki yumurtalara ait kümüls hücre apoptozisine göre daha düşük olduğu saptandı. Bu değer istatistiki anlamlılık göstermektedir ($p < 0.0001$, Tablo 1,2,4). Mikkelsen A. L. ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada immatür foliküllerdeki granülosa hücrelerinin apoptozis oranı incelenmiştir. Çalışmada normal ovaryum rezervi olan hastalar ile polikistik olan hastalar karşılaştırılmış, normal rezervi olan hastalar FSH rekombinant kullanan ve kullanmayan

olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Folikül aspirasyonundan sonra toplanmış olan granülosa hücreleri Apoptaq kiti kullanılarak apoptozis oranı incelenmiştir. Kontrol grubunda apoptozis oranı FSH kullanımında azalma göstermiştir. Kontrol grubundaki rFSH kullanmayan hastalar ile rFSH kullanan PKO grubundaki hastalarda apoptozis oranı benzer olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak stimüle olmayan immatür oositlerin apoptozis oranının arttığı gözlenmiştir. Dominant foliküllerindeki granülosa hücrelerindeki apoptozis oranı incelendiğinde ise apoptozis oranının daha düşük olduğu anlaşılmıştır. Mikkelsen ve arkadaşlarının raporuna göre kontrollü ovaryan stimülasyonlarındaki M2 ve immatür oositlerin apoptozis oranı incelendiğinde immatür oositlerin granülosa hücrelerindeki apoptozis oranı yüksek çıkmıştır. Bu sonuç bizim bulgularımızı doğrulamaktadır (56).

Host ve arkadaşlarının 2002 de yaptıkları çalışmaya göre kümülüs hücrelerin apoptozisi, zona pellusidanın kalınlığının değişiklikleri ile oositin maturasyon ve fertilizasyonu üzerine etkisi arasındaki bağlantı araştırılmıştır. Retrospektif olan bu çalışmada özel bir klinikte 50 hasta üzerinde yapılan çalışmada kümülüs hücrelerinin apoptozisi, zona pellusida kalınlığı ve oositin fertilizasyon, maturasyon ve embriyo kalitesi incelenmiştir. Embriyo kalitesi ve zona pellusida kalınlığı ile kümülüs hücreleri apoptozisi arasında hiç bir bağlantı gözlenmemiştir. M2 oositlere oranla GV oositlerde ve boş zona pellusidalı olgularda apoptozis oranı yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca fertilize olan M2 oositler ile fertilize olmayan M2 oositlerdeki apoptozis oranı incelendiğinde fertilize olmayan M2 oositlerde apoptozis oranı daha yüksek bulunmuştur (57).

Zona pellusida kalınlığına bakıldığında ise embriyo kalitesi ile arasında bir ilişki olduğu, fakat apoptozis, zona kalitesi ve embriyo kalitesi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca immatür ve matür oositlerin kümülüs hücrelerindeki apoptozis oranı bakıldığında immatür oositlerde anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (57).

Bizim çalışmamızda kümülüs hücrelerinin apoptozis düzeyi GV oositlerde (0.52 ± 0.10) M2 oositlere (0.33 ± 0.15) kıyasla daha yüksek bulundu (Tablo 4.6). Ancak maturasyonunu tamamlayan ve ICSI yapılan GV oositlerin embriyo geliştiren veya geliştirmeyen gruplarında apoptozis düzeyinde istatistiki anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Bu sonuç maturasyona konan GV oositlerin gelecekteki davranışlarını öngörmede apoptozis düzeyinin yeterli olmadığını göstermektedir (Tablo 4.7, 4.8, 4.9) Çalışmamızda

immatur oositlerin maturasyon gösteren oositler ve maturasyon göstermeyen oositlerin kümülüs apoptozisi arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. (Tablo 4.6, 4.7). Bu nedenle sadece apoptozis parametresi IVM oositlerde gelişimi öngörmeye yetersiz kalmakta olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamızda gebe olan veya olmayan olgularda GV, kümülüs apoptozisini araştırdık ve gebe olmayan grupta apoptozis düzeyinin yüksek olduğunu, istatistiki anlamlılık sınırına yakın olduğunu saptadık (Tablo 4.13). Bu durum olgu sayısının sınırlı olması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

