

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KÜMÜLÜS HÜCRELERİ PROLİFERASYON VE
APOPİTOZ İNDEKSLERİNİN İNTRASİTOPLAZMİK
SPERM ENJEKSİYONU SONUÇLARIYLA
İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Biyolog Olcay ALPAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2009

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KÜMÜLÜS HÜCRELERİ PROLİFERASYON VE
APOPİTOZ İNDEKSLERİNİN İNTRASİTOPLAZMİK
SPERM ENJEKSİYONU SONUÇLARIYLA
İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Biyolog Olcay ALPAK

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2009

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. OOGENEZİS	5
4.1.1. Prenatal Dönem Oosit Gelişimi	5
4.1.2. Postnatal Dönem Oosit Gelişimi	5
4.2. OOSİT– FOLİKÜLER HÜCRE ETKİLEŞİMİ	8
4.3. HÜCRE SİKLUSU	10
4.3.1. PCNA	10
4.4. APOPİTOZ	11
4.4.1. Apoptozu Düzenleyen Dış ve İç Uyaranlar	12
4.4.2. Apoptozun Gen Regülasyonu	13
4.4.3. Apoptozun İndüklenmesi	13
4.5. OOSİT KALİTESİ	14
5. MATERYAL VE YÖNTEM	16
5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER	16
5.2. HASTA GRUBU	17
5.2.1. Hasta Grubu	17
5.2.2. Hastaların Hazırlanması	17
5.2.3. Oosit Aspirasyonu (OPU)	18
5.2.5. Oosit Denüdasyonu (Ayıklama, Soyma)	18
5.2.4. Semen Hazırlanması	19
5.2.6. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)	19
5.2.7. Fertilizasyon ve Bölünme Takibi	20
5.2.8. Transfer İşlemi	21
5.2.9. Gebelik Tayini	21
5.2.10. Kümüls Hücresinin Yayılması ve Fiksasyonu	21

5.2.11. Proliferasyon İndeksi	22
5.2.12. Apoptotik İndeks	22
5.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER	22
6. BULGULAR	23
7. TARTIŞMA	28
8. SONUÇ	31
9. TEŞEKKÜR	32
10. KAYNAKLAR	33

SİMGE VE KISALTMALAR

βHCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin / Human Corionic Gonadotropin
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz / Cyclin Dependent Kinase
CO₂	: Karbondioksit
CSF	: Koloni Uyarıcı Faktör / Colony Stimulating Factor
DAPI	: 4, 6 Diaminido 2 Phenylindole
DD	: Ölüm Domaini / Death Domain
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E₂	: Östradiol
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü / Epidermal Growth Factor
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon / Follicle Stimulating Hormone
G1	: Hücre Siklusu Birinci Büyüme Fazı
G2	: Hücre Siklusu İkinci Büyüme Fazı
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon / Gonadotropin Releasing Hormon
HMG	: İnsan Menopozal Gonadotropini / Human Menopausal Gonadotropin
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü / Insülin-like Growth Factor
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
LH	: Lüteinizan Hormon
M	: Hücre Siklusu Mitoz Fazı
MI	: Metafaz I Oosit
MII	: Metafaz II Oosit
NGF	: Nöron Büyüme Faktörü / Neuron Growth Factor
OPU	: Oosit Aspirasyonu / Oocyte Pick-up
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu / Phosphate Buffered Saline
PCNA	: Prolifere Hücre Nükleer Antijeni / Proliferating Cell Nuclear Antigen
S	: Hücre Siklusu Sentez Fazı
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü / Transforming Growth Factor
TNF	: Tümör Nekroz Faktör / Tumor Necrosis Factor
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü / Tumor Necrosis Factor Receptor
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü / World Health Organization

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 12.11.2007 tarih ve 2007/034 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi No: HE/0262007

1. ÖZET

Günümüzde yardımla üreme tekniklerini kullanan (IVF: İn vitro fertilizasyon, ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) hastaların gebelik oranı pek çok faktörün etkisi altındadır. Bu faktörlerden bazıları semen kalitesi, ovaryan stimülasyon tipi, östradiol (E₂) seviyeleri ve hasta yaşıdır. Bunlar oosit sayısını, kalitesini, matürasyon oranını ve embriyo gelişimini etkilemektedir. Oosit matürasyonun ilerlemesini ya da gecikmesini sağlayan kümülüs hücreleri, lokal ürünler aracılığıyla oositi etkileyerek proliferasyon ve apoptozda güçlü birer düzenleyici olarak rol oynamaktadırlar.

Bu çalışmada, kümülüs hücrelerinin proliferasyon ve apoptoz oranları belirlenip ≤ 37 yaş ve altı ile ≥ 38 yaş ve üstü olmak üzere iki gruba ayrılan hastalarda, mikroenjeksiyon sonuçlarıyla ilişkisi değerlendirildi.

Bu amaçla, mikroenjeksiyon uygulamasına tabi tutulan hastalardan toplanan kümülüs-oosit komplekslerinden alınan kümülüs hücrelerine, proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA) monoklonal antikoru uygulanarak proliferasyon indeksi tespit edildi. 4, 6 diaminido 2 phenilindol (DAPI) floresan boyası uyguladıktan sonra mikroskop altında morfolojik kriterlere göre apoptoz oranı belirlendi.

Elde edilen bulgulara göre, kümülüs hücrelerinin proliferasyon oranlarının ≤ 37 yaş ve altındaki grupta anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Kümülüs hücre apoptoz oranları değerlendirildiğinde ise her iki grup arasındaki fark anlamlı değildi. Proliferasyon ve apoptoz oranları tespit edilen gruplarda ayrıca oosit matürasyonu, fertilizasyon ve gebelik düzeyleri değerlendirildi. Toplanan oosit sayısı ve matürasyon oranlarının yanı sıra gebelik düzeylerinin kümülüs hücrelerinde yüksek proliferasyon indeksine sahip hastalarda anlamlı derecede artmış olduğu saptandı.

Çalışmamızda, mikroenjeksiyon uygulanan hastalarda kümülüs hücre proliferasyon oranlarının sağlıklı gebelik eldesi konusunda önemli bir parametre olan kaliteli oosit seçiminde kullanılabilecek potansiyel bir belirteç olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Proliferasyon, apoptoz, kümülüs, fertilizasyon, ICSI.

2. SUMMARY

Today, the pregnancy rate of the patients who used assisted reproductive technics (IVF, ICSI) is under the influence of numerous factors. Some of the factors are quality of semen, type of the ovarian stimulation, grade of estradiol (E_2) and age of the patients. These ones effect quantity and quality of the oocyte, rate of maturation and embryo development. Cumulus cells are a kind of strong regulator for ovarian cells in proliferation and apoptosis, effect oocyte by the local productions, manage maturation of oocyte.

In this study, we have determined rates of proliferation and apoptosis for cumulus cells, according to age of the patients that seperated to two groups as ≤ 37 and ≥ 38 and evaluated correlation among results of the microinjection.

Due to the aim, cumulus cells that were taken from cumulus-oocyte complex in the patients who are applied microinjection, proliferation index was determined by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) monoclonal antibody. According to morphologic criteria under the microscope rate of the apoptosis was determined after the 4, 6 diaminido 2 phenilindol (DAPI) fluoresan staining.

According to the findings, rates of proliferation of the cumulus cells were so high meaningfully for first group as ≤ 37 . When rates of apoptosis of the cumulus cells have evaluated, difference between two groups is not significant. Furthermore maturation of oocyte, fertilization and pregnancy rate have evaluated on the groups that were determined rates of the proliferation and apoptosis. It was determined that total oocyte number and maturation rates as well as pregnancy rates increased significantly for the patients who have high proliferation index on the cumulus cells.

In our study, we come to the conclusion that the proliferation rates of cumulus cells are a potentially indicator, will be applied for election of quality oocyte, which is a significant parameter in order to become healthy pregnant on the patients that are applied microinjection.

Key words: Proliferation, apoptosis, cumulus, fertilization, ICSI.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde yardımla üreme tekniklerinde, dışıden alınan oositlerin in vitro ortamda spermatozoalarla biraraya getirilmesi rutin olarak uygulanan bir yöntemdir. Mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon kontrolü ve embriyo gelişiminin takip edilmesi, implantasyon potansiyeli yüksek embriyoların seçilmesi ve transferi varsa artan embriyoların dondurulması başarıyla uygulanmaktadır.

Embriyo gelişiminin belirlenmesinde oosit kalitesinin önemi geniş ölçüde kabul edilmiştir. Yardımla üreme teknikleri sırasında, serum östradiol seviyelerinin ölçümü rutin olarak yapılmaktadır, bu da bize granüloza hücrelerinin sağlıklı, faal ve işler durumda olup olmadıklarına dair ipucu oluşturmaktadır (1, 2).

Ovulasyon öncesi foliküller, granüloza hücreleri ve kümülüs hücreleri içerirler. Kümülüs hücreleri, folliküler gelişim ve ovulasyon sırasında oositle yakın ilişki içinde olup, oosit gelişimi ve fertilizasyon için mediatör olarak rol oynamaktadırlar. Ovulasyon öncesi dönemde kümülüs hücrelerinin radial bir formda gelişimi, lüteinizan hormon (LH) pikinin ya da eksojen insan koryonik gonadotropin (HCG)'nin etkisinde olmaktadır. Bu tip bir kümülüs gelişimi fertilizasyon için en iyi aşamayı göstermektedir.

Gelişim sırasında kümülüs hücrelerinin salgıladığı hyaluronik asitçe zengin matriks, oosit ve kümülüsü beraber tutmakta ayrıca folikülün çatlamasını ve oviduktal fimbriyalar tarafından yakalanmasını kolaylaştırarak sperm penetrasyonuna ve fertilizasyona da izin vermektedir. Kümülüs gelişimi, in vivo normal oosit gelişimi için gereklidir (3).

