

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ZAYIF OVERYAN YANITLI VE POLİKİSTİK OVER
SENDROMLU HASTALARIN KUMULUS HÜCRELERİNDEKİ
APOPTOTİK GEN EKSPRESYONUyla EMBRİYO GELİŞİMİ
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. MUTLU YAKA**

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ NAZLI ÇİL**

DENİZLİ – 2021

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ZAYIF OVERYAN YANITLI VE POLİKİSTİK OVER
SENDROMLU HASTALARIN KUMULUS HÜCRELERİNDEKİ
APOPTOTİK GEN EKSPRESYONUyla EMBRİYO GELİŞİMİ
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. MUTLU YAKA**

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ NAZLI ÇİL**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 21.04.2020 tarih ve
2020TIPF008 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ – 2021

TEŞEKKÜR

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, değerli danışman hocam, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL'e;

Histoloji ve Embriyoloji alanında yetişmemde katkıda bulunan, uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye ve değerli hocalarım Prof. Dr. Hülya ÇETİN, Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR, Doç. Dr. Nazan KESKİN, Dr. Öğr. Üyesi Serkant ÜNAL'a;

Embriyoloji Laboratuvar stajım ve tez sürecim boyunca desteğini esirgemeyen kıymetli hocalarım Prof. Dr. İbrahim Veysel FENKÇİ, Dr. Öğr. Üyesi Cihan KABUKÇU, Dr. Öğr. Üyesi Ümit ÇABUŞ ve tüm Pamukkale Üniversitesi Tıp Bebek Merkezi ekibine;

Asistanlığım boyunca beraber olduğumuz tüm asistan arkadaşlarım ve anabilim dalı çalışanlarımıza, Tez deneylerimde bana yardımcı olan Araş. Gör. Dr. Mücahit SEÇME'ye;

Tüm hayatım boyunca yanımda olan ve beni bugünlere getiren sevgili annem Meral YAKA, kıymetli babam Süleyman YAKA ve biricik ablam Selin YAKA'ya;

Bu uzun süreç boyunca her zaman yanımda olan, her zorluğu birlikte atlattığımız, gücüme güç katan canım eşim Saniye KÜÇÜKAKIN YAKA'ya;

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	X
ÖZET.....	XI
SUMMARY.....	XIII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
KADIN GENİTAL SİSTEM	3
Kadın Genital Sistem Embriyolojisi.....	3
Kadın Genital Sistem Histolojisi.....	5
İNFERİLİTE	9
Zayıf Overyan Yanıt (ZOY)	10
Polikistik Over Sendromu (PKOS).....	11
Açıklanamayan İnfertilite	12
APOPTOZİS	12
GEREÇ VE YÖNTEM	14
OVERYAN STİMULASYON	15
OOSİT TOPLAMA (OPU)	15
OOSİTLERİN SOYULMASI (DENÜDASYON)	15
SPERM HAZIRLAMA TEKNİĞİ (GRADİYENT YÖNTEMİ)	16
İNTRA SİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU (ICSI)	17

EMBRIYO KÜLTÜRÜ VE TAKİBİ	17
TRANSFER GÜNÜ SEÇİMİ VE EMBRIYO TRANSFERİ.....	19
TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU	20
cDNA SENTEZİ.....	20
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)	21
İSTATİSLİKSEL ANALİZ.....	22
BULGULAR	24
TARTIŞMA.....	33
SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH: Antimüllerian Hormon

ASRM: American Society for Reproductive Medicine

A.O: Aritmetik ortalama

Ca²⁺: Kalsiyum

CAS-3: Kaspaz-3

cDNA: Komplementanter Deoksinükleik Asit

CO₂:Karbondioksit

ÇAA: Çeyrek arası aralık

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embriology

FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon

GnRH: Gonadotropin Salgıtıcı Hormon

GV: Germinal Vezikül

hCH: Human Koryonik Hormon

IVF: İn-Vitro Fertilizasyon

IU: International Unite

KOK: Kumulus Oosit Kompleksi

LH: Luteinize Edici Hormon

MI: Metafaz I

MII: Metafaz II

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

ml: Mililitre

O₂:Oksijen

OPU: Oosit toplama

PVP: Polivinipirolidon

PKOS: Polikistik Over Sendromu

Rpm: Dakikadaki devir sayısı

RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon

S.S: Standart sapma

USG: Ultrasonografi

VKİ: Vücut Kitle İndeksi
ZOY: Zayıf Overyan Yanıt
°C: Santigrad derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Hyase sonrası oositlerin inverted mikroskopta değerlendirilmesi.....	16
Şekil 2. 3. Gün embriyoların değerlendirilmesi.	18
Şekil 3. İyi kalitede olarak değerlendirilen 5. gün embriyoları.....	19
Şekil 4. Grupların kumulus hücrelerindeki Apoptoz ilişkili rölatif gen ekspresyonlarının karşılaştırılması.	28
Şekil 5. Matür ve immatür oositlerin kumulus hücrelerindeki apoptoz ilişkili rölatif gen ekspresyonlarının karşılaştırılması.	30
Şekil 6. Gebelik sonucu pozitif ve negatif olan hastaların kumulus hücrelerindeki Apoptoz ilişkili rölatif gen ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	31

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. cDNA sentez karışımı.....	21
Tablo 2. RT-PCR bileşimi	21
Tablo 3. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri	22
Tablo 4. RT-PCR protokolü	22
Tablo 5. Çalışmaya dahil edilen hastaların genel özellikleri.....	24
Tablo 6. Hasta gruplarının transfer durumlarının ve gebelik sonuçlarının dağılımı..	25
Tablo 7. Hasta gruplarının demografik özelliklerinin karşılaştırılması	26
Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen grupların gen ekspresyonlarının karşılaştırılması ..	29
Tablo 9. Matür ve immatür oositlerin gen ekspresyonlarının karşılaştırılması	30
Tablo 10. Gebelik sonucu pozitif ve negatif olan hastaların gen ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	32

ÖZET

Zayıf overyan yanıt ve polikistik over sendromlu hastaların kumulus hücrelerindeki apoptotik gen ekspresyonuyla embriyo gelişimi arasındaki ilişki

Dr. Mutlu YAKA

Granüloza hücrelerinin ve kumulus hücrelerinin primer oositin olgun oosite dönüşümü sırasında ona en yakın olan ve onunla metabolik olarak çift yönlü iletişimde bulunan hücreler oldukları bilinmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda apoptotik genlerle oosit kumulus hücreleri ve bu oositlerden gelişen embriyolar arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Bizim bu çalışmada amacımız 4 gruba ayırdığımız (kontrol, açıklanamayan infertilite hastaları, polikistik over sendromlu hastalar, düşük overyan yanıtlı hastalar) hasta gruplarından elde ettiğimiz kumulus hücrelerindeki apoptotik aktiviteyi embriyo gelişimi ile karşılaştırmak ve bu hastaların gebelik oranlarıyla apoptotik gen ifadeleri arasındaki ilişkiyi anlamaktır.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 04/02/2020 tarih ve 03 sayılı onay alınarak çalışmaya başlandı. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezine 01.03.2020 – 01.07.2020 tarihleri arasında başvuran 50 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalar kontrol (n:9 hasta, oosit:90); Açıklanamayan İnfertilite (n:8 hasta, oosit:86); Polikistik over sendromu (PKOS) (n:6 hasta, oosit:138); Zayıf Overyan Yanıt (ZOY) (n:27 hasta, oosit:124) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. 437 kumulus hücresi ayrılan oositlerden olgun olan 365 oosite intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yapılarak embriyo takibi yapıldı. Kumulus hücrelerinin Bax, kaspaz-3, Bcl-2 gen ifadeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle ölçüldü. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kötü kalitede gelişen embriyoların kumulus hücrelerindeki Bax ile Bcl-2 ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ($r = -0,233$) korelasyon saptanmıştır. Açıklanamayan infertilite grubunda, Bax gen ifadesinin yükselmesinin toplanan oositlerin immatür olması üzerine istatistiksel olarak anlamlı şekilde riski artırıcı etkisi olduğu görülmüştür (O.R:1.197). Bir diğer önemli nokta ZOY grubunda, kaspaz-3 ifadesinin artmasının gebelik gelişmesini olumsuz etkilediği saptanmıştır. Fakat kumulus hücreleri incelenen 365 oositin fertilizasyon, iyi kalitede embriyo geliştirme durumları apoptotik gen ifadeleriyle ilişkili bulunmamıştır. Matür oositlerde

Bax ile Bcl-2 gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönlü ($r=-0,150$) ilişki saptanmıştır. Bax/Bcl-2 oranı matür oositlerde anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuştur (sırasıyla $2,67\pm 18,10$, $13,80\pm 52,77$, $p=0,020$).

Kumulus hücrelerindeki kaspaz-3 ifadesinin ZOY hastalarda gebelik pozitifliğini düşürmesinin dışında apoptotik gen ifadesiyle fertilizasyon ve iyi kalitede embriyo geliştirme durumlarına etkisi saptanamamıştır. Fakat Bax ifadesinin ve Bax/Bcl-2 oranının immatür oosit kumuluslarında yüksek olması apoptotik sürecin kumulus-oosit bağlantısı varken başladığını bize göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Oosit, Kumulus hücreleri, Bax, Kaspaz-3, Bcl-2

SUMMARY

Association Between Embryo Development and Apoptotic Gene Expression of the Cumulus Cells in Patients with Poor Ovarian Response and Polycystic Ovary Syndrome

Dr. Mutlu YAKA

Granulosa and cumulus cells can be described as the cells closest to the primary oocyte during its differentiation into the mature oocyte. They are in bidirectional interaction with the oocyte metabolically. The relationship between apoptotic genes with oocyte cumulus cells and the embryos developing from these oocytes has been evaluated in various studies. We aimed to compare the apoptotic activity in the cumulus cells obtained from the patients undergoing in vitro fertilization treatment in four different groups (patients with unexplained infertility, polycystic ovarian syndrome, low ovarian response, and control). We investigated the relationship between pregnancy rates, embryo development, and apoptotic gene expression in these patients.

The approval was granted by the Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee of Pamukkale University Faculty of Medicine (dated 04/02/2020 and numbered 03). The study population consisted of 50 patients admitted to Pamukkale University Medical Faculty Hospital IVF Center between March 01, 2020, and July 01, 2020. The study cohorts were divided into four as Controls (n: 9 patients, oocytes: 90), unexplained Infertility (n: 8 patients, oocytes: 86), Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) (n: 6 patients, oocytes: 138), and Poor Ovarian Response (POR) (n: 27 patients, oocytes: 124).

Cumulus cells were isolated from 437 oocytes obtained after the oocyte pick-up procedure. Intracytoplasmic sperm injection was performed on 365 mature oocytes. Subsequently, the embryos were followed. Bax, caspase-3, Bcl-2 gene expressions of the cumulus cells were measured by the real-time polymerase chain reaction method. The resulting data were assessed statistically. In all analyzes, statistical significance was set at $p < 0.05$.

Developing poor-quality embryos were significantly and negatively correlated with Bax and Bcl-2 expressions ($r = -0.233$). In the unexplained infertility group, increased Bax gene expression was observed to exert a noticeable effect on the collected oocytes'

immaturity (O.R: 1.197). Another striking result was that overexpression of caspase-3 in the POR group adversely affected the development of pregnancy. However, fertilization and the status of good quality embryo development of 365 oocytes whose cumulus cells were investigated were not associated with apoptotic gene expressions. A significant negative correlation ($r = -0.150$) was noted between Bax and Bcl-2 gene expressions in mature oocytes. Bax / Bcl-2 ratio was found to be significantly lower in mature oocytes (2.67 ± 18.10 , 13.80 ± 52.77 , respectively, $p = 0.020$).

Apart from the fact that caspase-3 expression in the cumulus cells decreased pregnancy positivity in POR patients, we did not establish the effect of apoptotic gene expression and fertilization on good quality embryo development. However, increased Bax expression and Bax/Bcl-2 ratio in immature oocyte cumulus suggest that the apoptotic process was initiated once a cumulus-oocyte connection was established.

Keywords: Oocyte, Cumulus cells, Bax, Caspase-3, Bcl-2

GİRİŞ

On iki ay boyunca düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması infertilite olarak tanımlanmaktadır. Evli çiftlerin yaklaşık olarak %15'i infertiliden etkilenmiştir (2). Bu sorunun çözümü üremeye yardımcı teknikler için çalışmalar ilk olarak 1890 yılında Cambridge Üniversitesi profesörü Walter Heape ile başlamıştır. İlk in vitro fertilizasyon (IVF) ile doğum İngiltere Oldham'da 25 Temmuz 1978'de Patrick Steptoe ve Rabert Edwards'ın çalışmaları sonucu gerçekleşmiştir (2). Üremeye yardımcı tekniklere ilgi o günlerden beri artarak devam etmekte ve bugünde gelişimini sürdürmektedir.

Zayıf overyan yanıt (ZOY) denildiğinde reproduktif çağda olan düzenli adet gören ancak over stimülasyonuna cevap verme açısından yaşlılarından geride kalan hastalar tariflenmektedir. Bu durum ilk defa 1983 yılında Garcia ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (3). Yıllar boyu üzerine yüzlerce çalışma yapıldıktan sonra 2010 yılında European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) tarafından organize edilen konsensusla ortak bir tanımda ve kriterlerde uzlaşmıştır.

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağdaki kadınların %5-10'ununu etkileyen ve en sık görülen endokrinopatilerden biridir. Etiyolojisi halen tam olarak bilinmemektedir. Üreme endokrinolojisi açısından bakıldığında klinik bulguları menstüral düzensizliklerden ciddi üreme disfonksiyonlarına kadar geniş bir spektrumda olabilir. 2003 yılında Rotterdam'da yapılan toplantıda tanı kriterlerine yönelik ortak görüş birliğine varıldı. Bu toplantı ESHRE ve American Society for Reproductive Medicine (ASRM) tarafından desteklendi. 2008 yılında Selanik'te yapılan bir çalışmada polikistik over sendromlu infertil kadının tedavisi konu edilmiştir. Çalışmada PKOS yönetiminde hayat tarzı değişiklikleri, farmakolojik ajanlarla ovulasyon indüksiyonu, insülin sensitize eden ajanlar, cerrahi ve yardımcı üreme tekniklerine kadar geniş bir yelpazede yer alan birçok tedavi seçeneğine dair konsensus kararları alınmıştır. (4)

İnfertil çiftlere yapılan muayeneler ve testler sonucunda infertiliteyi açıklayacak bir neden bulunamadığı durumda tanı açıklanamayan infertilite olarak konulur. Bu durum infertil çiftlerin yaklaşık olarak %15'ini etkilemektedir (1).

Granüloza hücrelerinin ve bu hücrelerden dönüşen kumulus hücrelerinin primer oositin olgun oosite dönüşümü sırasında ona en yakın olan ve onunla metabolik olarak

çift yönlü iletişimde bulunan hücreler oldukları bilinmektedir. Bu çift yönlü iletişim oosit ve folikül büyümesi, olgunlaşması ve ovulasyon süreçlerini düzenler. PKOS hastalarında, kumulus hücrelerinin daha yüksek mitokondriyal ROS üretimi ve daha düşük antioksidan kapasiteye sahip oldukları, daha düşük GSH / GSSG, NADH / NAD⁺ ve NADPH / NADP⁺ oranlarına sahip oldukları ve oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. Bu hastalarda kumulus hücrelerinde daha yüksek GPX3 gen ifadesinin blastosist oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (5).