İndüklenmiş sikluslarda GV maturasyonu üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Sifer C. ve arkadaşları 22 kanser hastası üzerine IVM ile ilgili bir çalışma yapmıştır. Siklulardan elde edilen GV oositler cryotop ile vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş, dondurma sonrası çözme işlemi uygulanmış ve 24 saat kültür mediumuna bırakılmıştır. Aynı zamanda kontrol grubu olan sağlıklı hastalardan alınan M2 oositler dondurulup çözülerek kültür mediumuna bırakılmıştır. Canlılık oranı IVM grubunda %88, stimüle edilmiş hasta (KOH) grubunda %86.3, kontrol grubunda %88.1 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak canlılık oranları benzer olmasına rağmen IVM mediumundaki GV oositlerin mayoza gidişi, MRR oranları, KOH grubunda kontrol grubundaki oositlere göre belirgin olarak çok düşük çıkmıştır (%16.5 ve %56.8; $p < 0.018$), (58). Bizim çalışmamızda GV oositlerin mayotik gelişimi 98 GV oositte 51 adet olarak %52 olarak bulundu (Tablo 4.1).

Çalışmamızda oosit maturasyonu ile embriyo gelişiminin 3. gün bazal LH değeri ve HCG günü ölçülen E2 değeri arasında korelasyon bulundu (Tablo 4.5). LH ovaryum steroidogenezinde önemli bir rol üstlenmektedir. Normal ovulasyon LH yükselmesi ile ortaya çıkmaktadır. LH'nın folikülogenezdeki rolü üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Teka hücrelerinin LH reseptör ekspresyonu yaptığı, androjen sentezinin gerçekleştiği, androjenlerin de aromatisasyon ile östradiol sentezini sağladığı bilinmektedir (62). Bilindiği gibi germinal vezikül dağılımı (GVBD), LH uyarısı ile başlamaktadır. Metafaz I sonrasında anafaz 1 ve telofaz 1 gerçekleşerek sekonder oosit ve 1. polar cisim gelişir. İnterfaz evresine girilmeden 2. mayoz bölünme başlar. İkinci mayoz bölünmenin metafaz-II evresinde ikinci bir duraksama olur ve ovulasyon bu esnada gerçekleşir. Spermatozoon penetrasyonu ile 2. mayoz bölünme tamamlanır. Sonuçta oluşan iki hücreden biri sitoplazma yönünden zengin olup gerçek oositir. Diğeri ise sitoplazmanın az bir kısmını alan ancak yine de mitokondri, ribozom ve kortikal granüllere sahip olan,

2. polar cisim adıyla bilinen hücredir. Ovulasyon olaylarının eşzamanlı ve uyumlu bir biçimde gerçekleşmesi gerekmektedir. Olgunlaşmayı düzenleyici faktör (MPF) bu noktada önemli bir rol oynamaktadır (59).

Oosit gelişiminin çeşitli aşamalarında oosit morfolojisinde, fizyolojisinde ve onu çevreleyen kümülüs hücrelerinde çeşitli değişiklikler olmaktadır. Granüloza hücrelerinin ve özellikle kümülüs hücrelerinin fonksiyonu, oosit matürasyonu ile oldukça yakından ilgilidir. Granüloza hücreleri için iki ana fonksiyon tanımlanmaktadır. Birinci fonksiyon, ovulasyon başlangıcında ve sonrasında oositin bütünlüğünün korunmasına yardım edilmesi ve beslenmesidir. İkinci fonksiyon ise ovulasyon sonrasında folikül gelişirken özellikle teka lutein hücrelerinin östrojen etkisi altında başlıca progesteron olmak üzere steroid hormon üretmesidir.