Kümülüs hücreleri oosit matürasyonunda, matürasyonunun ilerlemesini ya da gecikmesini sağlayarak regülatör olarak önemli bir rol oynamaktadır. Kümülüs ve diğer folikül hücreleri, epidermal büyüme faktörü (EGF) ya da insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I, IGF-II) gibi lokal ürünler aracılığıyla oositi etkilemektedir. Bu faktörler, ovaryan hücrelerin proliferasyon ve apoptozunda güçlü birer düzenleyici olup, oosit matürasyonunu da stimüle ederler (4-8).

Ovaryan siklustaki folikül gelişimi, proliferasyon, diferansiyasyon ve folikül hücrelerinin ölümünü (apoptoz) içine alan kompleks bir süreçtir (5).

Oosit gelişiminin düzenlenmesi ve kontrolü, hem parakrin hem de endokrin faktörleri kapsamaktadır. Bu gelişiminin düzenlenmesinde, hormonların yanı sıra

(LH, FSH), büyüme faktörleri, sitokinler, inhibin-aktivin gibi faktörler de önemli rol oynamaktadır (9).

Büyüme faktörleri (IGF-I ve EGF), kümülüs hücreleri yoluyla oositi harekete geçirerek granüloza hücrelerinin gelişimlerinin düzenlenmesinde otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalar ile etki gösterirler. Bu mekanizmaların harekete geçmesi ise çoğunlukla hücre bölünmesiyle neticelenir (9, 10).

Çalışmamızda ICSI uygulanacak hastalardan toplanan kümülüs-oosit komplekslerinden alınan kümülüs hücrelerinde apoptoz ve proliferasyon indekslerinin saptanarak, oosit sayısı ve matürasyonu, fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarıyla ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. OOGENEZİS

Dişi germ hücrelerinin gelişip olgunlaşması sürecine oogenezis denir. İki evrede gerçekleşir:

1. Doğum öncesi (prenatal) evre
2. Doğum sonrası (postnatal) evre

4.1.1. Prenatal Evre

Primordiyal germ hücreleri ilk olarak dördüncü haftada epiblasttan köken alır ve vitellüs kesesi duvarında gözlenir. Gonad taslaklarına göç ederler ve bu sırada mitoz bölünmeyle sayıları artar (11). Dişi gonad taslaklarına gelen primordiyal germ hücreleri oogonyumlara farklılaşır. Oogonyumlar mitozla bölünerek sayılarını artırırlar ve bir kısmı büyüyerek primer oosite dönüşür ve deoksiribonükleik asit'leri (DNA) replike olur, birinci olgunlaşma bölünmesinin profaz evresine girerler. Tek katlı yassı epitel ile sarılmış bu yapı, etrafındaki ovaryuma ait stroma hücreleri ile birlikte primordiyal folikül olarak adlandırılır (11-14).

Üçüncü aydan itibaren bir iki ay içerisinde oogonyumların sayısı hızla artar ve beşinci ayda yedi milyona ulaşır. Bu dönemden sonra hücre dejenerasyonu ile oogonyum ve primer oositlerin sayısı son derece azalır (15). Yedinci ayda oogonyumların çoğu dejenere olur. Kalan primer oositlerin tümü birinci mayoz bölünmeye girer. Her biri tek sıra yassı folikül hücre tabakasıyla sarılır (16). Primordiyal foliküllerdeki primer oositler puberte dönemine kadar profaz evresinin diploten evresinde bekler (17).

4.1.2. Postnatal Evre

Doğumda primer oositlerin sayısı 700.000 ile 2 milyon kadardır. Puberteye yakın bu sayı 400.000'e düşer ancak bunların 400–450 kadarı kadının hayatı boyunca üreme

döngüsünde ovulasyonla atılabilir. Diğerleri çeşitli gelişim evrelerinde atretik foliküler haline gelir (11, 18).

Büyüme evresi puberte ile başlar. Puberteyi başlatan olaylar sonucunda hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılanır. GnRH, hipofiz bezinin ön lobundan folikül stimulan hormon (FSH) ve LH hormonlarının salgılanmasını sağlar (11). Bu iki hormon overlerdeki siklik değişikliklerin uyarılması ve ovaryan siklusun kontrolünden sorumludur.

FSH, ovaryan foliküllerin gelişimini ve folikül hücrelerinden östrojen salınımını uyarır.

LH, sekonder oositte birinci mayoz bölünmenin tamamlanmasını, ovulasyonun tetiklenmesini ve oluşan korpus luteumdan progesteron salgılanmasını sağlar (19).

Pubertenin başlamasıyla her ovaryal siklusta FSH'nin etkisiyle beş ile onbeş primordiyal folikül olgunlaşmaya başlar. Primordiyal foliküllerdeki oositler büyürler ve çevrelerindeki tek katlı yassı folikül epiteli, tek katlı kübik hale gelir ve mitoz ile çoğalarak çok katlı folikül epitelinin (granüloza hücresi) oluşturur. Bu yapı artık primer folikül olarak adlandırılmaktadır. Böylece bu dönemde FSH ve LH'nin etkisiyle primordiyal foliküllerden sırasıyla sekonder ve tersiyer foliküller gelişir. Gelişme ilerledikçe folikül hücreleri çoğalarak granüloza hücreleri adını alır (17).

Granüloza hücreleri ve onları çevreleyen stroma hücreleri (bağ dokusu) arasında bazal membran bulunur. Bu membranı çevreleyen bağ dokusu hücreleri teka folikülü olarak adlandırılır. Teka folikülü, içte teka interna, dışta teka eksterna olarak iki katmana ayrılır (11). Teka interna, bol miktarda kan damarı içerir ve buradaki bağ doku hücreleri daha sonra steroid sentezleyen hücrelere dönüşürler. Teka eksterna tabakası, sıkı bağ dokusu yapısı gösterir ve fibroblast benzeri yapılarını korurlar (16).

Sekonder ve tersiyer foliküller gelişirken, granüloza hücrelerinin çoğalmasıyla oosit etrafında çok tabakalı yapı oluşur. Granüloza hücreleri ile oosit, glikoprotein yapısındaki zona pellusidayı oluşturmak için oosit etrafına mukopolisakkaritler salgılar. Granüloza hücreleri ve oosit, neksus tipi bağlantılarla birbirlerine bağlıdır, bu durum düşük molekül ağırlıklı maddelerin oosit içerisine geçişine imkan sağlar. Aynı zamanda, oosit çevresindeki folikül hücrelerinin eldiven parmağı biçimindeki küçük sitoplazmik uzantıları, zona pellusidayı geçip oosit zarının mikrovilluslarıyla iç içe geçer. Bu yapısal düzenleme, düşük molekül ağırlıklı maddelerin geçişine ve parakrin sinyallerin iletimine

izin verir, bu yapı maddelerin folikül hücrelerinden oosite taşınmasında önem taşımaktadır (16, 20).

Gelişme ilerledikçe çoğalan granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar oluşmaya başlar. Bu sıvıya folikül sıvısı adı verilir ve hyalüronik asitten zengindir. Ayrıca yapısında steroid ve gonadotropik hormonları barındırır. Sıvı miktarı arttıkça içi sıvı dolu boşluklar birleşir ve at nalı şeklinde antrum adı verilen tek bir boşluk oluşur ve bu foliküle antral folikül adı verilir. Çoğalan granüloza hücreleri oositi folikülün bir köşesine iterler (17).

Gelişme ilerledikçe granüloza hücreleri oosite yakın bölgede çok tabakalı, folikülün diğer bölgelerinde tek ya da az tabakalı olarak gözlenir. Bu foliküle tersiyer folikül (graff follikül) adı verilir. Bu folikül iki tip hücre içerir. Oositin etrafını saran kümülüs hücreleri ve antrumu çevreleyip folikül periferinde yer alan mural granüloza hücreleri (21-25).

Tersiyer folikülde oosit kendini foliküle bağlayan hücrelerle birlikte folikülün içerisine doğru bir tepecik oluşturur. Bu yapıya kümülüs ooforus adı verilir. Bunun yanı sıra granüloza hücrelerinden oluşan ışınal düzenlenmiş tek tabakalı hücre grubu oositi çevreler. Bu tabakaya da korona radiata adı verilir.

Oositi foliküle bağlayan granüloza hücreleri arasında folikül sıvısı birikmeye başlar, hücreler arası bağlantı zayıflar ve oosit folikülle bağlantısını kopararak folikül içerisinde yüzmeye başlar. Yine bu aşamada tersiyer folikül ovaryum yüzeyinde çıkıntı yapar. Folikül duvarı incelir ve damarsız bir yapı kazanır. Teka interna hücreleri östrojenleri sentezlemektedir.

Folikül olgun hale gelince, birinci olgunlaşma bölünmesi, ovulasyondan az önce ya da ovulasyon sırasında tamamlanır. Birinci mayoz bölünmenin tamamlanmasıyla büyüklükleri farklı iki yavru hücre oluşur. Bunlardan biri sitoplazmanın büyük bölümünü alan oosit diğeri ise çok daha az sitoplazma içeren birinci kutup cisimciğidir. Kutup cismi perivitellin aralıkta yer alır (17).

Birinci mayozun tamamlanmasından hemen sonra, oosit dinlenme evresine geçmeden önce, hücre DNA çiftleşmesi olmadan II. mayoz bölünmeye girer. Oositte bölünme mekiği oluşup, kromozomlar metafaz plağına dizildiğinde ovulasyon gerçekleşir ve oosit dışarıya atılır. Oosit ancak bir spermatozoa tarafından döllenirse II. mayoz bölünme tamamlanır yoksa dejenere olur (26). Ovulasyonla atılan oosit bir miktar

granüloza hücresi ile sarılı olarak ovaryumu terk eder ve tuba uterinanın açık ucundan içeri alınır (17, 27).