Apoptoz, fizyolojik stimülasyon tarafından tetiklenen birçok proteinin ve kontrol mekanizmasının yer aldığı ve hücre ölümü ile sonuçlanan bir süreçtir (6). Bu süreçte önemli roller oynayan kaspaz-3, kaspaz-8, Bcl-2, Bax proteinlerinin granüloza hücrelerinde de ifade edildiği önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (7). Antral aşama çoğu folikülün apoptoza girdiği aşamadır. Granüloza hücrelerinin, atretik foliküllerde apoptozisin ilk başladığı hücre popülasyonu olduğu gösterilmişken, sağlıklı foliküllerde apoptotik granüloza hücreleri gösterilememiştir (8). Bazı çalışmalarda Bcl-2 ailesinin iki üyesi olan Bax ve Bcl-2 genlerinin ifade miktarları embriyo kalitesinin tahmini için ana kriterlerden biri olarak gösterilmiştir. Bu çalışmaların ışığında, granüloza hücrelerinin metabolizması ve apoptoz oranındaki herhangi bir değişikliğin oositin kalitesini ve bu oositten oluşan embriyoyu olumsuz etkileyerek gebelik şansını azaltabileceği düşünülmektedir (9).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda tubal faktör, açıklanamayan infertilite hastalarında folikül sıvısında ya da kumulus hücrelerinde apoptozis gelişimine bakılmıştır. (10-16) Yapılan başka bir çalışmada apoptotik gen ifadesiyle kumulus hücrelerinin ait olduğu embriyo morfokinetiği değerlendirilmiştir (17).

Bizim bu çalışmada amacımız 4 gruba ayırdığımız (kontrol, açıklanamayan infertilite hastaları, polikistik ovaryan sendromlu hastalar, düşük ovaryan yanıtlı hastalar,) hastalardan elde ettiğimiz kumulus hücreleriyle apoptotik aktiviteyi embriyo gelişimi ile karşılaştırmak ve gebelik oranlarıyla apoptotik gen ifadesi arasındaki ilişkiyi anlamaktır.

GENEL BİLGİLER

KADIN GENİTAL SİSTEMİ

Kadın Genital Sistem Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti ovumu dölleyen spermin çeşidi (X veya Y) ile belli olsa da erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri embriyonik 7. haftaya kadar gelişime başlamazlar. Erken dönemde genital sistem her iki cinsten de birbirine benzer ve bu dönem seksüel gelişimin farklanmamış aşaması olarak adlandırılır.

Gonadlar posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitel), altındaki mezenkimal doku (embriyonik bağ doku), primordiyal germ hücreleri (en erken dönemdeki farklanmamış seks hücreleri) olmak üzere 3 kaynaktan köken alır.

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada mezonefrozun medialinde mezotelyal bir kalınlaşmanın gelişimiyle başlar. Bu epitelin ve altındaki mezenkimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık oluşur, buna gonadal kabarıntı adı verilir. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar altındaki mezenkim içerisine doğru kısa sürede büyürler ve farklanmamış gonadda dışta korteks içte ise medulla oluşur. Eğer embriyo XX seks kromozomlarına sahipse korteks tabakası overe diferansiye olur ve medulla geriler.

Primordiyal germ hücreleri fertilizasyondan 24 gün sonra umbilikal kese duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanmaları sırasında umbilikal kesenin dorsal parçası embriyo içerisine dâhil olurken, primordiyal germ hücreleri de arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabarıntılara göç eder. 6. haftada primordiyal germ hücreleri mezenkim içerisine girerek gonadal kordonlara dâhil olurlar. Primordiyal germ hücrelerinin göçü stella, fragillis genleri ve BMP-4 proteinince düzenlenmektedir (18).

Ovaryum Gelişimi

Ovaryumların gelişiminde XX kromozomları ile birlikte otozomal bir genin de rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Histolojik olarak 10. haftaya kadar ayırt edilemezler. Gonadal kordonlar belirsizdir ve medulla içine sokulup rudimenter bir yapı olan rete ovariiyi oluştururlar. Rete ovarii ve gonadal kordonlar dejenere olarak kaybolurlar.

Dişi gonadda yüzey epiteli çoğalmaya devam ederek sekonder kordonlar olan kortikal kordonları oluştururlar. Kortikal kordonlar altaki mezenkim içerisine doğru ilerler. Mezenkim içerisinde ilerleyen kordonların boyutları arttığında primordiyal germ hücreleri içerisine girer. 16. hafta civarında primordiyal germ hücrelerini içeren kordonlar izole hücre kümelerine parçalanarak primordiyal follikülleri oluştururlar. Bu foliküller primordiyal germ hücresinden köken alan oogonium ve onun etrafında, yüzey epiteli kökenli tek sıralı yassılaştırmış foliküler hücreleri içerir. Fetal dönemde oogoniumların mitozuyla beraber binlerce primordiyal folikül meydana gelirken; bunlardan birçoğu doğumdan önce dejenere olmaktadır. Postnatal dönemde oogoniumların mitozu kesinlikle devam etmez ve yeni primordiyal folikül oluşmaz.

Doğum sonrası overin yüzey epiteli düzleşir; tek tabakalı hale gelen hücreler over hilumunda periton mezoteli ile devamlılık kazanırlar. Yüzey epiteli ile korteks folikülleri arasında tunika albuginea adı verilen, ince bir fibröz kapsül vardır. Overler mezonefrozun gerilemesiyle ondan ayrılır ve mezenteri olan mezovariuma bağlanırlar (18).

Genital Kanalların Gelişimi

Gelişimin ilk 5-6 haftası genital sistemin farklılaşmamış safhasıdır; mezonefrik (Wolffian), paramezonefrik (Müllerian) isimlerinde iki çift genital kanal bulunmaktadır. Mezonefrik kanal erkek üreme sisteminin gelişiminde rol oynarken paramezonefrik kanal dişi üreme sisteminin gelişiminde rol oynamaktadır.

Paramezonefrik kanallar gonadların ve mezonefrik kanalların lateralinde gelişirler ve mezonefrozların lateral yüzeylerindeki mezotelin oluşturduğu longitudinal invajinasyonların kenarlarının birbirleriyle kaynaşmasıyla oluşurlar. Bu kanalların kranial uçları periton boşluğuna açılırlar, kaudalde mezonefrik kanallara paralel olarak embriyonun gelecekteki pelvik bölgesine ulaşmaya kadar uzanırlar. Pelvik bölgede mezonefrik kanalları ventralde çaprazlarlar ve orta planda birbirleriyle birleşerek kaynaşırlar ve Y şekilli uterovajinal primordiyumu oluştururlar. Ürogenital sinüsün dorsal duvarı içinde uzanan bu yapı duvar üzerinde bir yükselti olan sinüs tüberkülünü oluşturur (18).

Paramezonefrik kanalın birleşmeyen kranial tarafından tuba uterinalar gelişirken; birleşerek uterovajinal primordiyumu oluşturan kaudal kısmından uterusun tamamı ve vajinanın kranial kısmı gelişir.

Kadın Genital Sistem Histolojisi

Kadın üreme sistemi vücut içinde, pelviste iki ovaryum, iki tuba uterina, uterus, vajina ve dışta perineumun vulva adı verilen anterior bölgesinde ise mons pubis, labium majuslar ve minuslar, klitoris, vestibul, vajina açıklığı, hymen ve dış üretra ağzından oluşur. İlk menstürasyon kanamasından (menarş) başlamak üreme sistemi nöronal aktivite ve hormon seviyelerine bağlı olarak yapısal ve sistemsel siklik değişiklikler geçirir. Bu siklik değişiklikler menopoz dönemine kadar devam eder ve bu dönemde seyrekleşerek durur (19).

Ovaryum

Ovaryumların en önemli fonksiyonu oogenez ve steroidogenezdır. Steroidogenez sonucu üretilen östrojenler iç ve dış genital organların büyümesini ve olgunlaşmasını desteklerler ve pubertede dişi cinsiyet karakteristiklerinin gelişimini sağlarlar. Progesteronlar ise internal genital organları özellikle de uterusun endometriumunu salgılama değişiklikleriyle gebelik için hazırlarlar.

Ovaryumlar eliptik şekilli 3*1,5*1 cm boyutlarında pembemsi renkli yapılardır. Ovaryumlar mezovaryum ile peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin posterioruna bağlıdır. Tubal taraftaki kutbu ise suspensor ligament tarafından pelvis duvarına bağlanır.

Ovaryum korteks ve medulladan oluşmaktadır. Merkezi bölümdeki medulla gevşek bağ doku, büyük kıvrımlı kan damarları, lenf damarları ve sinirler içerir. Periferdeki kortekste zengin selüler bağ dokusu içinde oaryum folikülleri bulunmaktadır.

Ovaryum tek katlı kübik ve bazı bölgelerde yassılaştan germinal epitel olarak adlandırılan epitel ile döşelidir. Korteks ile germinal epitel arasında tunika albuginea adında sıkı bağ dokusu bulunmaktadır.

Doğumda mevcut olan oositler birinci mayotik bölünmesinde arreste uğraşmış olarak dururlar. Puberte başlangıcıyla foliküller küçük gruplar halinde siklik büyümeye ve matürasyona başlarlar. Menstrual siklusla paralel olarak foliküler matürasyon ve ovulasyondan meydana gelen siklik bir döngü devam eder. Her menstrual siklusta sadece bir oositin tam olgunlaşması ve ovulasyonu beklenir. Bu da bir kadının reprodüktif yaşamı boyunca yaklaşık 400 matür ovum üretebileceğini gösterir. Doğumda tahmini 600000-800000 kadar olan primer oositin çoğu

olgunlaşmasını tamamlayamadan atreziye uğrayıp rezorbsiyon mekanizması ile ortadan kaldırırlar. Bu sürece oositi çevreleyen hücrelerin apoptozu eşlik eder. Yaşam boyu devam eden bu atrezi primer oosit sayısını logaritmik olarak azaltır (19).

Folikül Gelişimi

Ovaryum folikülleri primordiyal, büyümekte olan ve olgun (Graaf) folikül olmak üzere 3 farklı histolojik evreye ayırmak mümkündür. Siklus sırasında ovaryumda her üç gelişim evresinden de foliküller bulunabilir ancak primordiyal foliküller her zaman için baskındır.

Primordiyal foliküllerde ovaryumu tek bir sıra yassı folikül hücreleri çevreler ve gelişiminin erken evresi gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır. Oosit yaklaşık olarak 30 µm çapındadır ve folikül hücreleri ile oldukça yakındır. Oositin bir ya da daha fazla sayıda nükleolus içeren büyük eksantrik bir nükleusu vardır.

Primordiyal folikülün gelişmekte olan foliküle dönüşümüyle oosit büyür ve çevresindeki foliküler hücreler çoğalarak kübik şekil alırlar. Gelişmekte olan folikülün bu ilk evresine primer folikül denir. Bu evrede oositin salgıladığı bazı proteinlerin bir araya gelmesiyle foliküler hücreler ile oosit arasında zona pellusida adı verilen özel bir ekstraselüler örtü oluşur. Bu sırada folikül hücreleri hızla proliferasyon olarak stratum granulosum adı verilen çok katlı bir epitel oluştururlar ve folikül hücreleri artık granuloza hücreleri olarak adlandırılırlar.

Aynı zamanda granuloza hücrelerinin bazal laminasının etrafındaki stromal hücreler bazal membranın hemen dışında teka folikülü olarak isimlendirilen bir bağ doku hücre kılıfı oluştururlar. Bu hücre kılıfı daha içte bulunan yüksek düzeyde vaskülarize kübik salgı hücrelerinden oluşmuş teka interna ve en dışta düz kas hücreleri ve kollajen demetleri içeren teka eksterna olarak iki tabakaya ayrılır. Teka interna hücreleri sahip olduğu luteinize edici hormon (LH) reseptörleriyle LH stimülasyonunda androjen prekürsörleri sentezleyip salgırlar.

Folikülde bu değişiklikler olurken oositte Golgi elementi sitoplazmaya dağılır. Serbest ribozomların, mitokondrilerin, küçük veziküllerin sayısı ve granüllü endoplazmik retikulumun miktarı artar. Oolemmanın hemen altında kortikal granül adı verilen salgı vezikülleri oluşur.

Zona pellusida oluşumu sırasında oosit ile granuloza hücreleri arasındaki perivitellin aralığa birçok mikrovillus uzanır. Bu mikrovillusların içine granuloza

hücreleri ince uzantılarla invajine olurlar. Bu uzantıların bazıları oolemmaya temas edebilir.

Granüloza hücreleri 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında hücreleri arasında oluşan kavitelere hyaluronandan zengin sıvı birikimleri olur. Likör folikül adı verilen bu kavitelere birleşerek antrum adı verilen hilal biçimli tek kavite oluşur. Gelişmekte olan folikül artık antral (sekonder) folikül evresindedir. Bu aşamada oosit yaklaşık 125 µm çapındadır ve büyümesi antral sıvıdaki oosit matürasyon inhibitörü tarafından inhibe edilmektedir.

Sekonder folikül evresinde folikül hızla büyür ve büyüdükçe antrum genişler. Stratum granulosumun oosit ile ilişkili olduğu bölgede granüloza hücreleri kumulus ooforus adı verilen ve antruma doğru çıkıntı yapan bir tümsek oluştururlar.

Olgun (Graaf) folikülün çapı yaklaşık olarak 10 mm civarında ovaryum korteks kalınlığını boyunca uzanarak ovaryum yüzeyinde çıkıntı oluşturur. Folikül boyutu ile beraber antrum boyutunun da artması stratum granulosum tabakasını inceltir. Oosit ve kumulus hücrelerinin geri kalan granüloza hücreleri arasındaki bağlantı gevşer.

Bu aşamada teka tabakaları belirginleşir. Teka internada bulunan hücreler steroid üreten hücrelerle aynı ultrastrüktürel özellikleri gösterirler. Bu hücrelerde üretilen östrojen prekürörleri, granüloza hücrelerindeki granülsüz endoplazmik retikuluma taşınırlar. Folikül stimüle edici hormona (FSH) yanıt olarak granüloza hücreleri granülsüz endoplazmik retikuluma östrojen prekürörlerini östrojene çevirirler. Ovulasyondan 24 saat önce adenohipofizde LH salınımı ani bir şekilde artar. Bu artıştan 12-24 saat sonra primer oositin mayotik bölünmesi tamamlanır ve sekonder oosit ve birinci kutup cisimciği oluşur (19).

Ovulasyon

Foliküler sıvı hacminin ve basıncının artması, folikül duvarının aktive plazminojen tarafından enzimatik proteolizisi, teka eksternadaki düz kas liflerinin prostaglandinler tarafından tetiklenerek kasılması ile sekonder oosit germinal epitel de dahil olmak üzere bütün foliküler duvarı geçer. Bu sırada ovaryum yüzeyine yaklaşmış olan tuba uterina fimbriaları kumulus oosit kompleksini tuba uterinanın abdominal ostiumuna doğru süpürür (19). Sonuç olarak LH piki ile oosit mayozunun yeniden başlaması, kumulus genişlemesi, folikül rüptürü ve kumulus oosit kompleksinin atılımı gerçekleşir (20).

Korpus Luteum

Ovulasyon sonrası kollabe olarak derin katlantılar yapmış granüloza ve teka hücrelerinden oluşan yapıya korpus luteum adı verilir. Folikül lümenine doğru olan kanama merkezde pıhtı içeren korpus hemorajikum oluşumuna neden olur. Hücrelerde luteinizasyon gerçekleşir ve hem granüloza hücreleri hem de teka hücreleri steroid salgılayan hücrelerin özelliklerini gösterirler.

Korpus luteum zengin damar ağına sahiptir. Bol miktarda progesteron ve östrojen salgılayarak endometriumu implante olabilecek embriyoya hazırlar.

İnsan koryonik gonadotropini (hCG) yokluğunda progesteronun ve östrojenlerin salgılanma hızı azalır ve korpus luteum ovulasyondan 10-12 gün sonra dejenere olmaya başlar (19).