LH yükselmesi, siklus'un ortasında ovaryan foliküllerde ovulasyon için bir seri kritik değişiklik başlatır. Normal ovulasyon, steroidogenez, kümülüs hücre büyümesi ve oosit matürasyonu gibi birçok kritik değişiklikte rol oynar. LH stimülasyonu, ovulasyon indüksiyonuyla mayozun tekrar başlamasına neden olur, mRNA ve proteinlerin ekspresyonuna eşlik eder, oositi çevreleyen kümülüs hücrelerindeki salgılayıcı özellikler değişir. Luteinizan hormonun (LH) stimüle edilmiş sikluslarda GV maturasyonu üzerindeki etkisi Cha K-Y ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada stimüle edilmiş sikluslardan elde edilen GV oositler ile stimüle edilmemiş sikluslardan elde edilen GV oositlerin IVM uygulamasında stimüle edilmiş sikluslarda germinal vezikül yıkımının daha önce olduğu gösterilmiştir. Bu etki LH'nun kümülüs kompleksini uyararak GVBD işlemini gerçekleştirmesi şeklinde yorumlanmıştır (60). Bizim çalışmamızda da oosit maturasyonu ve embriyo gelişiminin 3. Gün LH değeri ile pozitif korelasyon gösterdiğini bulduk (Tablo 4.4). Bu sonuç da LH'nin muhtemel etkilerini doğrulamaktadır.

Goud ve arkadaşları in vitro maturasyon mediumu içindeki gonadotropinler, östradiol, epidermal büyüme faktörü etkileri ve ayrıca kümülüs hücrelerinin çıkarılmasının sitoplazmik ve nükleer maturasyon üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Hastaları iki gruba ayırmışlardır. 1.Grup, kümülüs hücreleri uzaklaştırılan immatür oositleri içerir. Bu oositlerin bir kısmı, gonadotropin, östradiol ve EGF içeren mediuma bir kısmı ise sadece östradiol ve gonadotropin içeren kültür mediumunda bekletilmiştir. 2.Grup, kümülüs hücreleri uzaklaştırılmayan immatür oositlerden oluşmaktadır ve aynı

şekide EGF içeren ve içermeyen mediuma bırakılmışlardır. 1.Grup oositlerde EGF olan ve olmayan oositlerin fertilizasyon oranları benzerdir. İkinci grup oositlerde EGF içeren mediumdaki oositlerin fertilizasyon oranları içermeyen mediumdaki oositlere göre yüksek oranda gözlenmiştir. (71.7 vs 45.6%, $p<0.05$).Genel olarak bakıldığında birinci grup oositlerin (kümülsü alınan) fertilizasyon oranları ikinci gruba(kümülsü hücreleri uzaklaştırılmayan) göre daha düşük gözlenmiştir. Sonuç olarak maturasyon mediumunda EGF bulunması ve aynı zamanda kümülüs hücrelerinin bulunması maturasyon oranlarını iyileştirdiği gözlenmiştir (61).

Magli ve ark. yapmış oldukları çalışmada, stimüle edilmiş sıklulardan elde edilen GV oositlerinin in vitro maturasyonu sonrası kutup cisimciği biopsisi sonucu yapılan kromozom analiz sonuçları yaklaşık olarak % 62 oranında anomali taşıdığını göstermişlerdir (62). Yaptığımız çalışmada IVM oositlerinin % 43,4 civarında embriyo , % 6,5 civarında ise blastokist geliştirdiğini bulduk .Reichman D. E. ve arkadaşları stimüle edilmiş sıklulardan elde edilen GV oositlerin maturasyon sonrası % 62 fertilizasyon ve % 28.3 embriyo geliştirdiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar bu sonuçların tedavi sıklulalarında GV maturasyonunun gerekli olup olmadığının sorgulanması gerektiğini ileri sürmüşlerdir (2).