İkinci olgunlaşma bölünmesi, ovulasyondan sonra tuba uterinada spermatozoonun oosite girişi yani fertilizasyon gerçekleşirse tamamlanır. İkinci olgunlaşma bölünmesi sonunda oosit ile ikinci kutup cisimciği de oluşur. Kutup cisimlerinin sitoplazmaları azdır, tam gelişmediklerinden olgun oositlere dönüşemezler ve dejenere olurlar (26).

Oositin büyümesi ve gelişimi boyunca foliküllerin %1'inden daha azı normal gelişimine devam eder, geriye kalan foliküller ovule olmadan foliküler gelişimin çeşitli aşamalarında atreziye giderler (25, 28). Atrezi, foliküler gelişimin her aşamasında meydana gelebilir ve farklı foliküler kompartmanlarda başlayabilir (29). Antral foliküllerde dört farklı hücresel kompartmanda apoptoz başlayabilir. Bunlar teka hücreleri, granüloza hücreleri, kümülüs hücreleri ve oositin kendisidir (25). Antral foliküllerde, granüloza hücrelerinin dejenerasyonu ile atrezi meydana gelir. Foliküler atrezinin sadece son aşamasında oosit, bu durumdan etkilenir. Buna karşın preantral foliküllerde hücre ölümü, sıklıkla oositte gözlenir (29). Antral foliküler atrezinin ilk sinyalleri, aromotaz aktivitelerini kaybedip apoptoza giden mural granüloza hücrelerinin dejenerasyonudur. Sonrasında ise teka hücrelerinin hipertrofiye girmesi ve androstenedion üretimlerini azaltması gelir. Kümülüs hücreleri ve oosit, yalnızca foliküler atrezinin en üst aşamasında etkilenir. Antral foliküler atrezi boyunca kümülüs hücreleri, aynı folikül içerisinde sağlıklı bir şekilde varlığını sürdürürken mural granüloza hücrelerinin apoptoza gitmeleri oldukça yaygındır (25).

Atretik foliküllerden farklı olarak ovulasyona yönlendirilmiş folikülerde, apoptotik sürecin aktif olmadığı gözlemlenir. Fakat ovulasyon ve fertilizasyondan sonra hücre ölümü süreçleri preimplantasyon boyunca aktive olur (30).

4.2. OOSİT – FOLİKÜLER HÜCRE ETKİLEŞİMİ

Ovaryan foliküllerin büyüme ve gelişmesi, granüloza hücrelerinin proliferasyon ve diferansiasyonu ile karakterizedir. Folikül gelişiminin erken aşamalarında granüloza hücrelerinin yavaş proliferasyonu belirgindir. Büyüyen foliküllerdeki granüloza hücreleri gonadotropin stimülasyonu ve artan miktarlarda östradiol salınmasına yanıt verirler. Başlangıç fazında gonadotropin ve östradiol etkisine maruz kalmayla beraber, granüloza

hücrelerinin proliferasyonunda artış görülür (31). Son fazda ise, foliküler gelişmeye östradiolün maksimal üretimi ile karakterize, azalmış hücre proliferasyonu eşlik eder ve bununla birlikte foliküllerin büyük bir çoğunluğu, baskılanmış DNA sentezi ve granüloza hücre proliferasyonu ile karakterize olan atrezi sürecine girerler (32).

Foliküller, kümülüs hücreleri ve teka hücreleri ile bir gamet hücresini ya da bir başka deyişle oositi kapsamaktadır. Eğer folikül gelişmeye devam eder ve atreziye gitmezse oosit komponentleri yeni bir düzenlenmeye gider ve fertilizasyona hazır hale gelir.

Oosit gelişiminin çeşitli aşamalarında oosit morfolojisinde, fizyolojisinde ve onu çevreleyen kümülüs hücrelerinde çeşitli değişiklikler olmaktadır. Granüloza hücrelerinin ve özellikle kümülüs hücrelerinin fonksiyonu, oosit matürasyonu ile oldukça yakından ilgilidir (21, 33).

Granüloza hücreleri için iki ana fonksiyon tanımlanmaktadır. Birinci fonksiyon, ovulasyon başlangıcında ve sonrasında oositin bütünlüğünün korunmasına yardım edilmesi ve beslenmesidir. İkinci fonksiyon ise ovulasyon sonrasında folikül gelişirken özellikle teka lutein hücrelerinin östrojen etkisi altında başlıca progesteron olmak üzere steroid hormon üretmesidir (34).

LH piki, siklusun ortasında ovaryan foliküllerde ovulasyon için bir seri kritik değişiklik başlatır (6, 35). Normal ovulasyon, steroidogenez, kümülüs hücre büyümesi ve oosit matürasyonu gibi birçok kritik değişiklikte rol oynar (36). LH stimülasyonu, ovulasyon indüksiyonuyla mayozun tekrar başlamasına neden olur, mRNA ve proteinlerin ekspresyonuna eşlik eder, oositi çevreleyen kümülüs hücrelerindeki salgılayıcı özellikler değişir (37). Şaşırtıcı bir olay da, foliküllerdeki LH etkisidir. LH reseptörlerinin ekspresyonu mural granüloza hücreleriyle sınırlandırılmıştır. LH'nin tüm bu önemli etkilerine rağmen kümülüs hücreleri ve oositler ya birkaç tane LH reseptörü içerir ya da hiç içermezler ve direkt LH stimülasyonuna duyarsızdırlar (35, 38, 39).

Memeli ovaryum foliküllerinde, ovulasyonun gerçekleşmesi için gonadotropinlerin preovulatuvar artışını izleyen iki önemli olay gerçekleşmektedir. Oositin mayotik maturasyona devam ederek tamamlaması ve oositi çevreleyen kümülüs hücrelerinin gelişimi. Kümülüs hücrelerinin morfolojisinde çarpıcı bir değişim meydana gelir. Bu değişiklik hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve başlıca aktin mikofilamentlerinin toplanmasını içeren geniş kapsamlı değişikliklerdir. Bu değişimi hyaluronik asitçe zengin

ekstraselüler matriks sentezinin artışı (24, 40) ve kümülüs hücreleri ile oosit arasındaki neksus tipi bağlantıların değişimi izler (21). Muhtemelen, bu gelişimle ovulasyon sırasında foliküllerden oosit-kümülüs kompleksinin salınmasının kolaylaştırılması, oviduktal fimbriyalar tarafından yakalanması, oviduktlardan geçiş ve ovule olmuş oositin oviduktlarda canlılığının korunması sağlanır. Kümülüsün gelişmesi ayrıca, sperm aktivasyonu ve motilitesi için uygun dış şartların oluşumuna katkı sağlar (41).

4.3. HÜCRE SIKLUSU

Hücre siklusu, hem iç hem de dış büyüme faktörleri tarafından düzenlenir.

Hücre proliferasyonu, yeni fertlerin meydana gelmesi, büyüme, yenilenme ve eşey hücrelerinin oluşmasını sağlar.

Hücre siklusu iki faza ayrılır: Mitoz ve interfaz. İnterfaz evresinde üç alt evreye bölünerek incelenir.

M evresi: Bu evre, hücre nükleusunun ikiye ayrıldığı karyokinez ve iki kardeş hücrenin oluştuğu sitokinez aşamalarını kapsar.

G1 evresi: Mitoz ile DNA replikasyonunun başlaması arasındaki süreci oluşturan Gap 1 (G1) evresidir. Hücre, G1 boyunca metabolik olarak aktiftir ve DNA'sını kopyalamaksızın sürekli büyür.

S evresi (sentez) : DNA replikasyonu yer alır.

G2 evresi: DNA sentezinin tamamlandığı, hücre büyümesinin devam ettiği ve mitoz hazırlık için proteinlerin sentezlendiği evredir (42, 43).

4.3.1. PCNA

Proliferatif hücre nükleer antijeni, 36 kDa ağırlığında türler arasında iyi korunmuş, hücre siklusu için temel bir düzenleyicidir. DNA sentezi sırasında DNA hasarlarının onarılması ve S fazında DNA polimeraz delta için ko-faktör olarak işlem gördüğü gösterilmiştir.

Hücre siklusunun G1 fazında ekspresyonu başlar, en yüksek seviyeye S fazında ulaşır ve G2/M fazında da azalır (32, 44).

p21 proteini, siklin bağımlı protein kinaz düzenleyicisidir. p21, DNA polimeraz deltanın bir alt birimi olan PCNA'ya bağlanır. Böylece p21, DNA hasarı ile uyarılan hücre döngüsü duraklatılmasında ikili rol oynar, hücre döngüsünü sadece CDK'lar (cyclin dependent kinase/siklin bağımlı kinaz) aracılığıyla değil aynı zamanda S evresindeki hücrelerin DNA replikasyonunu doğrudan baskılayarak da durdurmaktadır (44-46).

PCNA, tüm bu özellikleriyle proliferen hücrelerin incelenmesi amacıyla tercih edilen bir belirteçtir (42, 44).

4.4. APOPTOZ

Apopitoz, programlanmış hücre ölümü, normal fizyolojik şartlar altında meydana gelen bir hücre ölüm şeklidir. Apopitoz boyunca artık ihtiyaç duyulmayan ya da fonksiyonları bozulmuş hücreler organizmadan uzaklaştırılırlar. Bu süreç normal embriyolojik gelişim ya da ovaryumdaki foliküler atrezide olduğu gibi olağan fizyolojik süreçlerde meydana gelebilir. Apopitozda hücrenin kendisi aktif olarak rol oynar, hücreler kendi iç otonom mekanizmalarına göre programlanmış ölümü gerçekleştirirler. Apopitoz hücre membran bütünlüğünün korunduğu, kontrollü bir ölüm şeklidir. Böylece komşu hücrelere zarar vermeksizin ölür.