Fertilizasyon

Epididimiste matüre olan spermilerin zona pellusidaya bağlanma afinitesinin artması için plazma membranında bazı biyokimyasal değişiklikler ve modifikasyonlar olur. Bu aktivasyon sürecine kapasitasyon adı verilir. Bu süreçte adenilat siklaz aktivitesi artarak cAMP düzeyleri artar, tirozin fosforilasyonu artar, Ca^{+2} kanalları aktive olur ve intraselüler Ca^{+2} düzeyi artar, seminal sıvı glikokonjugatları serbestleştirilir, kolesterolün plazma membranından uzaklaştırılması ile fosfolipidler ve karbonhidrat parçaları yeniden dağılır.

Ejakulattaki spermatozoonlardan sadece birkaç milyonu fertilizasyon bölgesi olan tuba uterinanın ampulla kısmına ulaşabilir. Bu kısımda spermier korona radiataya penetre olurlar ve zona pellusidadaki zona pellusida glikoprotein 3 reseptörüne bağlanmaya çalışırlar. Spermin bu reseptöre bağlanması ile akrozom reaksiyonu oluşur. Bu reaksiyonla spermin akrozom bölgesinden salınan enzimler bir spermin zona pellusidayı penetre etmesini sağlar. Perivitellin aralığa giren spermin plazma membranı ile oolemma kaynaşır.

Penetre olan spermatozoon moleküler bir sinyal yolu ile 2. mayotik bölünmenin devamını ve sonlanmasını sağlar. Bununla beraber mayoz bölünme tamamlanır ve ikinci kutup cisimciği perivitellin aralığa atılır. 23 paternal kromozom içeren erkek pronükleusu ile 23 maternal kromozom içeren kadın pronükleusu hizalanmasından sonra pronükleusların nükleer membranları ayrışır ve diploid 46 kromozomlu zigot meydana gelir (19).

Tuba Uterinalar

Fallop tüpü olarak da adlandırılan tuba uterinaller uterusun ovaryumlara doğru uzanan bir çift tüptür. Ovaryuma komşu infundibulum, fertilizasyonun gerçekleştiği ampulla, uterusu komşu istmus ve uterus duvarı içindeki intramural parçalardan oluşur. Oluşan zigotun morula evresine kadar gelişmesi için gerekli ortamı sağlar. Oluşan morulayı uterusu ulaştırır.

Diğer içi boşluklu organlar gibi duvarı üç tabakadan oluşmaktadır. En dışta mezotelyumdan ve ince bağ dokusu tabakasından seroza bulunmaktadır. Ortadaki muskularis tabakası dışta longitudinal ve görece kalın bir sirküler kısımdan oluşur. En içte ise silyumlu ve silyumsuz prizmatik epitel hücrelerinden oluşan ve lümenine uzunlamasına katlantılar sergiyen mukoza tabakası vardır (19).

Uterus

İnsanda uterus yassı lümenli armut şeklinde bir organdır. Üstte büyük olan kısmı gövdeyi oluştururken altta silindirik şeklindeki kısım serviks olarak adlandırılır.

Uterus duvarı endometrium, miyometrium ve perimetrium olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalardan endometrium ve miyometrium embriyonun implantasyonunu kolaylaştırmak için östrojen ve progesteron etkisinde her ay siklik değişikliklere uğrayarak menstrual siklusu oluşturur. Menstrual siklus sırasında endometrium her ay önce proliferer olur ve sonra dejenere olur (19).

İNFERİLİTE

İnfertilite, 12 ay boyunca düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalar dünya nüfusunun %15'inin infertiliteden etkilendiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalara göre infertilitenin %25'inden kadın yumurtalama bozuklukları, %20'sinden tubal hasar, %10'undan uterus ve periton kaynaklı anatomik bozuklukların, %30'undan erkeğe bağlı nedenlerden kaynaklı olduğu görülürken, %15'inde ise infertilite nedeni açıklanamamıştır (21).

İnfertilite değerlendirilmesinde genel tıbbi yaklaşımdan farklı olarak mutlaka kadın ve erkek partnerler beraber değerlendirilmelidir. İlk basamakta öykü alma ve

fizik muayene çok önemlidir. Bu basamakta sorunun nereden kaynaklandığı anlaşılabilir. Öykü kısmında çiftin infertilite öyküsü sorgulanmalı varsa daha önceden yapılan infertilite tedavileri irdelenmelidir. Bunun yanında çiftin dahili hastalıkları özellikle endokrin, psikiyatrik ve kronik hastalıkları öğrenilmelidir. Bugüne kadar geçirdikleri özellikle genital bölge ve bütün batın içi cerrahi müdahaleler sorgulanmalıdır. Kadın hastanın varsa daha önceki gebeliklerinin ve sonuçlarının öğrenilmesi, gebeliğin oluşmasına engel bir durum olup olmadığı ve gebelik oluştuğundan sonra yaşanabilecek olumsuz sonuçların öngörülmesi ve engellenmesi açısından önemlidir. Yine kadın hastanın menstrüal hikayesi de infertiliteye neden olabilecek bazı hastalıklar ile ilgili bilgi verebileceği için mutlaka sorgulanmalıdır (1).

Hikaye aşamasından sonra kadın hastaya detaylı fizik muayene yapılmalıdır. Hastanın mutlaka vücut kitle indeksi (VKİ) hesaplanmalıdır. VKİ'nin çok düşük ya da çok yüksek olması doğrudan infertilite ile ilişkili olabilir. Yine sistemik muayenedeki bazı bulgular infertilite nedeni ile ilgili ipucu verebilir. Örneğin erkek tipi kıllanma varlığı PKOS'a işaret edebilir. Sistemik muayeneden sonra ayrıntılı pelvik muayene yapılmalıdır. Öykü ve fizik muayene sonrasında kadın genital sisteminde infertiliteye sebep olabilecek nedenlerin ortaya çıkarılması için tanısal değerlendirme yapılmalıdır. Bu değerlendirmede overler, over rezervleri, tuba uterinalar, uterin kavite ve serviks çeşitli testlerle incelenmelidir (1).

Erkek hasta değerlendirilmesi için ürolojiye yönlendirilir ve burada erkek faktör sebeplerin varlığı açısından taranır. Değerlendirmeye öykü ve fizik muayene ile başlanır. Hastalarda mutlaka semen analizi yapılmalıdır ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından belirlenen kriterlere göre değerlendirilmelidir. (22).

İnfertilite çiftler için oldukça zor ve yıpratıcı bir durumdur. Her iki partnerin de temel infertilite değerlendirmesi ile başlayan süreç çiftler için çok stresli olabilir. Hekimler her aşamada hastaya uygun danışmanlık hizmeti ile birlikte gerekirse duygusal destek de dahil olmak üzere hastanın ihtiyaçlarının karşılanmasında yardımcı olmalıdır (1).

Zayıf Overyan Yanıt (ZOY)

ZOY hastalar, ya yumurtalık rezerv testi ile gözlemlenen azalmış yumurtalık rezervi ya da önceki sikluslarda yetersiz yumurtalık yanıtı olan hastalar olarak

tanımlanır (23). ZOY tanısı standartlaşma için Bologna kriterleri getirilmiştir. Bu kriterlere göre aşağıdaki maddelerden iki tanesini sağlayan hasta ZOY olarak kabul edilecektir.

- İleri kadın yaşı (≥ 40) veya ZOY için bir risk faktörü)
- Önceki bir ZOY (konvansiyonel stimülasyon protokolü ile ≤ 3 oosit)
- Herhangi anormal ovaryan rezerv test (ör: AFC < 5-7 ve ya AMH < 0.5-1.1 ng/ml)

Zayıf yumurtalık cevabının açıklanması için, granüloza hücrelerinde mevcut FSH reseptörlerinin sayısının azalması, FSH reseptörü bağlandıktan sonra kusurlu sinyal iletimi, foliküler sıvıda özel bir FSH reseptörü bağlanma inhibitörünün varlığı da dahil olmak üzere birçok başka teori önerilmiştir. Gonadotropinlerin dağılımı, granüloza hücrelerine karşı oto antikorların varlığı ve dolaşımdaki gonadotropin dalgalanmaları gibi azaltıcı faktörlerinde bu hastalarda rol oynayan mekanizmalar olabileceği öne sürülmüştür (24).

Polikistik Over Sendromu (PKOS)

PKOS, yumurtalıklarda yaygın kistlerin varlığı, oligo-anovülasyon, hiperandrojenizm, hiperinsülinizm ve insülin direncinin eşlik ettiği üreme çağındaki kadınlar arasında yaygın bir endokrin bozukluktur. PKOS tanısında stardizasyon için Rotterdam kriterleri getirilmiştir. Bunlar:

- Oligo-ovulasyon ve / veya anovulasyon
- Klinik ve / veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
- USG bulguları (Ovede 2-9 mm 12 veya daha fazla follikül ve / veya 10ml'nin üzerinde over volümü)

PKOS patofizyolojisinde anormal folikülojenez veya steroidogenez ile ilişkili bozulmuş yumurtalık fonksiyonu ve ayrıca dominant foliküldeki gelişimsel bozukluklar ve obezite de rol oynayabilir. PKOS ile indüklenen anormal foliküler mikroçevre oositin sitoplazmik ve / veya nükleer olgunlaşmasını önleyebilir ve oosit gen ifadelerini değiştirebilir. PKOS hastalarında granüloza hücreleri ve kumulus hücrelerinin gen ifade paternleri embriyo seçimi için dolaylı bir belirteç olarak kullanılabilir; oosit ve embriyo gelişiminin altında yatan kompleks moleküler mekanizmaları açıklığa kavuşturabilir (25).

PKOS, üreme çağındaki tüm kadınların % 5-10'unu ve subfertil kadınların %50'sini etkileyen bir yumurtalık bozukluğudur. Bu heterojen endokrin disfonksiyon, lokal parakrin / otokrin sinyalin ve bağışıklık dengesini bozarak intrafoliküler ortamı değiştirir. Bu nedenle, PKOS'lu kadınlar, endokrin stimülasyona özellikle duyarlıdır. Gerçekten de, PKOS'lu kadınlardan alınan foliküler sıvı, VEGF, TNF ve IL-4 ve -7'nin artmış seviyesi ve EGF, FGF, NGF, PGE2, MMP, PA, GDF9 / BMP15, IL6 dahil olmak üzere birçok sitokin ve büyüme faktörünün sentezinin değiştiği çalışmalarda gösterilmiştir (26).

Açıklanamayan İnfertilite

İnfertiliteyi açıklayacak bir neden bulunamadığı çiftlerde tanı açıklanamayan infertilite olarak konulur. Bu durum infertil çiftlerin yaklaşık olarak %15'ini etkilemektedir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda folikül gelişiminde ve luteal fazda minör defektler, bazı servikal faktörler, sperm ve yumurta transport veya etkileşim sorunları, bozulmuş endometriyal reseptivitenin açıklanamayan infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir (27-29). Ancak hala bu hastalar için geçerliliği kabul edilmiş herhangi bir biyokimyasal belirteç veya muayene bulgusu yoktur.

APOPTOZİS

Apoptoz hücrenin ölümü ile sonuçlanan fizyolojik bir olaydır. Organizmanın görevini tamamlamış, ihtiyaç duymadığı veya hasarlanmış hücrelerinin ortadan kaldırılmasını sağlar. Genetik olarak sıkı şekilde kontrol edilir (30). Organizmadaki bazı doku ve organlarda apoptozun ömür boyu ve sürekli devam etmesi sayesinde ölüm ile yapım arasındaki dinamik denge korunmuş olur. Bu denge apoptoz lehine bozulacak olursa, nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıklar artarken, lehine arttığı durumlarda kanser ve bazı otoimmün hastalıklar ortaya çıkabilir (31).

Apoptoz sinyali ile birlikte hücre kromatini ve sitoplazma yoğunlaşmaya başlar; hücre boyutu küçülür. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik adı verilen küçük parçalara bölünür. Bu parçalar plazma membranı ile kaplı olduklarından immün sistemi enflamasyon yönünden uyarımazlar (30,32).

Apoptoz hücre içi ve ya dışı kaynaklı sinyaller ile başlayıp birbirini takip eden olaylar zinciridir. Bu sinyaller ile hücre de kaspaz adı verilen sistein proteazları

grubundan enzimlerin aktifleşmesi ve bu enzimlerin hedeflerini parçalayıp hücrede morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olarak apoptotik cisimciklerin oluşması ve bunların fagositozu ile sonuçlanır (30,32).

Hücre dışı sinyaller hücre zarında bulunan Fas, tümör nekrozis faktör reseptörü 1 gibi reseptörlere uyarıcı sitokin ya da moleküllerin bağlanmasıyla aktive olan yolaklarla kaspaz-8'in aktive olmasına neden olurlar. Aktive kaspaz-8, kaspaz-3'ü aktive eder ve apoptoz başlar (30,32).

Hücre içi sinyaller ile oluşan apoptozda ise mitokondri ve mitokondri zarları arasında bulunan sitokrom c proteini önemli bir rol oynamaktadır. Mitokondri dış zarının geçirgenliği arttığı durumlarda sitokrom c sitoplazmaya çıkar, kaspaz-9 ve ATP birleşerek kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu başlatırlar. Mitokondri zarının geçirgenliği Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir (30, 32). Bu genlerin kodlanmış proteinleri mitokondride bulunur. Genel olarak stresle karşılaşıldığında pro ve antiapoptotik gen ailesinin üyelerinin dengesinin, hücrenin apoptoza girip girmediğini ve kendi kendine son verip vermediğini veya hayatta kalıp kalmayacağını belirlediği kabul edilmektedir (33). Fonksiyonuna göre Bcl-2 ailesi Bcl-2 gibi apoptozisi inhibe eden proteinler ve Bax gibi apoptozise neden olan proteinler olmak üzere iki gruba ayrılır: (34). Antiapoptotik olan Bcl-2 ve Bcl-x_L proteini mitokondri zarı geçirgenliğini azaltırken apoptotik olan Bax ve Bak proteinleri Bcl-2 ve Bcl-x_L proteinlerine antagonist etki göstererek sitokrom c'nin sitozole salınmasına sebep olurlar (30, 32). Tipik olarak her iki proteinin (Bax, Bcl-2) ifadesi stabildir. Fakat Bax aşırı ifade olduğunda hücreler ölüm sinyallerine daha duyarlıdır. Nihayetinde apoptozis gerçekleşir. Benzer şekilde Bcl-2 aşırı ifadesi, çok sayıda Bax dimerlerinin dejenere olmasını sağlar. Bcl-2/Bax oranının artışı Bax'ın tetiklediği apoptozisi baskılar ve hücrenin hayatta kalma ihtimalini artırır (34).

Embriyonik ovaryumda farklılaşmaya milyonlarca folikülden sadece 400-500 tanesi maturasyonlarını tamamlayıp ovule olabilmektedir. Diğerleri maturasyonun herhangi bir evresinde overyan foliküler atrezi ile dejenere olarak kaybolurlar. Bu atreziye granüloza hücrelerinin apoptozisin aracılık ettiği bilinmektedir (19).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunularak 04/02/2020 tarih ve 03 sayılı onay kararı alınmıştır. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezine 01.03.2020 – 01.07.2020 tarihleri arasında başvuran 53 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların Helsinki Bildirgesine göre bilgilendirilmiş onam formu alındı. Bir hastanın eşi Klinefelter sendromu tanısı olduğu için, bir hastanın oositlerinin hepsi dondurulduğu için ve bir hastanın eşine yapılan mikro testiküler sperm ekstraksiyonu işleminde sperm bulunamadığı için çalışma dışı bırakıldı.