İn vitro oosit maturasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar henüz optimal bir kültür mediumunun da oluşturulmadığını göstermiştir. Oosit maturasyonunu düzenleyen faktörler arasında LH, MPF, Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK), Oosit çapı ($>115\mu\text{m}$), FSH, LH, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Mayoz Active Sterol (FF-MAS), Büyüme Hormonu (GH), İnsülin, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I (IGF-I), Prolaktin bulunmaktadır (62).

İn vitro maturasyon parametresini açıklayabilmek için ,bu nedenle oldukça fazla parametre üzerinde yoğunlaşma gereği bulunmaktadır.Ayrıca kullandığımız in vitro maturasyon mediumunda bu faktörlerden sadece insülin olduğu görülmektedir. Epidermal Büyüme Faktörü, ile ilgili IVM çalışmalarında daha iyi embriyo gelişimi konusundaki 2010 yılında Ben-Ami I. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada kültür mediumunda bulunan Epidermal Büyüme Faktörünün GV oositlerin gelişimleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Epidermal Büyüme Faktörü üyelerinden olan Areg (amphiregulin) ve Ereg'in (epiregulin) maturasyon üzerine olan etkileri araştırılmıştır. 105 GV oosit Areg ve Ereg içeren medium içinde 24 saat bekletilmiş ve maturasyonları

incelenmiştir. Sonuç olarak Areg ve Ereg içermeyen mediyuma göre fertilizasyon oranı %75.5'e ulaştığı, kontrol grubunda ise %36.5'de kaldığı görülmüştür ($p < 0.001$). Granüloza hücrelerindeki LH aktivasyonu Areg ve Ereg iletişimini uyararak KOK üzerindeki EGF reseptörlerini uyardığı ve böylece oosit maturasyonu ve kümülüs kompleksinin genişlemesi tetiklenmiş olduğu ileri sürülmektedir (63).

İrez T. ve ark. yapmış olduğu çalışmada, stimüle edilmiş IVF sikluslarında, özellikle PKO olgularında çok sayıda GV oosit elde edilmiş, AMH düzeyinin çok yüksek olduğu durumlarda gelişen embriyoların yüksek fragmantasyon gösterdiği ve çoğunlukla da transfer edilebilecek kalitede iyi embriyo elde edilmediği gösterilmiştir (64). Ayrıca zayıf yanıt veren olgularda matür oosit elde edilmediği durumlarda in vitro maturasyon bir seçenek olarak görülmekte, çok düşük düzeyde de olsa blastokist gelişiminin bulunması, bu metodun denemesinde yarar olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak;

- Çalışmamızda maturasyonunu tamamlayan immatür oositlerin %52'sinde maturasyon gerçekleştiği,
- ICSI sonrası %56 oranında fertilize olduğu,
- 2. günde %39,1 3-4 hücre aşamasında embriyo, 3. gün %43,4 5-8 blastomer aşamasında embriyo, 5. gün ise morula gelişiminin %21,7 ve blastokist gelişiminin %6,5 oranında olduğu görülmüştür.
- Bizim çalışmamızda kümülüs hücrelerinin apoptozis düzeyi GV oositlerde M2 oositlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur.
- Ancak maturasyonunu tamamlayan ve ICSI yapılan GV oositlerin embriyo geliştiren veya geliştirmeyen gruplarında apoptozis düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Bu sonuç maturasyona konan GV oositlerin gelecekteki davranışlarını öngörmede apoptozis düzeyinin yeterli olmadığını göstermektedir.
- Çalışmamızda immatür oositlerin maturasyon gösteren oositler ve maturasyon göstermeyen oositlerin kümülüs apoptozisi arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