Diğer bir hücre ölüm mekanizması nekrozdur. Nekroz patolojik bir süreçtir ve plazma membranını zedeleyen ya da hücreye zarar veren, uygun olmayan fiziksel ya da kimyasal koşullarda (hipoksi, hipotermi, toksinlere maruz kalma, viral invazyon) meydana gelir. Hızlı mitokondri şişmesi ve hasarı, plazma membranının homeostazisini kaybetmesiyle fonksiyonunun bozulması, hücre şişmesi ve lizisi bu sürecin en karakteristik özellikleridir (47).

Hücre hasarının bir sonucu olarak hücre membranının zarar görmesi ve enerji depolarındaki ani azalma ekstraselüler iyonlar ve suyun girişine izin verir. Mitokondrilerin şişmesiyle hücre membranı bütünlüğünü kaybeder. Plazma membranın parçalanmasıyla lizozomal enzimleri içeren sitoplazmik yapı hücre dışına yayılır. Böylece nekrotik hücre ölümü doku zararına ve şiddetli inflamatuvar yanıtı sebep olur (48-50).

Apopitoz, çeşitli içsel ve dışsal sinyaller tarafından aktive edilir. Apopitoza giden hücreler karakteristik morfolojik ve biyokimyasal özellikler gösterirler.

DNA fragmantasyonu, nukleusta meydana gelen hücreyi ölüme iten geri dönüşümsüz bir olaydır. DNA fragmantasyonu, Ca^{2+} ve Mg^{2+} bağımlı endonukleazlarla DNA'nın 180-200 baz çiftlik küçük oligonükleozomal fragmentlere, bölünmesiyle gerçekleşir. Nukleus, nükleer kromatinin kümelenmesi ile nükleer zar tarafından sınırlandırılarak birkaç fragmente bölünür (43, 51).

Hücre hacminde azalma sitoplazmanın büzülmesiyle gerçekleşir. Hücre iskeletine ait elemanlar hücre yüzeyine paralel yığılarak yeniden organize olurlar. Ribozomlar sitoplazma içinde kümelenirler, granüllü endoplazmik retikulum konsantrik sarmal yapılar olarak izlenir.

Mitokondriyal fonksiyonların kaybı mitokondriyal membran kanallarının geçirgenliğindeki değişimlerin bir sonucudur. Mitokondri bütünlüğü bozulur; elektron transport zinciri yıkılır. Sitokrom c gibi proteinler, kaspaz adı verilen proteolitik enzimleri aktive etmek amacıyla intermembranöz boşluktan sitoplazma içerisine salınırlar. Sitokrom c'nin salınımı Bcl-2 proteinlerinin etkisi altında gerçekleşir.

Hücre membran bleblerinin oluşması, hücre membran değişiklikleri sonucu meydana gelir. Bu değişiklik sitoplazma yüzeyinden plazma membranının dış yüzeyine belirli moleküllerin (fosfolipidlerin) yer değiştirmesine bağlıdır. Plazma membranındaki fiziksel ve kimyasal değişiklikler membran bütünlüğü bozulmadan bleblerin oluşmasına öncülük eder.

Apoptotik cisimlerin oluşması, son basamaktır. Bu membranla çevrili veziküller organel ve nükleik materyal içerirler. Hızlıca fagosite edildikleri için inflamatuvar yanıt oluşmaz (52, 53).

4.4.1. Apoptozu Düzenleyen Dış ve İç Uyaranlar

Apoptotik süreç, hücreye gelen dış uyaranlar ya da çeşitli iç sinyaller yoluyla tetiklenebilir (48).

Apoptozu tetikleyen dış uyaranların bazıları şu şekilde sıralanabilir: Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, tümör nekroz faktör (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), Fas/FasL sisteminin aktive olması, serbest radikaller, ultraviyole, ilaçlar ve çeşitli antijenler.

İç uyaranlar arasında ise onkogenler, p53 gibi tümör süpressörler ve beslenme yetersizliği sayılabilir (51).

4.4.2. Apoptozun Gen Regülasyonu

Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı p53 genini aktive eder. p53 proteini, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir.

Ayrıca p53'e bağlı hücre döngüsünün G1'de durması için p21 gereklidir (54).

Apoptozun regülasyonunda önemli bir rol oynayan Bcl-2/Bax gen ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik olmak üzere iki bölüme ayrılır. Hücrenin canlılığını sürdürebilmesi, bu ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin oranına bağlıdır (47, 55). Bcl-2 mitokondri dışı membranında bulunur ve iyon geçişini düzenler. Bax ise sitoplazmada bulunur ve apoptotik bir sinyal alınması halinde mitokondri membranına yerleşerek por oluşumunu sağlar (55).

Kaspazlar, sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzim olup apoptoz için gereklidirler. Tüm hücrelerde inaktif pro-enzim halinde bulunurlar (56). Apoptozun son devresindeki hücresel substratların degradasyonundan sorumlu olup, apoptozun başlatılmasında da kritik önemleri vardır (57).

4.4.3. Apoptozun İndüklenmesi

Fas (APO-1, CD95 olarakta adlandırılır) ve TNFR (tümör nekroz faktör reseptörü) hücre ölüm reseptörleri olarak adlandırılır ve hücre membranında bulunurlar (58). Fas ve TNFR ligantlarıyla ölüm domainleri (DD, death domain) olarak adlandırılan bir proteine bağlanırlar ve bu proteinler sitoplazma ile interaksiyon sağlar. Bu ölüm domainlerini içeren protein yapıları, kaspaz 8'in aktivasyonu ile direk olarak apoptozun başlamasına neden olurlar (47, 48, 50, 57).

4.5. OOSİT KALİTESİ

Yardımla üreme tekniklerini kullanan hastaların gebelik sonuçlarını etkileyen birçok önemli faktör bulunmaktadır. Bunlar arasında infertilite nedeni, hasta yaşı, ovaryan stimülasyon tipi ve östradiol seviyesi gibi faktörler yer almaktadır. Bu faktörler gelişen oosit sayısı ve kalitesini, oosit matürasyonunu, fertilizasyon hızını ve transfer edilen embriyo sayısını etkilemektedir. Oosit kalitesi, başarılı bir fertilizasyon ve implantasyonun belirlenmesinde tek başına önemli bir faktördür. Gebelik oranını etkileyen diğer önemli faktörler arasında transfer edilen embriyo sayısı ve kalitesi görünmektedir (2, 59). Yardımla üreme teknikleri alanında, dişi infertilitesinde oosit kalitesinin anahtar bir rol olarak görev yaptığı ve giderek de öneminin arttığı anlaşılmıştır (2, 60). Artan anne yaşının oosit kalitesine ve erken embriyo gelişimine negatif bir etkisi olduğu da kesin olarak görülmüştür (1, 22).

İleri yaşlarda görülen menopoz dişilerde, üreme potansiyelinin kaybına neden olur. İleri yaşlara kadar aktif halde kalan spermatogeneze zıt olarak dişi infertilitesinde, perinatal periyod boyunca ovaryumda oluşan primordial foliküllerin rezervi ve kalitesi azalır. Germ hücre stokları, ergenlik sonrası dönemde yetişkin hayatı boyunca tüketilir ve bu hücreler menopoza kadar neredeyse tükenmiş olur. Menopozu destekleyen faktörler, ileri yaşlardaki bayanlarda bir yandan da oosit kaybında çok önemli rol oynarlar (22).

Oosit kalitesi için en elverişli ve non-invaziv analiz, özellikle kümülüs-oosit kompleksini ve oosit morfolojisini değerlendirme temeline dayanır (2). Kümülüs hücreleri, foliküler gelişim boyunca oositle işbirliği içerisinde olup oositin etrafını çevreler ve ovulasyondan sonra kümülüs hücrelerinde meydana gelen apoptozis artışına bağlı olarak da oosit kalitesine etki ederler (59). Oositte meydana gelen apoptozis de, oosit gelişim kapasitesi ve oosit kalitesinin belirlenmesinde iyi bir belirteç olarak kullanılabilir.

Oositin intrinsek gelişim potansiyeli, oosit kalitesini yansıtmaktadır. Bu biyokimyasal ve moleküler yapı, olgun oositin fertilize olabilmesine ve gelişerek sağlıklı bir embriyoya dönüşmesine müsaade eder. Bununla birlikte oositin gelişimsel potansiyeline etkide bulunan çevresel faktörlerin, embriyo ve fetusların gelişimlerini de etkilediği bilinmektedir (22).