Hastalar klinik durumlarına göre 4 ayrı grupta sınıflandırılmıştır:

Kontrol: İnfertilite kliniğinde yapılan muayenelerinde ve testlerinde infertiliteye neden olabilecek farklı bir neden yokken tuba uterina kaynaklı nedenlerle veya erkek eşlerin spermiogram sonuçlarının DSÖ kriterlerine göre normozoospermik olarak sınıflandırılmayan hastalar (n=9 hasta, oosit:90) kontrol grubu olarak adlandırıldı.

Açıklanamayan İnfertilite: Yapılan infertilite testlerinde herhangi bir anomali saptanmayan kadın hastalar ve erkek eşlerin spermiogram sonuçları DSÖ kriterlerine göre normozoospermik olarak saptanan hastalar (n=8 hasta, oosit:86) açıklanamayan infertilite grubu olarak adlandırıldı.

PKOS: Rotterdam ESHRE / ASRM 2003 Tanı kriterlerine uyan hastalar (n=6 hasta, oosit:138) PKOS grubu olarak adlandırıldı:

- Oligo-ovulasyon ve / veya anovulasyon
- Klinik ve / veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
- USG bulguları (Ovede 2-9 mm 12 veya daha fazla follikül ve / veya 10ml'nin üzerinde over volümü)

ZOY: Bologna Kriterlerine uyan hastalar (n=27 hasta, oosit:124) ZOY grubu adlandırıldı.

Üç özellikten en az 2'si olmalı:

- İleri kadın yaşı (≥ 40) veya ZOY için bir risk faktörü)
- Önceki bir ZOY (konvansiyonel stimülasyon protokolü ile ≤ 3 oosit)
- Herhangi anormal ovaryan rezerv test (ör: AFC < 5-7 ve ya AMH < 0.5-1.1 ng/ml)

OVERYAN STİMULASYON

Hastalarda standart gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) antagonist protokolü ile kontrollü overyan hiperstimulasyon yapıldı. Hastanın menstruasyonun 2. gününde transvajinal ultrasonografi (USG) ile muayenesi yapılarak, bazal FSH, LH, östrojen seviyeleri ölçüldükten sonra, gonadotropinler ile ovulasyon indüksiyonuna başlandı. Folikül boyutu 14 mm'ye ulaştığında 25 mg GnRH antagonisti verildi. Hastanın folikül gelişim takibi transvajinal USG ile yapıldı. Takipte 18 mm'ye ulaşan en az iki adet folikül oluştuğunda oosit matürasyonu için 250 µg rekombinant hCG yapıp takip eden 36. saatte oosit toplama (OPU) işlemi yapıldı. OPU işlemi sedayon anestezisi altında çift lümen OPU iğnesi kullanılarak yapıldı.

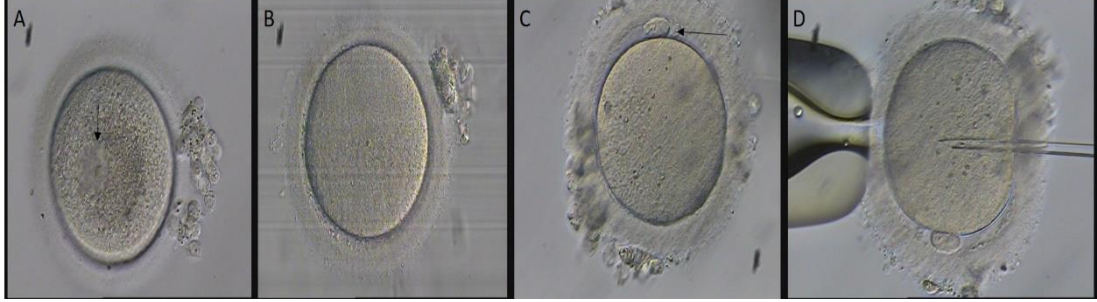
OOSİT TOPLAMA (OPU)

hCG enjeksiyonundan sonraki 36. saatte oositler transvajinal olarak ultrasonografi eşliğinde, özel bir iğne yardımıyla ve yıkama medyumu kullanılarak toplandı. 15 ml'lik steril tüplere konulan folikül sıvısı embriyoloji laboratuvarında steril petri kaplarına boşaltıldı ve stereomikroskop altında oosit arandı. Bulunan oositler 37°C'de ısınan MOPS tamponlu besiyerinde yıkandı. Sonra önceki gün hazırlanan üzerleri yağ ile kapatılan, bikarbonat tamponlu besiyerine alındı. Toplanan kumulus oosit kompleksleri (KOK), bikarbonat tamponlu besiyerinde 37°C'de %7 CO₂, %5 O₂ içeren inkübatörde 2 saat bekletildi.

OOSİTLERİN SOYULMASI (DENÜDASYON)

Oositlerin olgunluklarının değerlendirmek, intrasitoplazmik sperm enjeksiyon (ICSI) işlemi sırasında kutup cisimciğinin düzlemini ayarlayabilmek ve ICSI işlemi enjeksiyon iğnesinin ucunun tıkanmaması için soyma işlemi uygulandı. İşlem için hyalüronidaz enzimi kullanıldı. Enzimatik olarak 80 IU/ml hyaluronidaz enzimiyle 30 saniye muamele edilen KOK'lerin hepsi ayrı ayrı droplarda mekanik olarak denüstasyon işlemine tabii tutuldu. ICSI öncesi 2 saat inkübatörde inkübe edildi. 2 Saatin sonunda her metafaz II (M II) oosite hastanın eşinin spermi kullanılarak ICSI işlemi yapıldı. Soyulan oositler inverted mikroskopta 20X objektifte olgun olup olmadıklarına göre değerlendirildi. Kutup cisimciği olan olgun oositler MII, kutup cisimciğini atmamış tek hücre görünümünde olan olgunlaşmamış oositler ise metafaz

I (MI), germinal vezikülü gözlenen profaz I'deki oositler GV olarak değerlendirildi (Şekil 1). MI oositler ilk 4 saat içinde kutup cisimciğini attıklarında ICSI işlemine dahil edildi. Kutup cisimciği olmayan ve germinal vesikülü görülenler olgun olmadıkları için ICSI işleminde kullanılmadı.



Şekil 1. Hyase sonrası oositlerin inverted mikroskopta değerlendirilmesi. A: Germinal vezikül (GV) (ok), B: Metafaz I (MI) oosit, C: Metafaz II (MII) (ok:kutup cisimciği) oosit. D: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu 40X.

SPERM HAZIRLAMA TEKNİĞİ (GRADİYENT YÖNTEMİ)

Üç-beş günlük cinsel perhiz süresinin ardından mastürbasyon yöntemiyle steril semen toplama kaplarına semen örneği alındı. Örnek, 37°C'lik inkübatörde likefiye olması için 30 dakika bekletildi. Sonra steril bir tüpe koyulan örneğin görünüşü, likefaksiyon durumu ve hacmi not edildi. Semen örneğinden Makler sayma kamarasına 10 µl koyularak, faz kontrast mikroskopunda 20X objektif altında tüm kareler sayıldı. Total sperm sayısı, konsantrasyonu, progresif motil sperm sayısı, DSÖ kriterlerine (volume ≥ 1.5 mL, konsantrasyon ≥ 15 milyon/mL, total sperm sayısı ≥ 39 milyon, progresif hareketli sperm sayısı $\geq 32\%$) göre değerlendirildi (35). İlk analiz yapıldıktan sonra örnek dansite gradient yöntemi kullanılarak ICSI işlemi için hazırlandı. Sperm yıkama işlemi önceden hazırlanmış ve 37°C'ye getirilmiş % 90'lık ve % 45'lik iki farklı gradient solüsyonu ile yapıldı. Steril bir tüpe önce 1ml % 90'lık, sonra üzerine 1ml'lik % 45 solüsyon yavaşça konularak birbirine karışmayan iki tabaka oluşturuldu. Üzerine semen örneği yavaş bir şekilde konuldu. 1500 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant pelet ile karıştırılmadan alındı. Kalan peletin üstüne ısıtılan 1 ml sperm yıkama mediyumu konuldu ve peletin çözünmesi sağlandı ve tekrar 1500 rpm de 10 dakika santrifüj

edildi. Santrifüj sonrası 0,5 ml süpernatant alınıp kalan 0,5 ml sperm yüzmeye 37°C inkübatöre bırakıldı. ICSI işlemi için 30 dakika sonra yüzen spermier toplandı.

İNTRA SİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU (ICSI)

Oositler soyulup olgunluklarının değeriendirilmesinin ardından, olgun olanlara mikroenjeksiyon işlemi uygulandı. İşlem için MOPS tamponlu besiyeri kullanılarak ICSI kabına sperm ve oositler için ayrı damlalar yapıldı. Bu damlaların arasına visküz yapısıyla spermatozoonları yavaşlatan polivinilpirolidon (PVP) den koyuldu. PVP içine gradientle hazırlanmış spermatozoon solüsyonundan mikroenjeksiyon pipetiyle bırakıldı. Çevrede bulunan damlalara ise oositler yerleştirildi. Mikroenjeksiyon işlemi ısıtıcı tablası bulunan, mikromanüplatörde ve buna bağılı inverted mikroskopta yapıldı. Enjeksiyon pipeti ile hareketli ve normal görünümlü olan spermatozoon, kuyruğı kırılarak hareketsizleştirildi. Oosit, kutup cisimciğı 12 ya da 6 hizasına gelecek şekilde tutucu pipet ile sabitlendi ve enjeksiyon pipeti ile spermatozoon oosit sitoplazmasına bırakıldı. Oositler enjeksiyon yapıldıktan sonra, önceki günden hazırlanmış ve gazlanmış bikarbonat tamponlu kültür medyumuna aktarıldı. 37°C, %7 CO₂ ve %5 O₂ ortam sağılayan inkübatörlere kaldırılan oositler kültür süresince burada muhafaza edildi.

EMBRIYO KÜLTÜRÜ VE TAKİBİ

Mikroenjeksiyon işleminden sonra 16-20. saatlerde fertilizasyon kontrolü yapıldı. Oosit sitoplazmasında 2 pronükleus ve 2 kutup cisimciğı görülməsi fertilizasyonun gerçekleşmesi olarak değeriendirildi. Fertilizasyon oranı, fertilize olan MII oositlerin, toplam MII oositlere oranı alınarak hesaplandı. Mikroenjeksiyon işleminden yaklaşık 24 saat sonra ilk bölünme, 48. saatte ikinci ve 72. saatte üçüncü bölünmeleri değeriendirildi.

3. gün embriyoların değeriendirilmesinde kullanılan sınıflama sistemi ve kriterleri (Şekil 2):

Grade 1: Eşit büyüklükte blastomere sahip, fragmantasyon ve granülasyon göstermeyen embriyo.

Grade 2: Eşit büyüklükte blastomere sahip, <%10 oranında fragmantasyon veya granülasyon gösteren embriyo.

Grade 3: Eşit olmayan büyüklükte blastomere sahip, <%10 oranında fragmantasyon gösteren veya granülasyon gösteren embriyo.

Grade 4: Blastomerleri birbirinden tamamen farklı, blastomer sayısı tam olarak tespit edilemeyen, ileri derecede fragmantasyona sahip veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo (36, 37)



Şekil 2. 3. Gün embriyoların değerlendirilmesi. A: Grade 1 embriyo, B: Grade 2 embriyo, C: Grade 3 embriyo, D: Grade 4 embriyo. İverted mikroskop 40X.

5. gün embriyoların değerlendirilmesinde kullanılan sınıflama sistemi (Şekil 3): Gardner ve arkadaşları tarafından oluşturulan skorlama sistemi merkezimiz tarafından kullanılmaktadır. Blastosist morfolojik skorlamasında, blastosiste ait üç parametre değerlendirilmektedir (38):

Blastosel büyüklüğü;

1. Erken blastosist: Blastosöl embriyo hacminin yarısından daha küçüktür.

2. Blastosist: Blastosöl embriyo hacminin yarısından daha fazla bir alan kaplar.

3. Tam blastosist: Blastosöl tamamen embriyoyu doldurur.

4. Genişlemiş blastosist: Blastosöl hacmi erken embriyodan daha büyüktür ve zona incelmeye başlamıştır.

5. Hatching başlamış blastosist: Blastosist zonadan dışarı doğru çıkmaya (hatching) başlamıştır.

6. Hatch olmuş blastosist: Hatching işlemi tamamlanmıştır ve trofoektoderm zonadan kurtulmuştur.

İç hücre kitlesi;

A. Sıkıca paketlenmiş çok sayıda ve poligonal hücrelerden meydana gelmiş bir iç hücre kitlesi.

B. Gevşekçe bir araya gelmiş sahip iç hücre kitlesi.

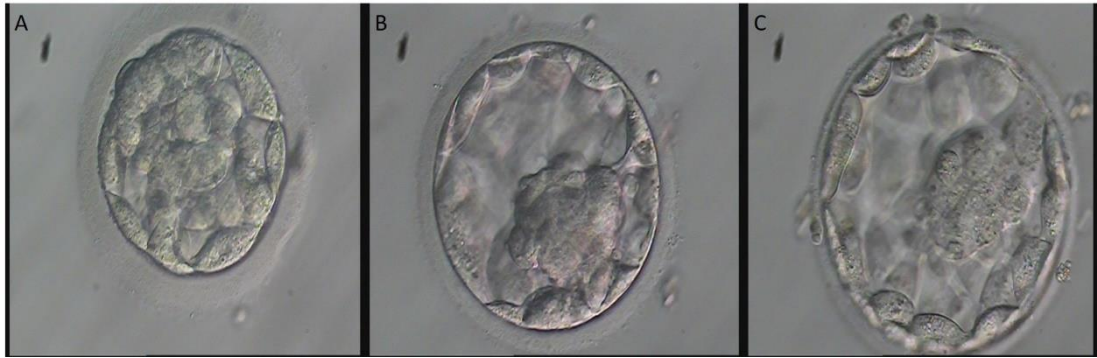
C. Çok az hücreye sahip iç hücre kitlesi.

Trofoektoderm;

A. Kesintisiz, tek katlı yassı ve çok sayıda epitel hücrelerinden meydana gelmiş bir trofoektoderm.

B. Gevşekçe düzenlenmiş, az sayıda epitel hücrelerinden oluşan trofoektoderm tabakası.

C. Çok az ve büyük hücrelerden meydana gelen trofoektoderm tabakası.



Şekil 3. İyi kalitede olarak değerlendirilen 5. gün embriyoları. A: Erken blast (EB), B: 3AA embriyo, C: 4AA embriyo. İverted mikroskop 40X.

TRANSFER GÜNÜ SEÇİMİ VE EMBRİYO TRANSFERİ

ICSI işlemi sonrası gelişen embriyoların transferi hastanın yaşı, gelişen embriyoların sayı ve kalitesine bağlı olarak 3. ve 5. günde yapıldı. Seçilen embriyo ya da embriyolar önceki gün hazırlanmış ve gazlanmış bikarbonat tamponlu mediyumu içine konularak yine aynı mediyum ile yıkanmış transfer kataterine Hamilton enjektör yardımıyla steril bir şekilde yerleştirildi. Kadın doğum uzmanına bu şekilde verilen katater ultrason eşliğinde anne adayının uterusuna yerleştirildi. Transfer işlemi sonrası mutlaka kateter kontrolü yapıldı.

Transfer sonrası hastalar 2 saat boyunca takip edilip evine taburcu edildi. Hastaya transfer sonrası 10. günde β hCG ölçümü yapıldı. β hCG sonucu 13 ng/ml ve üzeri gelen hastalar gebelik sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan takiplerde β hCG seviyesi beklendiği gibi yükselmeyen ve kese oluşumu gözlenmeyen hastalar biyokimyasal gebelik olarak değerlendirilirken, yapılan takiplerde β hCG değeri

beklendiği gibi yükselen ve amniyon kesesi görüntülenen hastalardan 20. haftadan önce düşük yapan hastalar abortus olarak değerlendirildi.

TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU

Oosit denüasyonu ile oositten ayrılan kumulus hücreleri ayrı bir ependorf tüpe alındı ve yıkama işlemi amacıyla 2 kere 1,5 ml PBS ile 15.000 rpm'de santrifüjlenip; süpernatant atıldı. 2. yıkama sonunda kalan pelet gen düzeyinde ifadelerinin değerlendirmesini yapabilmek amacıyla her bir ependorf tüpe 500 µl Trizol eklendi. Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve iyice pipetlendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı. Soğutmalı santrifüj ile +4°C' de 15.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek üç farklı faz oluşturuldu. Renksiz olan üst fazın toplandı, ayrı ependorf tüplere alındı. Toplanan üst fazın üzerine 500 µl izopropanol eklenip, pipetlendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. +4°C'de 15.000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Peletin üzerine %70'lik etanol eklendi ve +4°C'de 12.000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant atılıp, pelet kısa bir süre hava ile kurutuldu. Pellet 25 µl RNase-DNase free su ile çözüldü. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo) yardımı ile ölçüldü. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 ng/µl'dir) sulandırılan RNA örnekleri, 1µl RNase free su ile Nanodrop cihaz kaidesi üzerine bir damla halinde pipetlenip ve bilgisayardaki program analizi ile kör alındıktan sonra, 1µl olacak şekilde pipetlendi 230, 260,280 nm'de okundu. İzole edilen RNA'lar cDNA sentezi yapmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

cDNA SENTEZİ

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi A.B.T. cDNA Synthesis Kit with RNase Inhibitor (CatNo: C03-01-20) ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. cDNA sentez karışım prosedürü Tablo 1'de verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için 25°C'de 10 dakika, sonrasında 37°C'de 120 dakika inkübe edildi ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 1. cDNA sentez karışımı

	Hacim
RNA Temple	10 µl
10X RT Buffer	2.0 µl
25X dNTP Mix (2,5 mM each)	1,0 µl
RNase İnhibitor	0,5 µl
Random Hexamer (50 µM)	2.0 µl
Reverse Transcriptase(200 IU/µl)	1.0 µl
RNaz içermeyen su	3,5 µl
Total (reaksiyon başına)	20.0 µl

GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)

Bu çalışmada 96 kuyucuklu mikrolaka okuyabilen PicoReal 96 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) kullanılmış olup amplifikasyon ürünlerinin artışı anlık olarak takip edilebilmektedir. Sistemde, SYBR Green metodu kullanıldı. Primerlerin bağlanması ile az sayıdaki boya molekülü çift sarmal DNA'ya bağlanır. DNA'ya bağlanan SYBR Green moleküllerinin uyarılması, etkili şekilde ışık saçımının artmasına neden olur. Uzama aşamasında çift sarmal DNA oluştuğunda, daha fazla sayıda boya molekülleri bağlanır. Her bir siklus sonunda veri toplanarak, ışımadaki artış anlık olarak bilgisayar ekranından izlenir. Gerçek-zamanlı PCR ile kontrol grubu ve hasta grupları arasındaki Bax, Bcl-2, kaspaz-3 gen ifadelerinin nasıl değiştiği belirlendi. Her kuyudaki reaksiyon bileşimi Tablo 2'de gösterilmiştir. Reaksiyonda kullanılan primer dizileri Tablo 3'te gösterilmiştir:

Tablo 2. RT-PCR bileşimi

Bileşenler	Hacim (10 µl/kuyu)
A.B.T.™ qPCR SYBR Green Master Mix (2without ROX)	10 µl
Forward primer	0,2-2 µl
Reverse primer	0,2-2 µl
cDNA	Değişken
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Toplam	20 µl

Tablo 3. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri

Primer adı	Primer dizisi
GAPDH	F:5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3' R:5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'
BAX	F:5'-CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG-3' R: 5'-CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3''
BCL-2	F:5'-GGTGGGGTCATGTGTGTGG-3' R: 5'-CGGTTTCAGGTAAGTCACTCAGTCATCC-3'
KASPAZ-3	F:5'-AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC-3' R: 5'-ACAGTCCAGTTCTGTACCACG-3'

Elde edilen cDNA'lara RT-PCR uygulandı. Uygulanan PCR protokolü aşağıda Tablo 4’de detaylandırılmıştır.

Tablo 4. RT-PCR protokolü

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
Initial denaturation	95°C	300 saniye	1
Denature	95°C	10-30 saniye	40
Anneal	55-68°C	10-60 saniye	40
Extend	72°C	2-5 saniye/step	1

Referans genler yardımıyla hedef genlerdeki rölatif değışiklikler analiz edildi. RT-PCR sırasında elde edilen amplikonların, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısı software tarafından belirlendi. İlk olarak, örnekteki hedef (T) gen kopyalarının housekeeping (H) gen kopyalarından farkı (T-H) alındı (ΔC_t). İkinci basamakta, kontrol grubunun T-H farkının ortalaması alındı. Sonra, numunenin T-H farkından bu ortalama çıkarıldı ($\Delta\Delta C_t$). Ardından, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile hesaplama yapıldı. Çıkan sonuçların ortalaması alınarak gen ifadesinin gruplar arasındaki rölatif değışimleri bulundu (39).

İSTATİSLİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY IBM Corp.)) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değışkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca, çeyrekler arası aralık (ÇAA) ile kategorik değışkenler ise sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk ve Kolmogorov Smirnov testleri ile incelendi. Bağımsız grup incelemelerinde Mann Whitney U testi ve Kruskal Wallis Varyans Analizi (post hoc: Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanıldı. Kategorik değışkenler arasındaki farklılıkların incelenmesinde ise Ki kare testi kullanıldı. Sayısal değışkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde

Spearman korelasyon katsayısı kullanıldı. Oositlerin immatür olması ve pozitif gebelik üzerine etki eden faktörlerin incelenmesinde ise Lojistik Regresyon analizi kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların genel özellikleri tablo:5’de özetlenmiştir. Hastaların yaş ortalaması $33,02 \pm 5,78$ ’dir. Hastalardan toplanan ortalama oosit sayısı $8,84 \pm 7,11$ ’dir. Ortalama matür oosit sayısı $7,26 \pm 6,46$ olan hastalarımızın, fertilizasyon oranı 365 matür oositte 288 zigot oluşumu ile %78,9’dur. 24 (%48) hastaya 3. gün transferi yapılırken, 23 (%46) hastaya 5. gün transferi yapılmış, 3 (%6) hastada zigot gelişimi olmadığı için transfer yapılamamıştır. Transfer sonrası 10. Günde yapılan β hCG ölçümlerinde 22 (%44) hastanın sonucu gebelik pozitif, 28 (%56) hastanın gebelik sonucu negatif olarak saptanmıştır. Gebelik sonucu pozitif olan hastalardan 4’ünde (%18) biyokimyasal gebelik geliştiği tespit edilirken, 4’ü (%18) abortus ile sonuçlanmış 14’ü (%64) ise canlı doğum ile sonuçlanmıştır. Gruplardaki hasta sayısı değişken olduğu için p değeri hesaplanamamıştır (tablo:5 ve tablo:6).

Tablo 5. Çalışmaya dahil edilen hastaların genel özellikleri

	A.O \pm S.S.	Ortanca (ÇAA 1. - 3. ÇEYREK)
Kadın Yaşı	33,02 \pm 5,78	33,00 (29,00-37,25)
VKİ	25,64 \pm 5,90	24,11 (21,29-28,16)
AMH	1,97 \pm 2,21	1,02 (0,51-2,39)
FSH	8,63 \pm 3,79	7,65(5,88-11,14)
Östrojen	41,95 \pm 17,49	39,30(29,20-54,09)
TSH	2,14 \pm 1,62	1,95(1,26-2,62)
hCG günü Östrojen	1332,78 \pm 827,27	1073,00 (703,37-1832,00)
hCG günü Progesteron	0,62 \pm 0,53	0,49(0,28-0,81)
Endometriyum Kalınlığı	11,42 \pm 2,50	10,80(9,80-12,20)
İnfertilite Nedeni n;%		
Erkek	6(%12)	
Tubal	3(%6)	
Açıklanamayan	8 (%16)	
PKOS	6 (%12)	
ZOY	27 (%54)	
Toplanan Oosit Sayısı	8,74 \pm 7,11	7,00 (3,75-12,0)
Matür Oosit Sayısı	7,30 \pm 6,46	6,00 (2,75-10,00)
Fertilizasyon yüzdesi	78,9 (288/365)	
Grade 1 Embriyo Yüzdesi	42,71 (123/288)	
Transfer Günü		
3. Gün	24 (%48)	
5. Gün	23 (%46)	
İptal	3 (%6)	
Gebelik		
Pozitif	22 (%44)	
Negatif	28 (%56)	
Gebelik Sonucu		
Doğum	14 (%64)	
Biyokimyasal	4(%18)	
Abortus	4(%18)	

A.O: Aritmetik Ortalama; S.S: Standart Sapma; ÇAA: Çeyrekler Arası Aralık VKİ:Vücut kitle indexi.

Tablo 6. Hasta gruplarının transfer durumlarının ve gebelik sonuçlarının dağılımı

		Kontrol n=9 %18	Açıklanamayan n=8 %16	PKOS n=6 %12	ZOY n=27 %54	Total
Transfer Günü	3. Gün	4 %16,7	2 %8,3	1 %4,2	17 %70,8	24 %100
	5. Gün	5 %21,7	6 %26,2	5 %21,7	7 %30,4	23 %100
	İptal	0 %0	0 %0	0 %0	3 %100	3 %100
Gebelik	Pozitif	4 %18,2	4 %18,2	5 %22,7	9 %40,9	22 %100
	Negatif	5 %17,9	4 %14,3	1 %3,6	18 %64,2	28 %100
Gebelik Sonucu	Doğum	2 %14,3	4 %28,6	3 %21,4	5 %35,7	23 %100
	Abortus	0 %0	0 %0	2 %50	2 %50	4 %100
	Biyokimyasal	2 %50	0 %0	0 %0	2 %50	4 %100

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaşları karşılaştırıldığında ZOY grubunda anlamlı olarak diğer gruplara göre daha ileri yaşta olduğu belirlenmiştir ($35,33\pm 5,81$) ($p<0,05$). Hastaların AMH değerleri karşılaştırıldığında ZOY grubunda anlamlı olarak düşük olarak saptanmıştır ($0,93\pm 1,27$) ($p<0,001$). FSH değerleri ZOY grubunda kontrol ve PKOS gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($10,56\pm 3,91$) ($p<0,05$). Hastaların hCG indüksiyon yaptıkları gün indüksiyon öncesi östrojen seviyeleri karşılaştırıldığında PKOS grubunda ZOY grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($2638,66\pm 609,18$) ($p<0,05$). Hastalardan toplanan oosit sayıları karşılaştırıldığında PKOS grubunda ZOY grubuna göre anlamlı şekilde daha fazla sayıda oosit toplandığı tespit edilmiştir ($22,83\pm 7,57$) ($p<0,001$). Hastalardan toplanan matür oosit sayısı karşılaştırıldığında yine PKOS grubunda ZOY grubuna göre anlamlı şekilde daha fazla matür oosit elde edildiği görülmüştür ($19,67\pm 7,96$) ($p<0,001$) (Tablo:7).

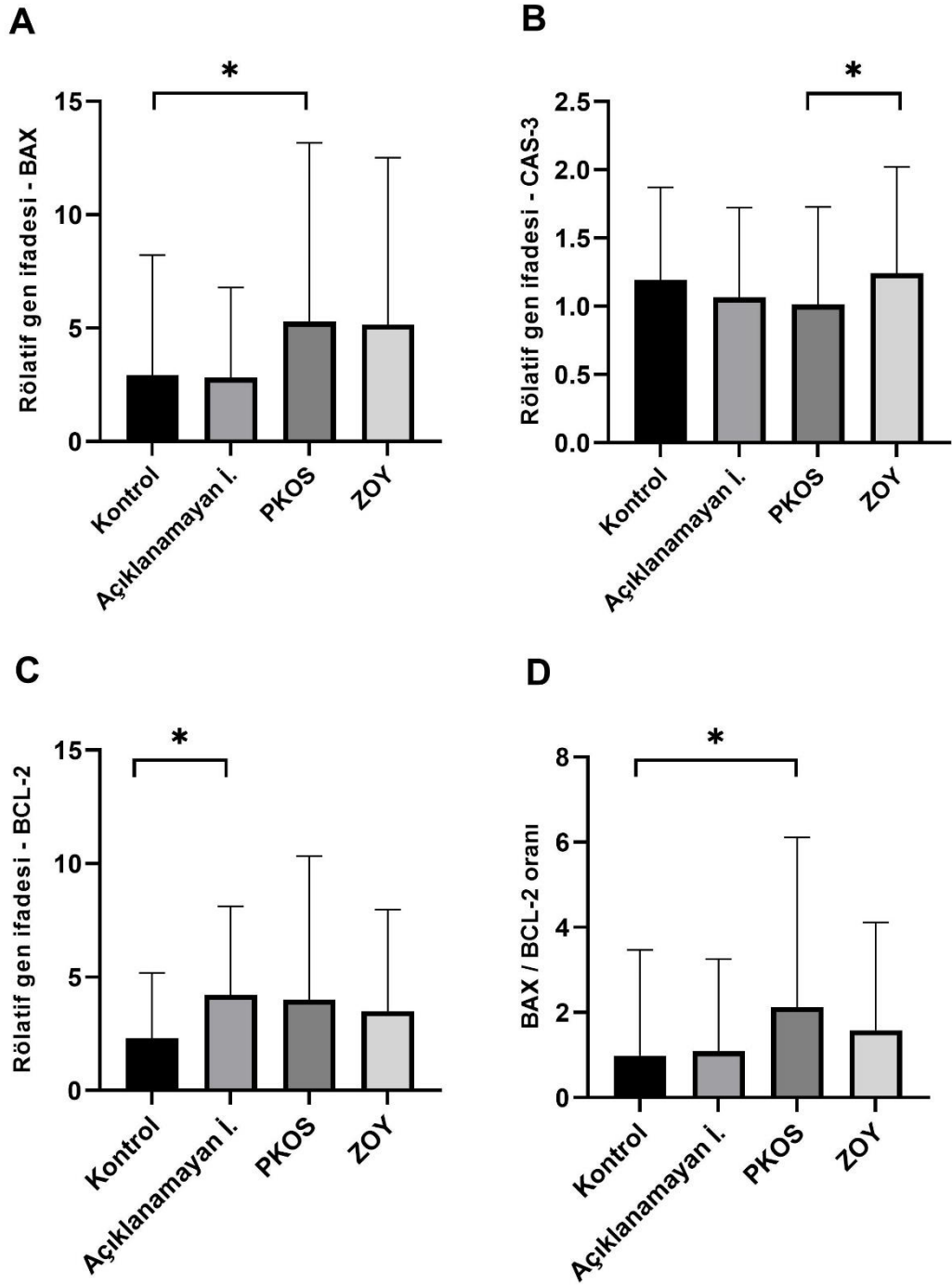
Tablo 7. Hasta gruplarının demografik özelliklerinin karşılaştırılması