- Bu nedenle sadece apoptozis parametresi IVM oositlerde gelişimi öngörmeye yetersiz kalmakta olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamızda gebe olan veya olmayan olgularda GV, kümülüs apoptozisini araştırdık ve gebe olmayan grupta apoptozis düzeyinin yüksek olduğunu, istatistiki anlamlılık sınırına yakın olduğunu saptadık. Bu durum olgu sayısının sınırlı olması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.
- Oosit maturasyonu ve embriyo gelişiminin 3. gün LH değeri ile ve HCG günü E2 değeri ile arasında pozitif ilişki bulunduğu görülmüştür. ($P=0.021$, $p=0.020$).
- Ancak bazal hormon değerlerinin gebeliği öngörmediği anlaşılmıştır. Bazal LH değerlerinin GV oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi ile ilişkisi görülmüştür ($p=0.021$).
- HCG günü E2 değerinin, maturasyonu tamamlayıp embriyo geliştiren GV oosit grubunda yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0.020$).
- Çalışmamızda stimüle edilmiş IVF sikluslarından elde edilen immatür oositlerin kullanılabilirliği düşük düzeyde de olsa kanıtlanmıştır. İmmatür oositlerin embriyo geliştirme potansiyeli ise apoptozis parametresi ile açıklanamayacağı anlaşılmıştır.

6. ETİK KURUL KARARI

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

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.Barhanenin Üstünel Sok. No:4/3 Üsküdar 34668			
	TELEFON	0216 391 06 80			
	FAKS	0216 343 92 51			
	E-POSTA	www.etikkurulsekretaryasi@zeynepkamil.gov.tr			
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Sünte edilmiş aklılardan elde edilen in vitro (İ.V.) Oositler de In Vitro Matürasyon (IVM) sonrası matür hale gelen ve polipeptid Oositleri Kurulus laboratuvarındaki apoptotik farklılığın değerlendirilmesi"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	ARAŞTIRMA BAŞVURU TARİH/PROTOKOL NO	02.11.2013/116			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. TULAY İREZ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Klinik Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Yeni Yaşyl Üniversitesi			
	DESTEKLEYİCİ				
	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"/>			
İlaç dış 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"/>	
Karar No: 116		Tarih: 06.12.2013			

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

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" 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	<input type="checkbox"/>					
	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:116	Tarih: 06.12.2013					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

**ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

CALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
Araştırmanın Açık Adı:	"Stimüle edilmiş sikluslardan elde edilen immatür (G.V) Oositler de In Vitro Maturasyon (IVM) sonrası matür hale gelen ve gelmeyen Oositlerin Kumulus hücrelerindeki apoptotik farklılığın değerlendirilmesi"

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Başkan Doç.Dr. Murat MUHCU	Kad. Hast. ve Doğum Uzmanı	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"/>	M. Muhcu
Doç.Dr. Murat APİ	Kad. Hast. ve Doğum Uzmanı	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"/>	M. Apı
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"/>	A. Celayir
Prof. Dr. Arif Aktuğ ERTEKİN	Kad. Hast. ve Doğ.	Üsküdar Üniversitesi	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"/>	A. Ertekin
Prof. Dr. Mustafa BAŞBUĞ	Perinatoloji	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 type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	M. Başbuğ
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"/>	G. Karatekin
Uzm. Dr. Handan ÇETİNER	Patoloji	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"/>	H. Çetiner
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"/>	Y. Doğan Merih
Uzm.Dr. Aytekin KAYMAKÇI	Çocuk Cerrahisi	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"/>	A. Kaymakçı
Doç. Dr. Hülya CABADAK	Biyofizik	Marmara 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"/>	H. Cabadak
Doç. Dr. Fulya İlçin GÖNENÇ	Hukuk	Marmara 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"/>	F. Gönenc
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"/>	G. Can
Yard. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ	Farmakoloji	Marmara Üniversitesi	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"/>	A. Özer Şehirli
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 type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	A. Arıkan
Huriye ÖLGE	Emekli	Emekli	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"/>	H. Ölgü