Memelilerde oosit büyüme ve gelişmesi, germ hücreleri ile somatik hücrelerin ilişkisine bağlıdır. Oosit gelişiminin kökeni, farklılaşmamış granüloza hücrelerinin

bağlantılı olduğu oositlerin bulunduğu preantral foliküllerde başlar. Kümülüs hücreleri, neksus bağlantılarıyla kümülüs-oosit adı verilen kompleks yapıyı oluştururlar. Neksus tipi bağlantılar, kümülüs-oosit hücreleri ile kümülüs-kümülüs hücreleri arasında düşük moleküler ağırlıktaki maddelerin transferine izin verir. Folik ldeki bu birliktelik, fertilite ve gelişim için oldukça gereklidir (60).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

ÜRÜN	MARKA	KATALOG NO
Quinn's Advantage Fertilization Medium	Sage	ART - 1020
Quinn's Advantage Protein Plus Cleavage Medium	Sage	ART - 1526
Quinn's Advantage Blastocyt Medium	Sage	ART - 1029
Quinn's Advantage Medium w/HEPES	Sage	ART -1023
Quinn's Sperm Washing Medium	Sage	ART - 1006
PureCeption 100% Isotonic Solution	Sage	ART - 2100
Hyaluronidase 80 U/mL in Hepes-HT	Sage	ART - 4007-A
Human Serum Albümin 100mg/mL in Normal Saline	Sage	ART - 3001
Quinn's Advantage SPS Serum Protein Substitute	Sage	ART - 3010
Oil for Tissue Culture	Sage	ART - 4008-5
ICSI	Vitrolife	10111
Earle's Balanced Salt Solution	Sigma	E2888
Mineral oil	Sigma	M5310- 1L
Histostain Plus, Broad Spectrum AEC	Zymed	85 - 9943
AEC Substrat Kit	Zymed	00 - 2007
NaCl	Atabay	AT091-950
Na ₂ HPO ₄	Riedel-de Haen	81890
KH ₂ PO ₄	Riedel-de Haen	81890
Anti-PCNA antikoru	Santa Cruz	Sc-56
DAPI (4, 6 Diaminido 2 Phenylindole)	Sigma	D9542

5.2. HASTA GRUBU

5.2.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza Aralık 2007 ve Temmuz 2008 tarihleri arasında infertilite tedavisi için başvuran ve mikroenjeksiyon işlemi uygulanan 45 hasta dahil edilmiştir. Çalışma grubuna sperm konsantrasyonu ve hareketliliği normal ve normale yakın değerlere sahip olan erkek bireylerin bulunduğu çiftler dahil edildi.

Hastalardan mikroenjeksiyon işleminin planlandığı gün, oosit aspirasyonu (OPU: oocyte pick-up) işlemi sonrası elde edilen kümülüs-oosit kompleksinden alınan kümülüs hücreleri kullanıldı ve kadın hastalar yaşlarına göre 37 yaş altı ve üstü olmak üzere iki gruba ayrıldı.

5.2.2. Hastaların Hazırlanması

Kontrollü ovaryan stimülasyon, GnRH analoglarından agonist (Lucrin; Abbott, Fransa) veya antagonisti (Cetrotide; Serono, Aubonne, İsviçre, Orgalutran; Organon Oss Hollanda) eşliğinde insan menopozal gonadotropinleri (HMG; Pergonal; Serono, Aubonne, İsviçre, Humegon; Organon Oss Hollanda) veya rekombinant folikül stimülan hormonların (FSH) (Gonal-F; Serono, Aubonne, İsviçre, Puregon; Organon Oss Hollanda) birlikte kullanımlarını içeren protokoller ile gerçekleştirildi. Fazla sayıda oosit elde etmek için ovaryumları stimüle edilen hastaya, folikülleri yeterli büyüklüğe ulaştığında ve östrojen seviyesi istenilen düzeye geldiğinde oosit matürasyonunu sağlamak için insan koryonik gonadotropini (HCG, Pregnyl, Organon, Hollanda) veya rekombinant koryonik gonadotropin (Ovitrelle, Merck Serono, İsviçre) enjeksiyonu uygulandı.

Overlerin tedaviye verdiği yanıt, ultrason taramaları ve serum östradiol seviyelerinin ölçülmesiyle takip edildi. Folikül çapı en az 18 mm çapına ulaştığında hastalara ovulasyon için 5000 ya da 10 000 IU HCG verildi (61).

5.2.3. Oosit Aspirasyonu (OPU)

Oosit aspirasyonu HCG yapıldıktan 35-36 saat sonra transvajinal ultrason eşliğinde yapıldı. Aspirasyonda Labotect (Model 4014, Almanya) markalı aspirasyon cihazı ile tek lümenli (Wallace ON 1633, Meksika) veya çift lümenli (Swemed 14105, İsveç) OPU iğneleri kullanıldı. Foliküller Earl's Balance Salt Solution (E2888, Sigma, Amerika) medyumunu kullanılarak tek tek aspire edildi ve steril tüplere (Falcon 2003, B.D., Fransa) toplanan folikül sıvıları embriyoloji laboratuvarında stereo mikroskop altında (Nikon SMZ 1000, Japonya) incelendi. Toplanan kümülüs-oosit komplekslerinden temiz (kansız) ve uygun olanların kümülüs hücreleri ayrıştırıldı. Daha sonra hastaya ait oositler ve deneyde kullanılacak kümülüs hücreleri farklı kaplardaki medyum içerisine (Quinn's Advantage Fertilization Medium, Sage, Amerika) aktararak inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) bekletildi (62).

5.2.4. Oosit Denüdasyonu (Ayıklama, Soyma)

Oosit toplama işleminden sonra 2-3 saat inkübe edilen kümülüs-oosit komplekslerinin ICSI işlemine hazırlanması için oositlerin etraflarındaki kümülüs ve granüloza hücreleri ayıklandı. Denüdasyon işlemi enzimatik ve mekanik olmak üzere iki aşamalı olarak uygulandı. Enzimatik ayıklamada kümülüs-oosit kompleksinin dışında bulunan kümülüs hücreleri daha önce hazırlanmış hyaluronidaz enzimi (Hyaluronidase 80 U/mL in Hepes-HT, Sage, Amerika) içeren medyum içerisine (Quinn's Advantage Medium w/HEPES, Sage, Amerika) koyularak işleme tabi tutuldu. Mekanik ayıklamada ise oositin hemen dışındaki granüloza hücreleri inceltirilmiş pastör pipeti ile kısmen temizlendi. Ayıklama işlemi bittikten sonra oositler medyum içine (Quinn's Advantage Fertilization Medium, Sage, Amerika) aktarıldı, stereomikroskop altında olgun olanlar MII (Metafaz II) oositler ayrıldı ve ICSI işlemine kadar inkübatörde bekletildi.

MII evresindeki oositler, kutup cisimciğini atmış, işleme uygun oositler olarak değerlendirildi. MI evresindeki kutup cisimciğini henüz atmamış oositler olgunlaşmamış olarak değerlendirildi ve takip edilerek MII safhasına ulaşanlara işlem yapıldı. Germinal vesikül içeren olgunlaşmamış oositler ise işleme tabi tutulmadı (63).

5.2.5. Semen Hazırlanması

Semen örnekleri mastürbasyon yoluyla steril plastik kaplara alındı. 37°C'lik inkübatörde likefiye olana kadar bekletildikten sonra Makler sayma kamerasında (Sefi Medikal Inst., Haifa, Israel) faz-kontrast mikroskobu (Nikon Eclipse E-200, Japonya) altında incelendi. Konsantrasyon ve motilite dünya sağlık örgütü (WHO) kriterlerine göre değerlendirildi. ICSI işleminde kullanılmak üzere semen örneğinin tamamı farklı yoğunlukta gradient solüsyonlarıyla (PureCeption 100% Isotonic Solution, Sage, Amerika) işleme tabi tutuldu.

Daha önce %90 ve %50 konsantrasyonunda hazırlanan solüsyon oda ısısına getirildikten sonra, bir tüpe (Falcon 2095 B.D., Fransa) sırasıyla önce %90'lık daha sonrada %50'lik solüsyon koyularak birbirine karışmayan iki tabaka oluşturuldu. Bu tabakaların üzerine likefiye olmuş semen örneği koyulduktan sonra 1300 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi (Sigma 2-16, Amerika). Pellet pipet yardımıyla alındı ve başka bir tüpe (Falcon 2003 B.D., Fransa) aktarıldı. Üzerine 4 ml medyum (Quinn's Sperm Washing Medium, Sage, Amerika) eklenerek 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bir pipet yardımıyla alınarak üzerine tekrar 4 ml medyum (Quinn's Advantage Fertilization Medium, Sage, Amerika) eklendi ve tekrar 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınıp kalan solüsyon çalkalanarak karıştırıldı ve bir kültür tabağına yayılarak üzeri yağla kaplandı ve kullanılana kadar beklemek üzere inkübatöre kaldırıldı (64).

5.2.6. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

Mikroenjeksiyon işlemi; ısıtıcı tabla, Hoffman modülasyonu ve Narishige (MMO 202 ND) mikroenjeksiyon ünitesi ataçmanlı bir inverted mikroskopta (Nikon Eclipse TE 2000-U, Japonya) 40X objektif altında gerçekleştirildi.

Spermeleri yavaşlatmak için visköz yapıda bir madde olan polivinilpirolidon (PVP) (ICSI, Vitrolife, İsveç) damlası içine bir miktar sperm bırakıldı ve daha sonra bir enjeksiyon pipeti (MIC-35-30, Humagen, Amerika) yardımıyla motil ve morfolojik olarak normal görünümlü spermatozoa seçilerek hareketsizleştirildi. Enjeksiyon pipetine çekildi, oosit tutucu pipet (Matchmaker, Türkiye) yardımıyla kutup cisimciği saat 12 hizasında olacak şekilde sabitlendi ve spermatozoa oosit sitoplazmasına bırakıldı. Sırasıyla bütün

oositler için aynı işlem gerçekleştirildi. Enjekte edilmiş oositler kültür medyumuna (Quinn's Advantage Protein Plus Cleavage Medium, Sage, Amerika) aktarıldı ve bundan sonra kültür süresince kalacakları 37°C , %5 CO₂ ve %5 O₂ ortam sağlayan inkübatörlere (Binder, CB 210 ve 150, Almanya; Thermo 3141, Amerika) kaldırıldı (65, 66).

5.2.7. Fertilizasyon ve Bölünme Takibi

Mikroenjeksiyon işleminden 16-18 saat sonra invert mikroskopta pronükleus kontrolü yapıldı. Fertilizasyon, iki pronükleusun varlığı olarak değerlendirildi ve normal fertilize olan oositler bir gün önce hazırlanmış yeni medyum (Quinn's Advantage Protein Plus Cleavage Medium) içerisine aktarıldı.