	Kontrol n=9 % 18	Açıklanamayan n=8 % 16	PKOS n=6 % 12	ZOY n=27 % 54	p Değeri
	Ortalama±S.S. Ortanca (ÇAA 1. ve 3. Çeyrek)	Ortalama±S.S. Ortanca (ÇAA 1. ve 3. Çeyrek)	Ortalama±S.S. Ortanca (ÇAA 1. ve 3. Çeyrek)	Ortalama±S.S. Ortanca (ÇAA 1. ve 3. Çeyrek)	
Yaş	31,44±5,81 33,00 (26,00- 35,50)	29,88±3,72 30,00 (26,75- 33,25)	29,17±3,48 30,00 (26,75- 31,50)	35,33±5,81 36,00 (31,00- 39,00)	0,016*
VKİ	25,97±3,27 25,47 (22,99- 28,83)	26,45±7,14 26,36 (19,62- 30,50)	25,38±61 24,93 (19,64- 32,59)	25,34±6,32 23,71 (20,83- 26,53)	0,757
AMH	1,99±1,32 1,54 (1,11-3,00)	2,10±1,10 1,98 (1,06-3,31)	6,37±2,46 6,97 (4,47-8,36)	0,93±1,27 0,52 (0,34- 0,86)	<0,001*
FSH	5,91±2,60 5,92 (5,25-7,29)	7,27±1,51 6,52 (6,11-9,01)	5,80±1,10 5,85 (4,92-6,61)	10,56±3,91 10,24 (7,15- 13,80)	0,002*
Östrojen	31,53±17,48 29,16 (23,90- 36,57)	42,01±11,62 43,40 (36,35- 52,88)	35,99±10,61 31,90 (28,37- 45,87)	46,72±18,85 49,06 (28,62- 59,62)	0,132
TSH	2,15±0,85 1,95 (1,65-2,91)	2,97±3,17 1,80 (1,13-3,86)	1,71±1,04 1,79 (0,89-2,34)	1,98±1,23 1,77 (1,23- 2,36)	0,785
hCG Günü Östrojen	1557,86±771,79 1750,00 (945,50- 2014,00)	1369,95±588,61 1387,00 (799,20- 1918,00)	2638,66±609,18 3000,00 (2106,00- 3000,00)	956,54±618,92 893,00 (554,00- 1322,00)	0,001*
hCG Günü Progesteron	0,92±0,68 0,56 (0,32-1,73)	0,55±0,25 0,46 (0,33-0,84)	1,00±1,03 0,74 (0,31-1,43)	0,44±0,25 0,39 (0,21- 0,58)	0,105
Endomet- rium kalınlığı	12,44±3,00 11,90 (9,70- 15,25)	11,92±1,40 11,95 (10,72- 12,87)	13,40±4,25 12,60 (10,07- 17,22)	10,37±1,48 10,55 (9,90- 11,40)	0,69
Toplanan Oosit	10,00±3,80 10,00 (6,50- 12,00)	10,75±4,46 9,50 (8,00- 14,25)	22,83±7,57 20,00 (18,75- 26,00)	4,59 ±2,81 4,00 (2,00- 7,00)	<0,001*
Matür Oosit	7,67±4,09 7,00 (4,50- 11,00)	9,13±4,32 8,50 (4,75- 14,00)	19,67±7,96 18,50 (14,50- 24,25)	3,89±2,45 3,00 (2,00- 6,00)	<0,001*
Fertilizasyon Yüzdesi	70,73±23,30 77,78 (45,00- 89,48)	86,54±11,73 87,78 (76,70- 98,33)	72,29±18,75 72,61 (61,31- 87,89)	75,92±32,84 87,50 (57,14- 100,00)	0,37
Grade 1 embriyo yüzdesi	45,64±29,44 33,33 (0-100)	44,62±31,91 56,35 (0-87,50)	40,88±24,04 47,86 (0-61,54)	33,70±36,03 28,57 (0-100)	0,552

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik Ortalama; S.S: Standart Sapma; ÇAA: Çeyrekler Arası Aralık.

Grupların gen ifadeleri karşılaştırıldığında Bax ifadesi anlamlı olarak değişmiştir. Bax ifadesi PKOS grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (p=0.01). Yapılan lojistik regresyon analizlerinin sonucunda açıklanamayan infertilite grubunda, Bax gen ifadesinin toplanan oositlerin immatür olması üzerinde istatistiksel

olarak anlamlı etkisi olduğu gösterilmiştir. Bax ifadesinin artmış olması immatür olma riskini istatistiksel olarak arttırmaktadır (O.R:1.197). Kaspaz-3 gen ifadesi PKOS grubunda ZOY grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır (p=0.021). Yapılan lojistik regresyon analizinde ZOY grubunda, kaspaz-3 gen ifadesinin pozitif gebelik sonucu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi olduğu gösterilmiştir. Kaspaz-3 gen ifadesinin artması pozitif gebelik oranlarını istatistiksel olarak düşürmektedir (O.R: 0.421). Bcl-2 ifadesi açıklanamayan infertilite grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,039). Bax/Bcl-2 oranı PKOS grubunda açıklanamayan infertilite grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,021) (Tablo:8). Açıklanamayan infertilite grubunda, Bcl-2 ifadesi ile kaspaz-3 ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönde, zayıf düzeyde ilişki bulunmuştur (r=0.228). Kontrol, açıklanamayan infertilite ve ZOY gruplarında kaspaz-3 ifadesi ile Bax/Bcl-2 oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönlü ilişki bulunmuştur ancak bu ilişki PKOS grubunda anlamlı değildir. PKOS grubunda Bax ifadesi ile kaspaz-3 ifadesi istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönlü (r=0.209) ilişki bulunmuştur. PKOS grubunda Bcl-2 ifadesi, kaspaz-3 ifadesi ile istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde (r=0,348) kuvvetli düzeyde ilişkili saptanmıştır. ZOY grubunda Bax ifadesi ile Bcl-2 ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönlü (r=-0,190) ilişki saptanmıştır. ZOY grubunda Bcl-2 ile kaspaz -3 ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde (r=0,287) ilişki göstermiştir (Şekil. 4, Tablo 8).



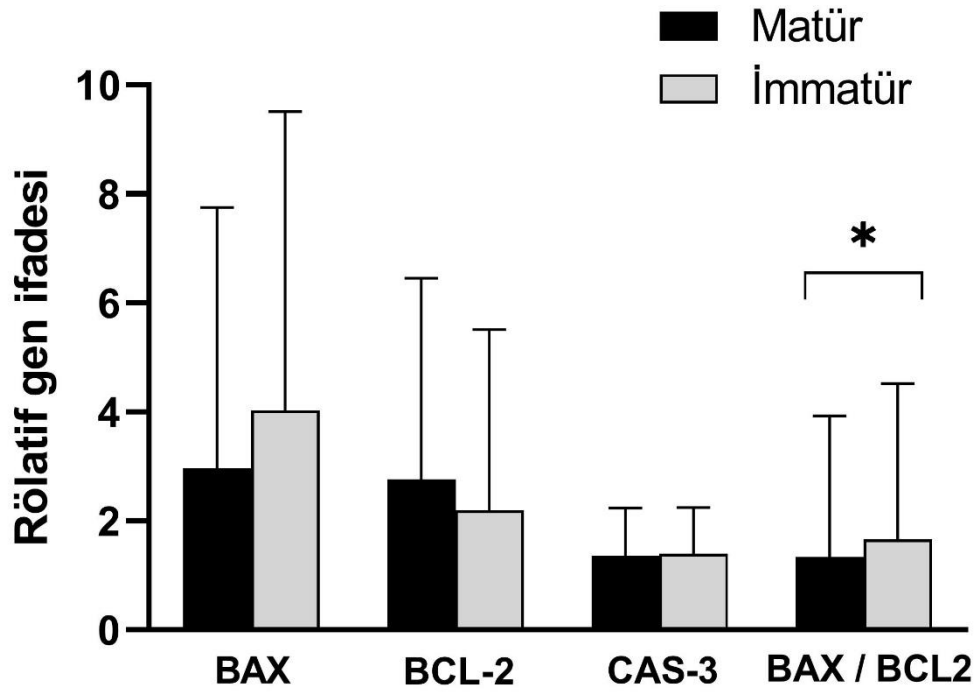
Şekil 4. Grupların kumulus hücrelerindeki Apoptoz ilişkili rölatif gen ifadelerinin karşılaştırılması. A: Bax, B: Kaspaz-3, C: Bcl-2, D:Bax/Bcl-2 oranı. Açıklanamayan İ:Açıklanamayan İnfertilite Cas-3:Kaspaz-3

Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen grupların gen ifadelerinin karşılaştırılması

GEN	HASTA GRUPLARI	A.O ± S.S.	Ortanca (ÇAA 1. - 3. ÇEYREK)	p DEĞERİ
BAX	KONTROL	2,92 ± 5,3	0,69 (0,34 - 3,40)	0,01 (Kontrol- PKOS)
	AÇIKLANAMAYAN	2,81 ± 3,98	1,23 (0,30 - 3,62)	
	PKOS	5,28 ± 7,88	2,55 (0,42 - 6,06)	
	ZOY	5,15 ± 7,36	2,32 (0,40 - 6,43)	
BCL-2	KONTROL	1,67 ± 2,1	1,59 (0,49 - 2,92)	0.039* (Kontrol- Açıklanamayan)
	AÇIKLANAMAYAN	3,08 ± 2,84	3,41 (0,60 - 6,62)	
	PKOS	2,92 ± 4,61	1,72 (0,28 - 4,81)	
	ZOY	2,55 ± 3,27	1,18 (0,34 - 5,01)	
KASPAZ-3	KONTROL	1,19 ± 0,68	1,10 (0,80 - 1,42)	0.021* (PKOS- ZOY)
	AÇIKLANAMAYAN	1,07 ± 0,66	1,01 (0,65 - 1,35)	
	PKOS	1,01 ± 0,71	0,94 (0,41 - 1,39)	
	ZOY	1,24 ± 0,78	1,21 (0,75 - 1,62)	
BAX/BCL-2	KONTROL	0,98 ± 2,49	0,16 (0,04 - 0,62)	0.021* (Açıklanamayan- PKOS)
	AÇIKLANAMAYAN	1,09 ± 2,17	0,05 (0,02 - 1,03)	
	PKOS	2,13 ± 3,98	0,28 (0,04 - 2,09)	
	ZOY	1,58 ± 2,53	0,45 (0,04 - 2,31)	

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik Ortalama; S.S: Standart Sapma; ÇAA: Çeyrekler Arası Aralık.

Matür oositlerle immatür oositlerin kumulus hücrelerinin gen ifadelerini karşılaştırdığımızda Bax, kaspaz-3 ve Bcl-2 ifadelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Fakat Bax/Bcl-2 oranı matür oositlerin kumulus hücrelerinde anlamlı düşük olduğu saptandı (sırasıyla 2,67±18,10, 13,80±52,77, p=0,020) (Tablo:9). Yapılan korelasyon analizinde immatür oositlerin kumulus hücrelerinde Bcl-2 ifadesi ile kaspaz-3 ifadesi istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönlü (r=0,409) ilişkili bulunmuştur. İmmatür oositlerin çevresinden izole edilen kumulus hücrelerinin kaspaz-3 ifadesi ile Bax/Bcl-2 oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönlü (r=-0,276) ilişki bulunmuştur. Matür oositlerin çevresinden izole edilen kumulus hücrelerinin Bax ile Bcl-2 gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönlü (r=-0,150) ilişki saptanmıştır. Matür oositlerin çevresinden izole edilen kumulus hücrelerinin Bcl-2 ifadesi ile kaspaz-3 ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönlü (r=0,305) korelasyon saptanmıştır (Şekil.5, Tablo.9).



Şekil 5. Matür ve immatür oositlerin kumulus hücrelerindeki apoptoz ilişkili rölatif gen ifadelerinin karşılaştırılması. Cas-3:Kaspaz-3

Tablo 9. Matür ve immatür oositlerin gen ifadelerinin karşılaştırılması

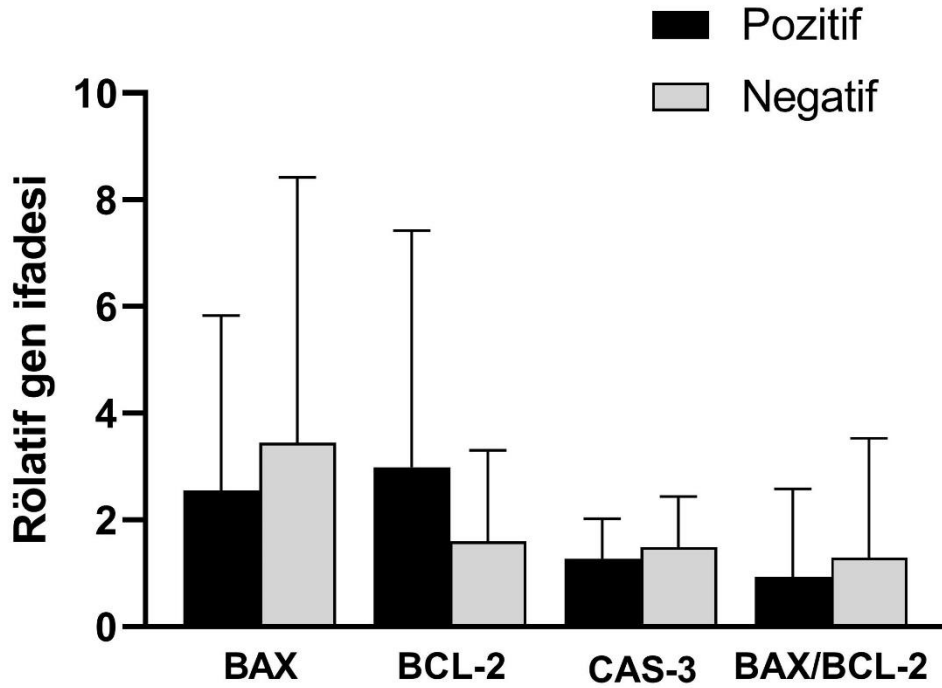
GEN		A.O ± S.S.	Ortanca (ÇAA 1. - 3. ÇEYREK)	p Değeri
BAX	Matür	2,97 ± 4,79	1,20 (0,27 - 3,46)	0,157
	İmmatür	4,03 ± 5,48	1,78 (0,31 - 6,02)	
BCL-2	Matür	2,77 ± 3,69	1,49 (0,28 - 3,62)	0,064
	İmmatür	2,20 ± 3,32	0,76 (0,13 - 2,70)	
KASPAZ-3	Matür	1,36 ± 0,88	1,27 (0,77 - 1,73)	0,419
	İmmatür	1,40 ± 0,84	1,38 (0,86 - 1,94)	
BAX/BCL-2	Matür	1,33 ± 2,60	0,19 (0,03 - 1,14)	0,020*
	İmmatür	1,66 ± 2,86	0,50 (0,05 - 1,73)	

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik Ortalama; S.S: Standart Sapma; ÇAA: Çeyrekler Arası Aralık.

Alınan MII oositlerin fertilizasyon durumuna göre oositlerin çevresinden izole edilen kumulus hücrelerinin gen ifadeleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Embriyo kalitelerine göre oositlerin çevresinden izole edilen kumulus hücrelerinin gen ifadeleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Kötü kalitedeki embriyolar ile ilişkili kumulus hücrelerinin Bax ile Bcl-2 ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ($r=-0,233$) korelasyon saptanmıştır. Her iki grupta da Bcl-2 ve kaspaz-3 ifadeleri arasında istatistiksel olarak

anlamli ve pozitif yönde (sirasıyla $r=0,343$, $r=0,249$) kolerasyon saptanmiştir. Gelişen embriyoların transferi sonrası gebelik pozitif-gebelik negatif durumunun gen ifadelerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Gebelik pozitif olan hastalara transfer edilen embriyoların kumulus hücrelerinin Bcl-2 ifadesi ile kaspaz-3 ifadesi arasında korelasyon saptanmaz iken gebelik negatif hastalarının kumulus hücrelerinin bu iki gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönlü ($r=0,364$) ilişki saptanmıştır.