* :Toplantıda Bulunma

7. KAYNAKLAR

- 1) Speroff L, Glass N. H, Kase R. G., (1999). Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility, 6th edition, Philadelphia USA, Lippinott Williams and Wilkins, pp. 84, 171, 213, 236, 1013, 1075, 1097, 1133.
- 2) Reichman D. E., Politch J., Elizabeth S. G., Racowsky C., (2010 July). Extended in vitro maturation of immature oocytes from stimulated cycles: an analysis of fertilization potential, embryo development, and reproductive outcomes. *J Assist Reprod Genet.*; 27(7): 347–356.
- 3) Coticchio G, Dal-Canto M, Guglielmo M. C., Mignini-Renzini M. ve Fadini R., (2012). Human Oocyte Maturation In Vitro. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 909-918
- 4) Yalçinkaya E., Çalışkan E., Budak Ö. In vitro maturation may prevent the cancellation of in vitro fertilization cycles in poor responder patients 2013 by the Turkish-German Gynecological Education and Research Foundation. Erişim 24.04.2015, www.jtgga.org
- 5) Farshi M. M., Gholam S., Jorsarai G. A., Esmaelzadeh S, Golalipour M. J., (Summer 2011) In vitro Maturation of Germinal Vesicle Oocytes in Stimulated Intracytoplasmic Sperm Injection. *Cell Journal* ,Vol 13, No 2, Pages:73-78
- 6) A. L. Mikkelsen, E. Host and S. Lindenberg, (2001 Sep). Incidence of apoptozis in granulosa cells from immature human follicles. *PubMed - indexed for Medline, Reproduction.* 122(3): 481-6
- 7) Filho P. A. H., Riberio M. A., Rocha A. M., Allegreti J. P., Serafini P. C., Motta E. L. A., (September 2008), Effect of GnRh down-regulation on cumulus cell viability and apoptozis as measured by fluorescence-activated cell sorting, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Volume 25, Issue 9-10, pp 467-471
- 8) Gülekli B., Çağlan E., Okyay R. E., (2013). In vitro maturation of oocytes- *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics*, 6(1):85-90 Erişim 24.04.2015, <http://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-in-vitro-oosit-maturasyonu-64521.html>
- 9) Motta P.M., Makebe S. ve Notta S.A., (1997) The ultrastructure of human reproduction.1. the natural history of the female germ cell: Origin, migration and

differentiation inside the developing ovary. Human Reproduction Update, Vol. 3, No. 3 pp. 281–295.

- 10) Sadler T.W., (2005). Langman Medikal Embriyoloji. Dokuzuncu Baskıdan Çeviri. Ankara, Palme Yayıncılık; Bölüm1, 156-158.
- 11) Carlson B. M., (2009). Human Embryology And Developmental Biology. Fourth Edition. Ankara, Palme Yayıncılık; Bölüm 1, 6-15
- 12) Schoenwolf C., Bleyl B., Brauer R., et al. (2009). Larsen's Human Embryology. Fourth Edition. Ankara, Palme Yayıncılık; Bölüm 1, 20-27
- 13) Anwar A, Moussa M. D. (Jan. 2002). In vitro maturation of oocytes. Obygn Net Advertisement, Erişim 26.04.2015, <http://www.obgyn.net/infertility/vitro-maturation-oocytes>
- 14) Picton H. M., Haris S. E., Muruvi W. et al. (2008). The in vitro growth and maturation of follicles. Reproduction. 136 703–715.
- 15) Knight P. G. ve Glister C., (2006). TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction. 132 191–206.
- 16) Fortune J. E., (2003). The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Animal Reproduction Science 78. 135–163
- 17) Webb R., Garnsworthy P. C., Gong J. G. et al. (2004) Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. J. Anim. Sci. 82: E63-74.
- 18) Abramovich S. S., Edry I., Galiani D. et al. (2006). Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. Endocrinology. 147: 2280–2286.
- 19) Ross M. H., Pawlina W., (2006). Histology, A Text And Atlas. Philadelphia USA, Lippinott Williams and Wilkins, 5th Ed, Bölüm 3, 830-831
- 20) Akyol N., (2007). İn vitro sığır embriyosu üretimi. Embriyo Transferi (Bülten), Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg., 47 (1), 1-8
- 21) Kierszenbaum A. L., (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş, Ankara, Palme Yayıncılık, pp. 565-575.
- 22) Gordon I. (1994). Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab international Co., Wallingford: UK, 2nd Edition, pp. 132-135