Oluşan embriyo sayısı ve hastanın özellikleri dikkate alınarak embriyo transfer günleri tespit edildi. 2. ve 3. gün transfer edilecek embriyoların gelişimleri kontrol edilerek morfolojik sınıflaması (hücre sayısı, fragmentasyon, multinukleasyon, hücre büyüklükleri vb.) yapıldı ve işlem gerçekleştirildi. Transferi 5. gün planlanan ve blastosist aşamasına kadar takip edilecek vakalarda embriyolar 3. gün farklı bir medyum (Quinn's Advantage Blastocyt Medium, Sage, Amerika) içerisine aktarıldı.

Embriyoların değerlendirilmesinde kullanılan sınıflama sistemi ve kriterleri:

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

Grade 2: Eşit blastomere sahip, <%5-10 oranında fragmentasyon veya granülasyon gösteren embriyo.

Grade 3: Eşit olmayan blastomere sahip, <%10-20 oranında fragmentasyon gösteren veya granülasyon gösteren embriyo.

Grade 4: Blastomerleri birbirinden tamamen farklı, blastomer sayısı tam olarak tespit edilemeyen, ileri derecede fragmentasyona sahip veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo (67, 68).

5.2.8. Transfer İşlemi

Hastaların özelliklerine bakılarak embriyo transferi 2. ve 3. gün bölünmüş embriyo veya 5. gün blastosist aşamasında gerçekleştirildi. Embriyo sayısı ve transfer günü seçiminde hasta yaşı, embriyo sayısı ve kalitesi, infertilite sebebi ve süresi gibi etkenler göz önünde bulunduruldu.

Embriyo transfer işlemi stereomikroskop altında 4 kuyucuklu kültür tabağı (Nunc 4 well, 176740, Danimarka) içine konulan gazı dengelenmiş blastosist medyum ile gerçekleştirildi. Embriyo transfer kateteri (K-JETS 7019, Cook, Avustralya) medyumla doldurulduktan sonra enjektör (Hamilton 1705 LT, İsviçre) yardımıyla steril eldiven ile ve genel sterilizasyon kurallarına uyularak embriyolar kateterin içine yerleştirildi. Kateter bu şekilde jinekoloğa teslim edildi ve ultrason eşliğinde embriyolar anne adayının uterusuna aktarıldı (69).

5.2.9. Gebelik

Gebelik testi için transfer işleminden 12 gün sonra kanda HCG değerine bakıldı. HCG değerinin ≥ 15 mIU/ml olması pozitif değer olarak kabul edildi ve bu test iki gün sonra tekrarlandı. Değerin iki katına çıkmış olması biyokimyasal gebelik, bu testten 15 gün sonra ultrasonda gestasyonel kesenin görülmesi ise klinik gebelik olarak tanımlandı.

5.2.10. Kümülüs Hücrelerinin Yayılması ve Fiksasyonu

Kümülüs-oosit komplekslerinden ayrılan kümülüs hücreleri işlem esnasında medyumda (Quinn's Advantage Fertilization Medium, Sage, Amerika) toplandı. İşlem bittikten sonra toplanmış olan kümülüs hücreleri fiziksel parçalanma işlemi için toplandıkları medyumdan alınıp boş bir petriye (Falcon 3004, B.D., Fransa) aktarıldı, üzerine yine aynı medyum eklenerek insülin enjektörü yardımıyla parçalandı. Daha sonra 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı, pelletteki hücreler bir pipet ucu yardımıyla 12 mm'lik 2 lamele yayılarak kurutuldu. Absolü metanolle 5 dakika fikse edildi (70).

5.2.11. Proliferasyon İndeksi

Lameller üzerine yayılmış ve metanolle fikse edilmiş kümülüs hücreleri fosfat tampon solüsyonu (PBS) yıkamalarını takiben spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için non-immün serumla 20 dakika bloke edildi. Anti-PCNA primer antikoru uygulanarak gece boyunca 4°C’de bekletildikten sonra sırayla streptavidin ve biyotin sekonder antikolarıyla 20 dakika inkübe edildiler. Aminoetilkarbozol kromojen uygulandıktan sonra zıt boyama olarak hematoksilen uygulandı. Tüm işlem aralarında PBS yıkamaları tekrarlandı.

Proliferasyon indeksi, spesifik renk reaksiyonu veren ve hücre siklusunun farklı evrelerinde olduğu belirlenen hücrelerin toplam hücre sayısına oranı alınarak hesaplanmıştır (70).

5.2.12. Apoptotik İndeks

İkinci bir lamel üzerine yayılmış ve fikse edilmiş kümülüs hücreleri apoptotik indeks için DAPI (200 ng/ml) floresan boyası ile boyanmıştır. Bunun için 45 dakika karanlık ortamda, oda ısısında DAPI boyası ile inkübe edilmiştir. PBS yıkamalarını takiben preparat kapatılmış ve nukleusta morfolojik apoptoz kriterleri (kondensasyon, yarım ay görünümü, fragmentasyon) floresan mikroskopta değerlendirilmiştir. Apoptotik indeks, apoptotik hücrelerin tüm hücrelere oranıyla elde edilmiştir (70).

5.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER

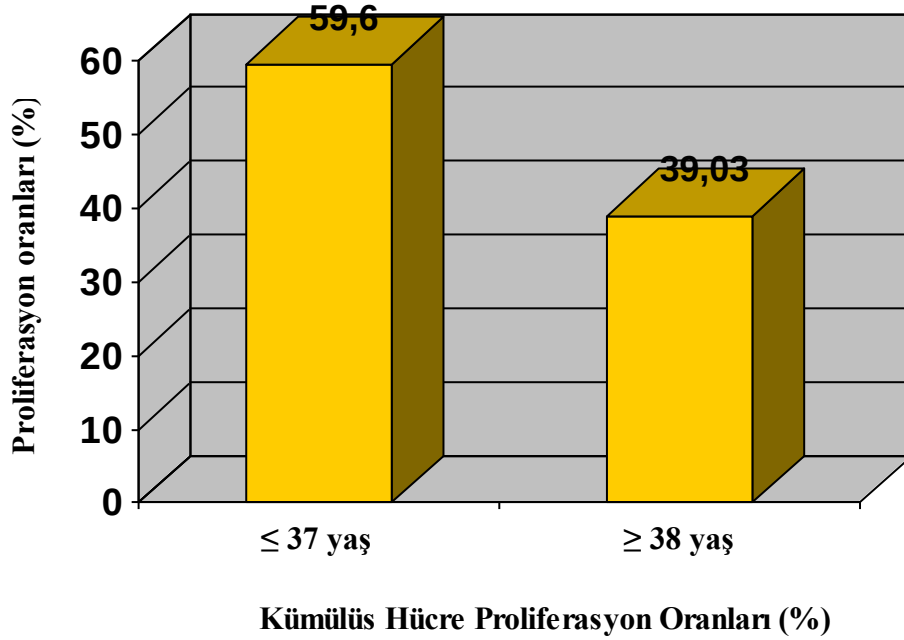
Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Science) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tamamlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında T testi, Mann Whitney-U ve Cqi-square testleri kullanıldı.

Sonuçlar %95’lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

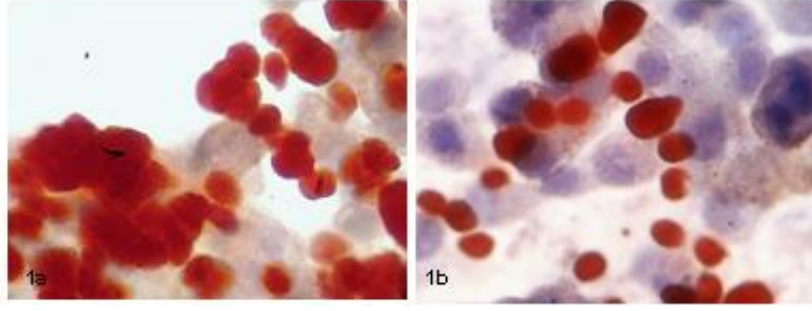
6. BULGULAR

Çalışmamızda kümülüs hücre proliferasyon ve apoptoz oranlarının hasta yaşına bağlı olarak değişimi ve embriyo kalitesi üzerine etkisi incelendi.

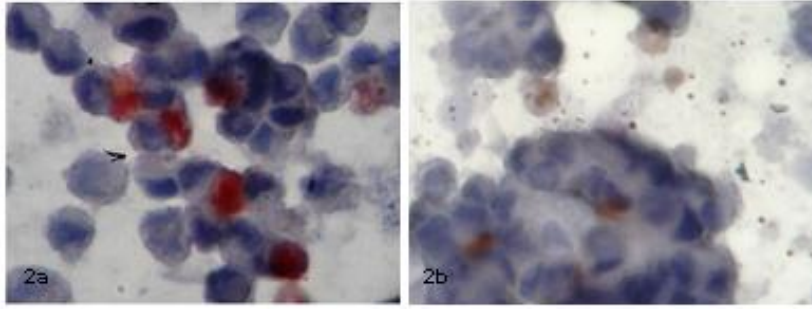
Çalışma grupları fertilité ile ilişkisi bilinen yaş faktörü dikkate alınarak oluşturuldu. Birinci grup 37 yaş ve altındaki, ikinci grup ise 38 yaş ve üzerindeki kadın hastalardan oluşturuldu. Hastalara ait kümülüs hücrelerinde PCNA immünohistokimyasal boyamasıyla saptanan proliferasyon indeksi sırasıyla 37 yaş ve altındaki grupta 59.60 ± 22.40 (Resim 1), 38 yaş ve üstündeki grupta ise 39.03 ± 33.80 olarak bulundu (Resim 2). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($P= 0.024$), (Şekil 1).