Gebelik sonucu pozitif olan hastalara transfer edilen embriyolarla ilişkili kumulus hücreleriyle gebelik sonucu negatif olan hastalara transfer edilen embriyolarla ilişkili kumulus hücrelerindeki gen ifadeleri incelendiğinde anlamlı şekilde olmasa da Bax gen ifadesinin azaldığı yine anlamlı şekilde olmasa da Bcl-2 gen ifadesinin ise artmış olduğu görülmüştür (Şekil. 6, Tablo.10).



Şekil 6. Gebelik sonucu pozitif ve negatif olan hastaların kumulus hücrelerindeki apoptoz ilişkili rölatif gen ifadelerinin karşılaştırılması. Cas-3:Kaspaz-3

Tablo 10. Gebelik sonucu pozitif ve negatif olan hastaların gen ifadelerinin karşılaştırılması

GEN		A.O ± S.S.	Ortanca (ÇAA 1. - 3. ÇEYREK)	p Değeri
BAX	GEBELİK POZİTİF	2,54 ± 3,28	1,27 (0,23 - 3,72)	0,734
	GEBELİK NEGATİF	3,44 ± 4,97	1,82 (0,23 - 4,82)	
BCL-2	GEBELİK POZİTİF	2,99 ± 4,44	1,35 (0,27 - 4,33)	0,458
	GEBELİK NEGATİF	1,59 ± 1,71	1,12 (0,26 - 2,51)	
KASPAZ-3	GEBELİK POZİTİF	1,27 ± 0,75	1,22 (0,99 - 1,47)	0,298
	GEBELİK NEGATİF	1,49 ± 0,95	1,36 (0,85 - 1,95)	
BAX/BCL-2	GEBELİK POZİTİF	0,93 ± 1,65	0,18 (0,03 - 1,33)	0,671
	GEBELİK NEGATİF	1,29 ± 2,23	0,34 (0,05 - 1,52)	

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik Ortalama; S.S: Standart Sapma; ÇAA: Çeyrekler Arası Aralık.

TARTIŞMA

Kumulus hücreleri incelenen 365 oositin fertilizasyon, iyi kalitede embriyo geliştirme durumları apoptotik gen ifadeleriyle ilişkili bulunmamıştır. Fakat gelişen kötü kalitede gelişen embriyoların Bax ve Bcl-2 gen ifadeleri ters kolerasyon göstermiştir. Yapılan lojistik regresyon analizi sonucunda açıklanamayan infertilite grubunda, Bax gen ifadesinin yükselmesinin toplanan oositlerin immatür olması üzerine istatistiksel olarak anlamlı şekilde riski arttırıcı etkisi olduğu görülmüştür (O.R:1.197). Bir diğer önemli nokta ZOY grubunda, kaspaz-3 ifadesinin artmasının gebelik gelişmesini olumsuz etkilediği saptanmıştır.

Ma ve ark. yaptığı çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PKOS grubunda daha fazla oosit elde edilmesine rağmen fertilizasyon oranları önemli ölçüde daha düşüktü (20). Başka bir çalışmada PKOS (289 embriyo) ve tubal faktör (258 embriyo) iki hasta grubunu incelenmiş, serum AMH seviyesi ve toplanan oosit miktarı beklendiği gibi PKOS grubunda daha yüksek saptanmıştır (40). Bu çalışmalara paralel olarak bizim çalışmamızda PKOS grubunda serum AMH değerleri, toplanan oosit sayısı, matür oosit sayısı fazla çıkmasına rağmen gruplar arasında fertilizasyon oranları ve grade 1 embriyo gelişimi oranı arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Bu sonuç bize toplanan oosit sayısı ile embriyo gelişiminin ilişkili olmadığını gösterdi.

Kumulus hücrelerinin birbiriyle ve oositlerle yaptığı sinyal moleküllerinin transportu ve metabolik alışverişe izin veren özelleşmiş gap-junctionlarıyla oositler için gerekli besinleri sağlama ve koruma yönünden hayati öneme sahiptir (34). Kumulus hücrelerinin yerel glikozaminoglikan üretimi, steroid hormonların üretimi ve salınması, erkek pronükleus oluşumu, monospermik fertilizasyon ve embriyonik gelişimden sorumlu olan sitoplazmik olgunlaşmayı desteklediği bilinmektedir (41).

Bunlara ek olarak granüloza hücre apoptozisi aktif ve alternatif bir hücre ölüm sürecidir. Granüloza hücre apoptozisinin tetiklenmesi folikül atrezisine sebep olur. Overyan siklusun normal süreci boyunca foliküler atrezinin her evresinin granüler hücre atrezisiyle güçlü ilişkisi vardır. Granüloza hücre apoptozisinin folikül atrezisinin aktif mekanizması olduğu kabul edilmektedir (34). Bununla beraber kumulus hücrelerinin, oosit matürasyonu sırasında oositleri oksidatif strese karşı koruduğuna dair kanıtlar vardır. Kumulus hücrelerinin antioksidan etkileri, embriyotrofik

özelliklerinde fertilizasyon ve embriyonik gelişime katkıda bulunabilir. Kumulus hücreleri ve oositler arasındaki gap junctionları sürdürmek için ortama çeşitli faktörler veya proteinler salgılar ve böylece optimum fertilizasyon için çevreyi zenginleştirir (42). Kumulus hücrelerinin oosit olgunlaşmasında şu yollarla önemli rolleri olduğu düşünülmektedir; 1. Mayotik arrest altındaki oositi tutmak, 2. Mayotik yeniden düzenlenmenin induksiyonuna katkı sağlamak, 3. Sitoplazmik matürasyonu desteklemek. Oosit matürasyonu boyunca kumulus hücrelerinin bu anahtar etkisi gap junctional bağlantı kompleksine ve spesifik metabolik aktivitesine bağlıdır. Prepubertal kumulus hücreleri belirgin bir çekirdek içerir. Oosite reaksiyon sürecinde sınırlı ve birbirleriyle zayıf bağlantıları olan, yüksek transkripsiyonel aktivite gösteren sınırlı bir sitoplazmaya sahiptir (43).

Assou ve arkadaşları, oligonükleotid microarray yöntemi kullanarak immatür ve matür oositlerin kumulus hücrelerinin gen ifadeleri karşılaştırdı. Bcl-2 benzeri protein 10 ve BIRC5 proteinlerinin apoptozda rol aldığını ve olgun veya olgunlaşmamış oositlerin kumulus hücrelerinde apoptoz ile ilişkili daha fazla gen olabileceğini bildirdiler (44). Kumulus hücrelerindeki Bcl-2 mRNA içeriği oosit matürasyon evresiyle ve fertilizasyon oranıyla kolerasyon gösterdiği ve oositlerin matürasyon ve fertilizasyon kabiliyetinin, kumulus hücrelerindeki Bcl-2 ve Bax genlerinin ifadeleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (45). Bizim çalışmamızda Bax ve kaspaz-3 gen ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı olmasa da immatür oositlerin kumulus hücrelerinde daha yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde Bcl-2 gen ifadesinin immatür oositlerin kumulus hücrelerinde düşük olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda saptanan en önemli bulgulardan biri matür oositlerin kumulus hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranının matür oositlerin kumulus hücrelerinde, immatür oositlerin kumulus hücrelerine göre anlamlı olarak daha düşük olmasıdır. Bu da bize kumulus hücrelerinin mayotik yeniden düzenlenmeye ve sitoplazmik matürasyona katkı sağladığını göstermiştir.

Oositler avasküler bir çevreye sahiptir. Bu yüzden normal folikülogenez herhangi iki granüloza hücresi, kumulus hücresi ve oosit arasındaki çift yönlü iletişime dayanır. Hücreler arası gap junctionlar, folikülogenez ve steroidogeneze çok önemlidir (46). Granüloza hücreleri ve oositler arasındaki kanallar sadece büyüme ve gelişme için gerekli metabolitlerin geçişine izin vermez aynı zamanda oositteki mayotik arrestin sürdürülmesinde önemli rol oynar (47). Granüloza hücreleri parakrin

sinyallerle oosit matürasyonunu kontrol eder. Oosit etrafındaki mikroçevreyi değiştirir. Apoptoz granüloza hücre yenilenmesinin fizyolojik bir mekanizması olarak ortaya çıkar. Ancak bunun uyarılmış ovaryumdaki nasıl bir ilişki içinde olduğu net değildir (10). Bununla birlikte kumulus hücrelerinin infertilitenin farklı etiyojisine sahip hastalar için farklı özelliklerde olduğu bilinmektedir. Yardımcı üreme teknikleri uygulanan çiftlerde kadın kaynaklı infertilitenin ana nedenlerinden biri olan PKOS'ta diğer hastalara göre artmış siklus iptal oranı ve azalmış döllenme oranı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (48-51). Bunun nedenin mayozdaki kusurlarla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (52). Fesahat ve ark yaptığı çalışmada rastgele 60 hastanın matür oositleri ile rastgele 60 hastanın GV oositlerini toplamışlar. Hastaların etiyojisine göre, kadın faktör etiyojisinin bir alt grubu olarak ZOY grubunda Bax, Bcl-2, kaspaz-8 ve kaspaz-3 genlerinde anlamlı şekilde daha yüksek mRNA düzeyleri saptamışlar. Bu çalışmada ZOY hastalarında immatür oositlerinde başlatıcı kaspaz olarak kaspaz-8'in ve hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarla aktive olan kaspaz-3'ün mRNA düzeylerinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (53). Bu sonuçlar bize in vivo olgunlaşmamış oositlerin foliküllerindeki apoptotik kumulus hücre yüzdelерinin hastanın etiyojisine bağlı olabileceğini göstermiştir. Loback ve ark. yaptığı çalışmada 59 IVF hastasının folikül sıvısından kumulus hücrelerini izole etmişler ve kaspaz-3, kaspaz-8, Bax ve Bcl-2 gen ifadelerine RT-PCR'la incelemişler. Yapılan çalışmada kaspaz-3 seviyesinin preovulatar folikül sayısı, toplanan oosit sayısı, yaşayan embriyo sayısı ile anlamlı olarak negatif korelasyon saptamadıklarını söylemişlerdir. Bu bulgulara göre granüloza hücrelerinde artan kaspaz-3 gen ifadesinin insanda kötü overyan yanıtla ilişkili olabileceğini savunmuşlardır (10). Bizim çalışmamızda PKOS ve ZOY grubunda daha fazla Bax geni ifadesi olduğu bulunmuştur. Bax gen ifadesinin PKOS grubundaki artışı kontrol grubuna göre anlamlıdır. Ayrıca PKOS grubunda Bax ifadesi ile kaspaz-3 ifadesi istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönlü ($r=0.209$) ilişki bulunmuştur. Yapılan lojistik regresyon analizinde ZOY grubunda, kaspaz-3 ifadesinin pozitif gebelik sonucu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi olduğu gösterilmiştir. Kaspaz-3 gen ifadesinin artması pozitif gebelik oranlarını istatistiksel olarak düşürmektedir (O.R: 0.421). Bu sonuçlar bize kumulus hücrelerindeki apoptotik gen ifadesinin infertilitenin etiyojisiyle de ilişkili olduğunu göstermiş oldu.

İn vitro embriyo değerlendirmesi ve transfer için canlı embriyoların seçilmesi, yardımcı üreme teknolojisinde en önemli adımlardan biridir. En yüksek implantasyon potansiyeline sahip, kaliteli bir embriyonun belirlenmesi, gebelik olasılığını en üst düzeye çıkarmak için kritik öneme sahiptir. Geleneksel olarak, transfer için embriyo seçimi morfolojik kriterlere dayanmaktadır. Kumulus hücreleri ile oositler arasında iki taraflı bir iletişim olduğundan, bu hücreler oositlerin işlevlerini ve sonraki embriyo geliştirme yeterliliklerini ortaya çıkarabilir ve kontrol edebilirler (54, 55). Son zamanlarda, oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin özellikleri, embriyo seçimi için invazif olmayan bir alternatif olarak kabul edilmiştir (44, 56). Bazı çalışmalar, kumulus hücrelerindeki gen ifadesi modelinin, embriyo gelişimini ve gebelik sonucunu tahmin etmek için potansiyel bir biyobelirteç olduğuna dair kanıtlar öne sürmüşlerdir (57, 58). Birçok çalışma, kumulus hücrelerinde ifade edilen ve embriyo kalitesi (54, 59) ya da implantasyon oranları (60, 61) için öngörücü olarak kullanılabilecek aday genleri tespit etmeye çalışmıştır.

Haouzi ve Hamamah tarafından yazılan bir derlemede, apoptotik belirteçleri oosit ve embriyo kalitesi seçimi için yeni kriterler olarak önermektedir (62). Bax ve Bcl-2 insan preimplantasyon embriyolarının kalitesinin değerlendirilmesi iki ana kriter olarak değerlendirilmiştir (63). Yapılan çalışmalarda kumulus hücrelerindeki apoptozis seviyesinin IVF yapılan insan ve sığır embriyolarının gelişim potansiyelleriyle korele olduğu bildirilmiştir (64,65).

Faramarzi ve ark. 2019 yılında yaptığı çalışmada, 26-37 yaş arası 90 infertilite hastasından elde edilen kumulus hücrelerinin Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 genlerinin ifadeleri, kumulus hücreleri ile ilişkili embriyoların morfokinetiği açısından değerlendirmişler. İlk klivaj zamanının kumulus hücrelerinin Bax ve kaspaz-3 gen ifadeleri ile anlamlı şekilde pozitif korele iken Bcl-2 gen ifadesi ile anlamlı şekilde negatif korele olduğunu göstermişler. Bunun yanında Bax ve kaspaz-3'ün mRNA seviyelerinin, eşit olmayan büyüklükte blastomerlere sahip embriyoların kumulus hücrelerinde diğer embriyoların kumulus hücrelerine göre anlamlı şekilde daha yüksek olarak saptamışlardır. Ayrıca blastomer füzyonu olan embriyolarının kumulus hücrelerindeki Bax, kaspaz-3 gen ifadeleri ve Bax/Bcl-2 oranı, blastomer füzyonu olmayan embriyolarının kumulus hücrelerindeki gen ifadelerine ve oranına göre anlamlı şekilde daha fazla iken Bcl-2 gen ifadelerini anlamlı şekilde daha düşük

bulmuşlar. Ayrıca trichotomous mitoz olan embriyolar ile ilişkili kumulus hücrelerinin Bax, kaspaz-3 genlerinin ifadeleri ve Bax/Bcl-2 oranı diğer embriyoların kumulus hücrelerindeki BAX ve kaspaz-3 gen ifadelerine ve Bax/Bcl-2 oranına anlamlı şekilde artış gösterdiğini bulmuşlar. Ayrıca bununla paralel olarak trichotomous mitoz olan embriyolarda diğer embriyoların kumulus hücrelerine göre Bcl-2 gen ifadesinin anlamlı şekilde azaldığını göstermişler (17).

Mandalar üzerinde yapılan bir çalışmada farklı evrelerdeki kumulus-oosit komplekslerinin in vitro matürasyonu ve embriyo gelişimleri değerlendirilmiş. Anti-apoptotik Mcl-1 ve pro-apoptotik Bax genleri ve embriyolojik gelişim karşılaştırılmış. İyi kalitede olarak sınıflandırılan embriyoların kumulus hücrelerinin Mcl-1 gen ifadesi kötü kaliteli olarak sınıflandırılan embriyoların kumulus hücrelerinkine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş. Fakat Bax geninin ifadesi iyi kalitedeki embriyoların kumulus hücrelerinde, kötü kalitedeki embriyoların kumulus hücrelerinkine göre göreceli olarak düşük saptandı. Bu nedenlerle bu çalışmada erken evre embriyolarda apoptotik gen ifadesi düzeyinin kumulus oosit kompleksinin gelişimsel yeterliliğini tahmin etmek için bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği kanısına varıldı (42).