- 23) Kanagawa H., Shimohira I., Saitoh N., (1995). Manual of Bovine Embryo Transfer, National Livestock Breeding Centre Press JLTA, Shirakawa, Japan, pp 169-243.
- 24) Takashi M., (1998). In vitro growth and development of bovine oocytes. Symposium on molecular bioengineering of food animals, Tokyo, Japan, Theriogenology, 37: 869 - 875
- 25) Hagemann L. J., (1999). Influence of the dominant follicle on the oocytes from subordinate follicles. Theriogenology, 51: 449-459.
- 26) Cıncık M., Sezen Ş., Özsoy M., H., Küçük T., Korkmaz C., (2001). Effects of cumulus oophorus cells on in vitro oocyte maturation. T. Klin. Tıp Bilimleri 21:161-165
- 27) Gardner D. K., Vella P., Lane M., Wagley L., Schlenker T., Schoolcraft W. B., (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. Fertil Steril, 69: 84–88.
- 28) Altunkaynak Z. B., Ozbek E., (2008). Programlanmış hücre ölümü; Apoptozis nedir? Tıp. Araş. Derg., 6 (2): 93-104.
- 29) Oktem S., Ozhan H. M., Ozol D., (2001). Apoptozisin önemi. Toraks Dergisi, 2 (1): 91-95
- 30) Solakoğlu Z., (2009). Apoptozis varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. Klinik Gelişim, 22(3): 20-25.
- 31) Ulukaya E., (2003). Apoptozis Ders Notları, Erişim 26.04.2015, <http://biyokimya.uludag.edu.tr>
- 32) Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R., (2004). Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. Biol Reprod, 71 (1): 28-37.
- 33) Sakkas D., Bizzaro D., Manicardi C.G., (2007). Chromatin Damage and Male Infertility. Humana press, Totowa New Jersey, 304-306.
- 34) Weng L.S., Taylor L.S., Morshedi M., Schuffner A., Duran H.E., Beebe S., Oehninger S., (2002). Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. Mol Hum Reprod, 8 (10): 984-991.
- 35) Koçyiğit A., Çevik M., (2011). Memeli Reprodüktif Dokuları, Gamet Hücreleri ve Embriolarında Apoptozis. Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg. 8(1) 33-41, Erişim 26.04.2015, <http://ercivet.erciyes.edu.tr/arsiv/2011-1/1-memelireproduktif.pdf>

- 36) Güneş V. H., (2006). Moleküler Hücre Biyolojisi, Eskişehir, Kaan Kitabevi, 60-65.
- 37) Lossi L., Merighi A., (2003). In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian. *Cns. Prog Neurobiol*, 69:287-312.
- 38) Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2002) *Molecular Biology of The Cell*. NewYork, Garland Science Taylor &. Francis Group, 4th Edition, Bölüm 17, 325-330.
- 39) Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A.G., Gabaib V.L., (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death. *Experimental Cell Research*, 283:1-16.
- 40) Derici E., (2007). Rho kinaz ve Siklooksijenaz İnhibitörleri ile Siklofosamid Kombinasyonlarının Çeşitli Tümör Hücre Serilerine Etkileri, Doktora Tezi Mersin, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- 41) Keane R. W., Kraydieh S., Lotocki G., Bethea J. R., Krajewski S., Reed J. C., Dietrich W. D., (2001). Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Nueropathol Exp Neurol*, 60:422-429.
- 42) Lou J., Lenke L. G., Ludwig F. J., O'Brien M. F., (1998). Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 36:683-690.
- 43) Rao R. V., Hermel E., Obregon S. C., Rio G., Ellerby L. M., Ellerby H. M., Bredesen D. E., (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.*, 276:869-874
- 44) Antar V., (2005). Bir genel kaspaz inhibitörü olan Qvd-Oph'nin nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği.
- 45) Jin W. P., Quan X. Q., Meng F. P., Cui X. D., Piao H. J., (2007). Relationship among hepatocyte apoptosis, P450 2E1 and oxidative stress in alcoholic liver disease of rats, 19(7):419-421.
- 46) Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A., (1992). Identification of programmed cell death in situ via spesific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119:493-501.