Şekil 1: Hasta yaşı ≤ 37 ve ≥ 38 olarak ayrılan gruplarda kümülüs hücre proliferasyon oranları.

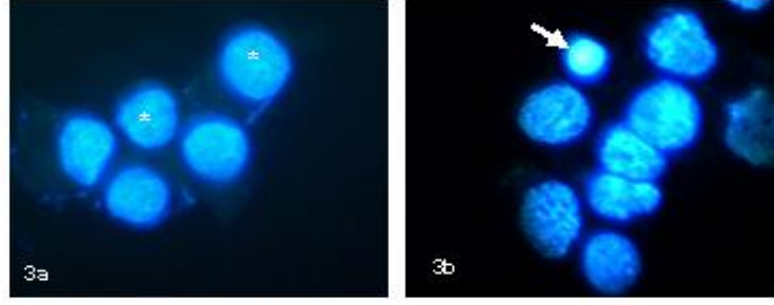


Resim 1a,b: Hasta yaşı ≤ 37 olan gruba ait PCNA ekspresyon oranı yüksek kümülüs hücreleri izlenmekte. HE-X600.

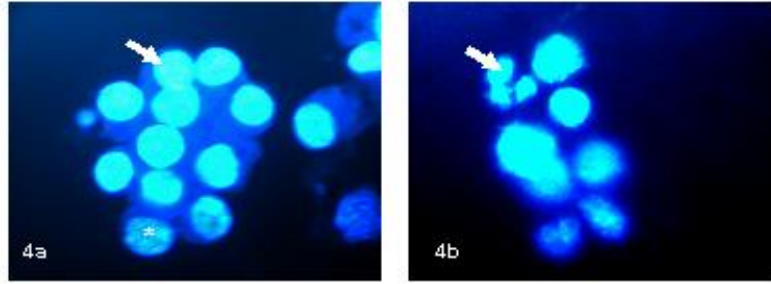


Resim 2a,b: Hasta yaşı ≥ 38 olan gruba ait proliferasyon oranı düşük kümülüs hücreleri. HE-X600.

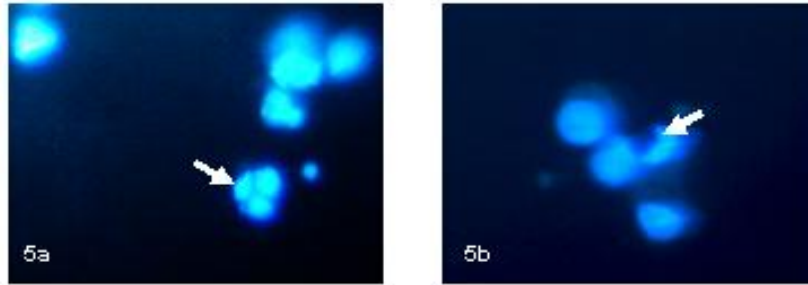
Kümülüs hücrelerinin apoptoz oranları DAPI ile boyanan hücre yaymalarında nükleus kondensasyonu, yarım ay görüntüsü ve fragmentasyon oranlarının saptanması ile belirlendi (Resim 3-5). Apoptoz indeksi 37 yaş ve altı grupta 4.45 ± 2.63 , 38 yaş ve üstü grupta ise 4.03 ± 2.44 olarak bulundu (Şekil 2) ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($P=0.570$).



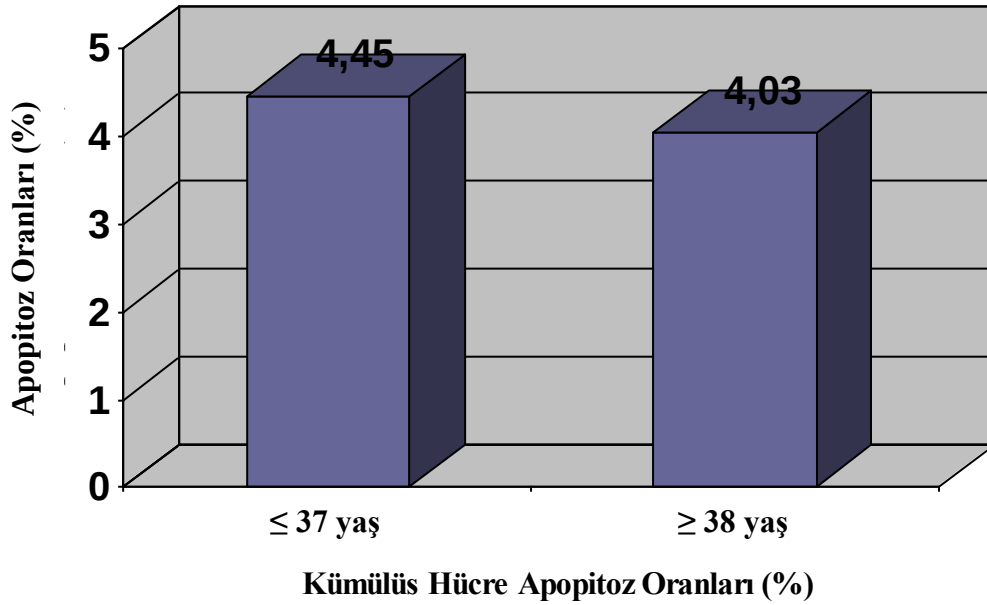
Resim 3a,b: Kümülüs hücrelerinde normal nukleus kromatin materyalleri (*) izlenmekte (a). Kondanse olmuş kromatin materyali, çapı küçülmüş (→), (b). X600.



Resim 4a,b: Kondanse olmuş (→) ve normal özellikte (*) kromatin materyali içeren kümülüs hücreleri izlenmekte (a). Apoptozun tipik morfolojik bulgularından biri olan nükleer fragmentasyon izlenmekte (b). X600.



Resim 5a,b: Nükleer fragmentasyon (→) gösteren apoptotik hücre izlenmekte (a). Apoptozun diğer bir morfolojik bulgusu olan kromatin materyalin yarım ay (crescent) (→) görünüm kazandığı bir nukleus izlenmekte (b). X600.



Şekil 2: Hasta yaşı ≤ 37 ve ≥ 38 olarak ayrılan gruplarda kümülüs hücre apoptoz oranları.

Hastalar, toplam oosit sayıları, oosit matürasyon düzeyleri, fertilizasyon oranları ve gebelik eldesi açısından değerlendirildi. Hasta yaşı ≤ 37 ve ≥ 38 olarak ayrılan gruplarda sırasıyla toplam oosit sayıları 20.00 ± 7.82 ve 10.57 ± 9.68 olarak saptandı, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0.001$). Gruplara ait oosit matürasyon oranları 84.17 ± 11.81 ve 84.08 ± 15.74 , fertilizasyon oranları ise 63.36 ± 18.36 ve 69.17 ± 25.07 olarak bulundu. Gruplara ait değerler karşılaştırıldığında oosit matürasyon oranları ve fertilizasyon oranları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 1). Gebelik oranları ise 37 yaş ve altı grupta %54.5 ve 38 yaş ve üstü grupta %22.2 olarak bulundu. Gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($P=0.038$), (Tablo 1).

	Hasta yaşı		
Değerlendirme Parametreleri	≤ 37 yaş	≥ 38 yaş	P
Oosit sayısı	20.00±7.82	10.57±9.68	0.001
Matürasyon oranı (MII/toplam oosit)	84.17±11.81	84.08±15.74	0.983
Fertilizasyon oranı (2PN/MII)	63.36±18.36	69.17±25.07	0.376
Gebelik oranı	% 54.5	% 22.2	0.038

Tablo 1: Hasta gruplarına göre parametrelerin değerlendirilmesi.

Gelişen embriyo kalitesi hasta gruplarına göre değerlendirildi. Bunun için gelişen embriyolar iyi, orta ve kötü kalite olarak üç gruba ayrıldı ve hasta yaşına göre ≤ 37 ve ≥ 38 olarak ayrılan iki grupta değerlendirildi. Hasta grupları arasında karşılaştırılan iyi kalite embriyo oranları 4.625 ± 3.00 ve 3.285 ± 4.12 bulundu. Orta kalite embriyo oranları 3.125 ± 2.15 ve 1.809 ± 1.86 olarak, kötü kalite embriyo oranları ise 3.166 ± 2.87 ve 0.857 ± 1.19 olarak bulundu, değerler arasındaki istatistiksel fark sırasıyla $P=0.216$, $P=0.035$, $P=0.001$ olarak bulundu (Tablo 2).

	Hasta yaşı		
Embriyo Kalite Oranı	≤ 37 yaş	≥ 38 yaş	P
İyi kalite embriyo ortalaması	4.625 ± 3.00	3.285 ± 4.12	0.216
Orta kalite embriyo ortalaması	3.125 ± 2.15	1.809 ± 1.86	0.035
Kötü kalite embriyo ortalaması	3.166 ± 2.87	0.857 ± 1.19	0.001

Tablo 2: Hasta gruplarına göre embriyo kalite oranlarının değerlendirilmesi.