Tabibnejad ve ark.'nın 2018 yılında PKOS ve tubal faktör nedenli infertilite sebebiyle başvuran hastalarda "Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP nick end labeling" metodu ile yaptıkları çalışmada embriyo morfokinetiği ile kumulus hücrelerinin apoptozisi arasında hiçbir korelasyon bulamadı (40). Ancak, ICSI sonuçlarının kumulus hücrelerinin apoptozundan etkilendiğini gösterdiler. Yapılan diğer çalışmalarda da kumulus hücrelerindeki apoptozun oosit dejenerasyonu ve embriyo fragmentasyonun altında yatan bir süreç olduğu gösterildi. (10). Bizim çalışmamızda embriyo kaliteleri ile gen ifadeleri arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Fakat kaspaz-3 gen ifadesinin ve Bax/Bcl-2 oranının iyi kalitedeki embriyolarda daha düşük olduğu görülmüştür. Yaptığımız çalışmada kötü kalitedeki embriyoların kumuluslarındaki Bax ile Bcl-2 gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ($r=-0,233$) korelasyon saptanmıştır.

Kumulus hücrelerinin apoptozisi ve proliferasyonu sadece oosit gelişimi ve matürasyonunda değil, aynı zamanda folikül gelişimi ve atrezisinde de önemli rol oynar (34).

Hızlanmış apoptozis ve granüloza hücre kaybı intrafoliküler ortamı tehlikeye atabilir. Oositin ve sonuç olarak embriyonun kalitesini de etkileyerek muhtemel gebelik sayısını azaltır. Overyan stimülasyon infertilite tedavilerinin temelini oluşturur. Overyan stimülasyonun amacı kaliteli embriyolar oluşturmak için yeterli sayıda oosit elde etmek ve başarılı bir implantasyon ve canlı doğum oranını arttırmaktır. Loback ve ark yaptığı çalışmada IVF tedavisinde toplanan granüloza hücrelerinde apoptozla ilgili genlerin ifadelerinin gebeliği öngürüp öngörmediğini değerlendirmişler ve anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (10). Önceki başka bir çalışmada ovaryan stimülasyon uygulanan kadınların folikül sıvı havuzundan elde edilen granüloza hücrelerinde hesaplanan apoptotik indeks, tedavi siklusunda gebe kalan kadınlarda daha düşük saptanmış (14). Bizim çalışmamızda da Loback ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya bezer şekilde gebelik sonuçlarıyla gen ifadeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamıştır. Fakat gebelik pozitif hastalarda Bax ifadesinin azaldığı, Bcl-2 ifadesinin ise arttığı saptanmıştır.

SONUÇ

Kumulus hücrelerindeki kaspaz-3 ifadesinin ZOY hastalarda gebelik pozitifliğini düşürmesinin dışında apoptotik gen ifadesiyle fertilizasyon ve iyi kalitede embriyo geliştirme durumlarına etkisi saptanamamıştır. Fakat Bax ifadesinin ve Bax/Bcl-2 oranının immatür oosit kumuluslarında yüksek olması apoptotik sürecin kumulus-oosit bağlantısı varken başladığını bize göstermiştir.

KAYNAKLAR

- 1 Aktoz F, Mümüőođlu S. Kadın hastaya yaklaşım ve kadın infertilitesi nedenleri, tanı yöntemleri, Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Ed. Üremeye yardımcı tekneklere laboratuvar, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri 2019:137-142.
- 2 İrez T. ÜYTE uygulamalarının tarihçesi, mevcut yasal ve etik uygulamalar, Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Ed. Üremeye yardımcı tekneklere laboratuvar, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri 2019:1-8.
- 3 Ferraretti A, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response'to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. Human reproduction 2011;26(7), 1616-1624.
- 4 Oral E, Çitil İ. Ovulasyon indüksiyonuna aşırı (high responder) yanıt veren hastaların yönetimi, Çelik Ö. Ed. Adana: Nobel Kitapevi 2011:427-436.
- 5 von Mengden L, Klamt F, Smitz J. Redox biology of human cumulus cells: Basic concepts, impact on oocyte quality, and potential clinical use. Antioxidants & redox signaling 2020;32(8), 522-535.
- 6 Almeida CP, Ferreira MC, Silveira CO, Campos, JR, Borges IT, Baeta PG, et al. Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells—a review. Cell biology international 2018;42(10), 1276-1281.
- 7 Benifla JL, Sifer C, Bringuier AF, Blanc-Layrac, G, Camus E, Madelenat P, et al. Induced apoptosis and expression of related proteins in granulosa cells from women undergoing IVF: a preliminary study. Human Reproduction 2002;17(4), 916-920.
- 8 Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. Journal of Reproduction and Development 2012;58(1), 44-50.
- 9 Hennet ML, Combelles CMH. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. Int J Dev Bio 2012;56: 819–831.
- 10 Lobach VN, Casalechi M, Dela Cruz C, Pereira MT, Del Puerto HL, Reis FM. Caspase-3 gene expression in human luteinized granulosa cells is inversely correlated with the number of oocytes retrieved after controlled ovarian stimulation. Human Fertility 2019;22(1), 33-38.

- 11 Jančar N, Kopitar AN, Ihan A, Klun IV, Bokal EV. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2007; 24(2-3), 91-97.
- 12 Glamočlija V, Vilović K, Saraga-Babić M, Baranović A, Sapunar D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertility and sterility* 2005; 83(2), 426-431.
- 13 Clavero A, Castilla JA, Núñez AI, García-Peña ML, Maldonado V, et al. Apoptosis in human granulosa cells after induction of ovulation in women participating in an intracytoplasmic sperm injection program. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2003;110(2), 181-185.
- 14 Suh CS, Jee BC, Choi YM, Kim JG, Lee JY, Moon SY, et al. Prognostic implication of apoptosis in human luteinized granulosa cells during IVF–ET. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2002;19(5), 209-214.
- 15 Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Clinical assisted reproduction: cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF–ET. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2001;18(9), 490-49.
- 16 Kaneko T, Saito H, Takahashi, T, Ohta N, Saito T, Hiroi M. Effects of controlled ovarian hyperstimulation on oocyte quality in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2000;17(10), 580-585.
- 17 Famarzi A, Khalili MA, Jahromi MG. Is there any correlation between apoptotic genes expression in cumulus cells with embryo morphokinetics?. *Molecular biology reports* 2019;46(4), 3663-3670.
- 18 Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. (Çev. Polat S, Sencar L.) Üregenital sistem, Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG (Dalçık H. Çev. Ed.) İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 2016: 241-282.
- 19 Ross MH, Pawlina W. (Çev. Mete GA.) Dişi Üreme Sistemi, Ross MH, Pawlina W. (Baykal B. Çev. Ed.) Ankara: Palme 2013: 830-870.
- 20 Ma Y, Jin J, Tong X, Yang W, Ren P, Dai Y. ve ark. ADAMTS1 and HSPG2 mRNA levels in cumulus cells are related to human oocyte quality and controlled

ovarian hyperstimulation outcomes. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2020;1-11

21 Üstün YE. İnfertil Çiftin Değerlendirmesi, Çelik Ö. Ed. Adana: Nobel Kitapevi 2011: 129-136.

22 Haberal B, Güdeloğlu A. Erkek hastaya yaklaşım ve erkek infertilitesi nedenleri, tanı yöntemleri. Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Ed. Üremeye yardımcı tekniklerde laboratuvar, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri 2019: 143-148.

23 Dilbaz S, Demir B, Cinar O, Dede S, Aydın S, Beydilli G, ve ark. Does 75 IU difference improve the cycle performance in poor responders? Comparison of daily 375 versus 450 IU gonadotrophindoses. *Gynecological Endocrinology* 2011; 27(12), 1001-1006.

24 Martinez F, Barri PN, Coroleu B, Tur R, Sorsa-Leslie T, Harris WJ, et al. Women with poor responseto IVF have lowered circulating gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous and stimulated cycles. *Hum Reprod* 2002;17(3): 634–640.

25 Gohari Taban S, Amiri I, Asl SS, Saidijam M, Yavangi M, Khanlarzadeh E, et al). Abnormal expressions of ADAMTS-1, ADAMTS-9 and progesterone receptors are associated with lower oocyte maturation in women with polycystic ovary syndrome. *Archives of gynecology and obstetrics* 2019; 299(1), 277-286.

26 Madkour A, Bouamoud N, Kaarouch I, Louanjli N, Saadani B, Assou S, et al. Follicular fluid and supernatant from cultured cumulus-granulosa cells improve in vitro maturation in patients with polycystic ovarian syndrome. *Fertility and sterility* 2018; 110(4), 710-719

27 Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, et al. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. *New England Journal of Medicine* 1999; 340(3), 177-183.

28 Pandian Z, Gibreel A, Bhattacharya S. In vitro fertilisation for unexplained subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015; (11).

29 Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2011; 96(3):522-529.

- 30 Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration* 2008; 16(5), 585-601.
- 31 Lüleyp HÜ. Moleküler genetiğin esasları. Adana: Nobel Kitabevi, 2008:262-316.
- 32 Yüksel B, Handemir Kılıç S, Taşdemir N, Batioğlu S. Apoptosis ve kaspaz istemi. *Jinekoloji obstetrik ve neonatoloji tıp dergisi* 2009; 10:58.
- 33 Somfai T, Nguyen HT, Nguyen MT, Dang-Nguyen TQ, Kaneko H, Noguchi J, et al. Vitrification of porcine cumulus-oocyte complexes at the germinal vesicle stage does not trigger apoptosis in oocytes and early embryos, but activates anti-apoptotic Bcl-XL gene expression beyond the 4-cell stage. *Journal of Reproduction and Development* 2020; 2019-094.
- 34 Wu X, Fu Y, Sun X, Liu C, Chai, M, Chen C, et al. The possible FAT1-mediated apoptotic pathways in porcine cumulus cells. *Cell biology international* 2017; 41(1), 24-32.
- 35 World Health Organization. *World Health Organization Laboratory Manual for the Evaluation and Processing of Human Semen*, 5th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK;2010
- 36 Scott L. Analysis of fertilization. *Textbook of assisted reproductive techniques*. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001
- 37 Sakkas D. Evaluation of embryo quality: A strategy for sequential analysis of embryo development with the aim of single embryo transfer. *Textbook of assisted reproductive techniques*. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001
- 38 Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol*.1999; 11(3), 307-11
- 39 Pfaffl, MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 2001; 29(9), e45-e45
- 40 Tabibnejad N, Sheikha MH, Ghasemi N, Fesahat F, Soleimani M, Aflatoonian A. Association between early embryo morphokinetics plus cumulus cell gene expression and assisted reproduction outcomes in polycystic ovary syndrome women. *Reproductive biomedicine online* 2019;38(2), 139-151.

- 41 Mattioli M, Barboni B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus–oocyte complex. *Molecular and cellular endocrinology* 2000;161(1-2), 19-23.
- 42 Jeena LM, Kumar D, Rahangdale S, Singh AP, Sarkhel BC. Effect of cumulus cells of cumulus-oocyte complexes on in vitro maturation, embryonic developmental and expression pattern of apoptotic genes after in vitro fertilization in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal biotechnology* 2020;31(2), 135-141.
- 43 Fang Y, Deng S, Zhang J, Liu H, Li Y, Zhang X, et al. Melatonin-mediated development of ovine cumulus cells, perhaps by regulation of DNA methylation. *Molecules* 2018; 23(2), 494.
- 44 Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *MHR: Basic science of reproductive medicine* 2010;16(8), 531-538.
- 45 Jain, A, Jain T, Kumar P, Kumar M, De S, Gohain M, et al. Follicle-stimulating hormone–induced rescue of cumulus cell apoptosis and enhanced development ability of buffalo oocytes. *Domestic animal endocrinology* 2016;55, 74-82.
- 46 Zhang Y, Xu Y, Kuai Y, Wang S, Xue Q, Shang J. Effect of testosterone on the Connexin37 of sexual mature mouse cumulus oocyte complex. *Journal of ovarian research* 2016;9(1), 1-6.
- 47 Hasegawa J, Yanaihara A, Iwasaki S, Mitsukawa K, Negishi M, Okai T. Reduction of connexin 43 in human cumulus cells yields good embryo competence during ICSI. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2007;24(10), 463-466.
- 48 Heijnen EMEW, Eijkemans MJC, Hughes EG, Laven JSE, Macklon N, Fauser, BCJM. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Human reproduction update* 2006;12(1), 13-21.
- 49 Wei LN, Liang XY, Fang C, Zhang MF. Abnormal expression of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in stimulated oocytes during maturation from women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 2011;96(2), 464-468.
- 50 Huang X, Hao C, Shen X, Liu X, Shan Y, Zhang Y, et al. Differences in the transcriptional profiles of human cumulus cells isolated from MI and MII oocytes of patients with polycystic ovary syndrome. *Reproduction (Cambridge, England)* 2013;145(6), 597-608.

- 51 Wissing ML, Bjerge MR, Olesen AIG, Hoest T, Mikkelsen AL. Impact of PCOS on early embryo cleavage kinetics. *Reproductive biomedicine online* 2014;28(4), 508-514.
- 52 Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss IIIJF. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007;92(2), 705-713.
- 53 Fesahat F, Sheikha MH, Kalantar SM, Tabibnejad N, Firouzabadi RD, Saeedi H, ve ark. Developmental competence and apoptotic gene expression patterns of mature and immature human oocytes retrieved from controlled ovarian stimulation cycles. *Reproductive biology* 2018;18(1), 27-32.
- 54 Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne RAL, Thong KJ, De Sousa, PA, ve ark. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction* 2009;138(4), 629-637.
- 55 Fragouli E, Lalioti MD, Wells D. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Human reproduction update* 2014;20(1), 1-11.
- 56 Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royère D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Human reproduction* 2007;22(12), 3069-3077.
- 57 Braga DPAF, Setti AS, Turco EGL, Cordeiro FB, Cabral EC, Cortezzi, ve ark. Protein expression in human cumulus cells as an indicator of blastocyst formation and pregnancy success. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2016;33(12), 1571-1583.
- 58 Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Janssens R, Coucke W, ve ark. New candidate genes to predict pregnancy outcome in single embryo transfer cycles when using cumulus cell gene expression. *Fertility and sterility* 2012;98(2), 432-439.
- 59 Devjak R, Papler TB, Verdenik I, Tacer KF, Bokal EV. Embryo quality predictive models based on cumulus cells gene expression. *Balkan Journal of Medical Genetics* 2016;19(1), 5-12.

- 60 Borup R, Thuesen LL, Andersen CY, Nyboe-Andersen A, Ziebe S, Winther O, ve ark. Competence classification of cumulus and granulosa cell transcriptome in embryos matched by morphology and female age. *PloS one* 2016;11(4), e0153562.
- 61 Gebhardt KM, Feil DK, Dunning KR, Lane M, Russell DL. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and sterility* 2011;96(1), 47-52.
- 62 Haouzi D, Hamamah S. Pertinence of apoptosis markers for the improvement of in vitro fertilization (IVF). *Current medicinal chemistry* 2009;16(15), 1905-1916.
- 63 Warner CM, Cao W, Exley GE, McElhinny AS, Alikani M, Cohen J, ve ark. Genetic regulation of egg and embryo survival. *Human Reproduction* 1998;13(suppl_3), 178-190.
- 64 Corn CM, Hauser-Kronberger C, Moser M, Tews G, Ebner T. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertility and sterility* 2005;84(3), 627-633.
- 65 Bettegowda A, Patel OV, Lee KB, Park KE, Salem M, Yao J, ve ark. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biology of reproduction* 2008;79(2), 301-309.