- 47) Kyono K., Nakajo Y., Hattori H., Kyoya T., Ikeno T., Takeuchi T., (2013). Kyono ART Clinic Sendai, Miyagi. Examination of in vitro maturation of immature oocytes, p 716.
- 48) Pincus G., Enzmann E. V., (1935). The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J Exp Med*, 62(5): 665-675
- 49) Edwards R. G., (1965). Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208: 349-351
- 50) Edwards R. G., (1965): Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet*, II: 926-929
- 51) 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 non-stimulated cycles, *Fertil Steril*, 55: 109-113
- 52) Trounson A., Wood C., Kausche A. (1994). In vitro maturation and fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polystic ovarion patients, *Fertil Steril*, 62(2): 353-362.
- 53) Virant-Klun I., Knez K., Tomaz T., ve Thomas S., (2013). Gene expression profiling of human oocytes developed and matured in vivo or in vitro, *BioMed Research International*, Article ID 879489, 20 pages
- 54) Bi Shin S., Cho J. W., Lee S. H., Yang K. M., Lim C. K., Lee H. S., (2013). Fertilization and pregnancy potential of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles, *Clin Exp Reprod Med.*, 40(1):7-11
- 55) Alvarez et al (2013). Fertilization and development potential in oocytes mature at the time of denuding and M2 oocytes matured in vitro after ICSI, *Indian J Med Res*, 137: 331-338.
- 56) Mikkelsen A. L., Host E., Linderberg S., (2001). Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles, *Reproduction*, 122(3): 481-6.
- 57) Host E., Gabrielsen A., Lindenberg S., Smidt-Jensen S., (2002). Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 77(3):511-515

- 58) Sifer C., Sellem O., Sermondade N., Sonigo C., Hugues J-N., Benoit A., Poncelet C., Grynberg M., (2014). Prospective study comparing survival and meiotic resumption rates of immature oocytes from in vitro maturation and stimulated cycles in cancer patients, *Fertility and Sterility*, 102 (3) Suppl, 165.
- 59) Lévy D. P., Navarro J. M., Schattman G. L., Davis O. K., Rosenwaks Z., (2000). The Role of LH in ovarian stimulation: Exogenous LH, *Hum Reprod.*, Nov; 15(11): 2258-65.
- 60) Cha K-Y., Chain R-C., (1998). Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical usage, *Hum Reprod Update.*, Mar-Apr; 4(2): 103-20
- 61) Goud P. T., Goud A. P., Qian C., Laverge H., Van der Eist J., De Sutter P., Dhont M., (1998). In vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium, *Hum Reprod.*, Jun; 13(6): 1638-44.
- 62) Magli M. C., Ferraretti A. P., Crippa A., Lappi M., Feliciani E., Gianaroli L., (2006). First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles. *Fertil Steril*, Sep; 86(3): 629-35.
- 63) Ben-Ami I., Komsky A., Bern O., Kasterstein E., Komarovsky D., Ron-E R., (2011). In vitro maturation of human germinal vesicle-stage oocytes: role of epidermal growth factor-like growth factors in the culture medium, *Hum Reprod.*, 26(1):76-81
- 64) Irez T., Ocal P., Guralp O., Cetin M., Aydogan B., Sahmay S., (2011). Different serum anti-Mullerian hormone concentrations are associated with oocyte quality, embryo development parameters and IVF-ICSI outcomes. *Arch Gynecol Obstet*, Nov 12;284(5):1295-301.