7. TARTIŞMA

Oosit kalitesi başarılı fertilizasyon ve implantasyon için gerekli ve son derece önemli bir faktördür. Foliküler gelişim sürecinde oosit matürasyonu kümülüs hücrelerinin desteği altındadır. Kümülüs hücreleri ve oosit arasındaki karşılıklı etkileşim parakrin tipte olup neksus tipi bağlantılar ile sağlanır (22). Oosit kalitesinin saptanmasına ilişkin çeşitli değerlendirmeler yapılmakla birlikte henüz otoriterlerce ortak kabul gören hassas bir yöntem tanımlanmamıştır. Bu amaçla en uygun yöntemin kümülüs-oosit kompleksinin morfolojik değerlendirmesi olacağı düşünülmüştür (59). Ancak sadece morfolojinin değerlendirildiği çalışmaların yeterli olmadığı sonucuna varılarak, kümülüs hücre proliferasyon ve apoptoz oranlarının yardımcı üreme tekniklerinde oosit kalitesi, fertilizasyon ve gebelik oranlarının belirlenmesi için potansiyel belirteçler olarak incelenmesi önem kazanmıştır. IVF uygulanan hastalarda, oosit kalitesini belirlemek için yapılan çalışmalarda kümülüs-oosit kompleksinin sadece morfolojisinin değerlendirilmesinin fertilizasyon ve gebelik oranlarını saptamaya yönelik katkı sağlamadığı bildirilmiş ve kümülüs hücrelerinin apoptoz ve proliferasyon düzeylerinin oosit kalitesinin saptanmasına yönelik bir belirteç olarak önemli olabileceği ileri sürülmüştür (60).

Günümüzdeki çalışmalar, PCNA'nın ovaryumda meydana gelen proliferasyon sürecinde çok önemli bir belirteç olarak görev aldığına dikkat çekmektedir (32). Erken dönem folikülogenezi incelemek için fare, sıçan, sığır, babun ve bufalo embriyolarında immünohistokimyasal olarak PCNA ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu canlı gruplarına ait ovaryumlarda primordiyal folikül gelişiminin incelendiği ayrıca hücreler arası etkileşimin ve azalan folikülogenez mekanizmasının araştırıldığı pek çok çalışmada PCNA bir proliferasyon işaretleyicisi olarak kullanılmıştır (44, 71-73). Diğer canlı gruplarında yapılan çalışmalarda olduğu gibi Tomanek ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada domuz preantral foliküllerinde de çok sayıda granüloza hücresinde pozitif işaretli PCNA gözlenmiştir. Granüloza hücrelerindeki proliferasyonun büyük bir kısmının antrum oluşumundan önce preantral foliküllerde meydana geldiği bildirilmiştir. Gelişim aşamalarında ki antral foliküllerde PCNA immünoreaktivitesi incelendiğinde granüloza ve teka hücrelerindeki proliferasyon hızının yüksek olduğu gözlenmiştir (32). Sirotkin ve arkadaşları, in-vitro kültür ortamında domuzlardan elde edilen kümülüs-oosit

komplekslerini incelemişlerdir. Kümülüs hücrelerinde immünohistokimyasal olarak PCNA pozitif işaretlenmiş hücre oranını %51 olarak bulmuşlardır. Matürasyon sürecinde kültüre edilen kümülüs hücrelerinde proliferasyon oranlarının azaldığını bildirmişlerdir (4). Çalışmamızda mikroenjeksiyon uygulanan hastalarda kümülüs hücre proliferasyon oranları incelendiğinde yaş ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. İlerleyen hasta yaşıyla birlikte oosit matürasyonunu destekleyen kümülüs hücrelerinde proliferasyon oranlarının azalması oosit kalitesinin de düşeceğini düşündürmektedir.

Foliküler gelişim boyunca, atrezi sürecine giren folikülerden %99'undan fazlası yok olurken yalnızca bir kaçı son ebatına ulaşır ve ovulasyona girer. Apoptozun foliküler atrezi ile yakından ilişkili olduğu çok açıktır. Birçok çalışmada, oosit kalitesinin ve gelişiminin değerlendirilmesinde granüloza hücrelerindeki apoptoz insidansı bir parametre olarak kullanmıştır (4, 13, 59, 74-78). Domuz ve sığır ovaryumlarında foliküler atrezi boyunca teka interna ve granüloza hücrelerindeki apoptotik hücrelerde meydana gelen türe özgü farklılıkların TUNEL yöntemiyle araştırıldığı bir çalışmada ise Nakayama ve arkadaşları, her iki türde de apoptozun ilk olarak granüloza hücrelerinde ortaya çıktığını ve türe özgü farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir (75). Han ve arkadaşlarının keçilerde yaptıkları bir çalışmada, oositin gelişim potansiyelinin granüloza hücrelerindeki apoptozun yanı sıra, folikül büyüklüğü, kümülüs-oosit kompleksi morfolojisi gibi pek çok faktörün etkisi altında olduğunu ve bu çoklu faktörlerin oosit kalitesiyle birlikte değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir (76). Yine Sirotkin ve arkadaşlarının domuzlarda kümülüs-oosit kompleksindeki hücrelerin apoptoz hızlarını incelemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada ise, TUNEL metodu kullanılarak immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir ve apoptoz insidansı %42 olarak tespit edilmiştir (4). Bu çalışmada kültür sürecinin proliferasyon ile apoptoz gelişiminde azalmaya neden olduğu ve kültüre eklenen büyüme faktörlerinin proliferasyonu stimüle ederken apoptozu ise inhibe ettiği gözlenmiştir. Amopour ve arkadaşları, ICSI sonrası fertilize olan ve fertilize olmayan oositlerdeki kümülüs hücrelerinin apoptoz oranlarını incelemişler ve fertilize olanlarda %15.83, olmayanlarda ise %13.34 olduğunu görmüşler ve bu oranın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit etmişlerdir (77). Çalışmamızda ise gruplar arasında fertilizasyon oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Lee ve arkadaşları ise IVF uygulanan hastalarda, kümülüs hücrelerinde apoptoz insidansını incelemişlerdir. 40 yaş üzerindeki hasta gruplarından alınan kümülüs hücrelerinde, apoptoz insidasında önemli bir

artış (%1.59) ve fertilizasyon hızında düşüş saptamış, diğer yaş gruplarıyla karşılaştırıldığında oosit sayısında azalma olduğunu bildirmişlerdir (60). Çalışmamızda da yaşa bağlı olarak ikiye ayrılan hasta grubunda DAPI metodu kullanılarak boyanan hücrelerin nukleuslarında morfolojik olarak belirlenen apoptoz oranları, 37 yaş ve altı grupta %4.45 olarak tespit edilirken, 38 yaş ve üstü grupta ise bu değer %4.03 olarak bulundu. Apoptoz oranları arasında yaşa bağlı bir artış saptamamamıza karşın bireysel farklılıkların bu sonuçları etkilediğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda ayrıca hasta yaşına göre ayrılan gruplarda ortalama oosit sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu farkın hasta yaşının artmasıyla beraber over rezervinin azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Granüloza hücrelerindeki apoptoz, mikroenjeksiyon işlemine gidemeyen kadınlardaki ovaryum rezervinin anlaşılmasında da bir fonksiyon olarak destek sağlamaktadır (60). Çalışmamızda ayrıca elde edilen embriyoların kalitesi değerlendirildiğinde 37 yaş ve altındaki grupta kötü kalite embriyo sayısının arttığı saptanmıştır. Bu beklenmeyen sonuç bu grupta elde edilen embriyo sayılarının yüksek olması ve bireysel farklılıklar ile ilişkilendirilebilir.

Corn ve arkadaşları ICSI uygulanan hastalarda apoptotik kümülüs hücre oranları ve blastosist oluşum hızını araştırdıkları çalışmalarında 35 yaş altı hasta gruplarında apoptotik kümülüs hücrelerinde (10.8 ± 6.7) önemli bir azalma, 36 yaş ve üstü hasta grubunda ise (16.4 ± 7.3) ciddi bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettikleri bulgular doğrultusunda apoptoz oranlarının implantasyon ve gebelik sonuçlarıyla ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (79). Çalışmamızda ise ≤ 37 ve ≥ 38 olarak ikiye ayrılan hasta gruplarında, gebelik oranları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu farkın artan hasta yaşıyla birlikte meydana gelen endometriyal değişikliklerle de ilişkisi göz ardı edilemez. Kadınlarda artan yaşla birlikte, yapılan mikroenjeksiyon işlemi ve embriyo transferinden sonra gebelik oranlarının düştüğü herkesçe bilinen bir gerçektir. Bu sonuçlar yardımıyla üreme tekniklerine ihtiyaç duyan hastalarda gebelik için yaşı çok önemli bir faktör olduğu sonucunu desteklemektedir.

8. SONUÇ

Çalışmamızda, infertilite nedeniyle merkezimize başvuran hastalar yaş aralıklarına göre ≤ 37 ve ≥ 38 olarak iki gruba ayrılmış ve kümülüs hücrelerinin proliferasyon ve apoptoz oranları belirlenerek, mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon, embriyo gelişimi ve gebelik sonuçlarıyla ilişkisi incelenmiştir. ICSI uygulanan hastalarda kümülüs hücre proliferasyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülürken, aynı hasta grubunda kümülüs hücre apoptoz oranları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Yine bu hastalardan elde edilen ortalama oosit sayıları ile gebelik oranları arasında fark gözlemlenirken, matürasyon ve fertilizasyon oranları arasında fark gözlenmedi. Bununla beraber gelişen embriyo kalitelerine göre üç gruba ayırdığımız hasta gruplarında iyi kalite embriyo oranları arasında bir fark gözlenmemesine rağmen, orta ve kötü kalite embriyo oranları arasında bir fark görüldü.

Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, kümülüs hücrelerinin proliferasyon indeksinin intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonuçlarının belirlenmesinde potansiyel bir belirteç olarak önemli olabileceği ancak apoptoz indeksinin yapılacak yeni çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

9. TEŞEKKÜR

Bana bu çalışmada yol gösteren, tez danışmanlığımı yürüten, tez konusunun belirlenmesinden çalışmanın sonuçlandırılmasına kadar görüş ve önerilerini sabırla benden esirgemeyen, her türlü desteği sağlayan değerli hocam İstanbul Bilim Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e

Tez süresi boyunca her konuda yardımlarını gördüğüm laboratuvar sorumluları arkadaşlarım Türkan SARIOĞLU ile Melike ERSÖZ'e ve sürekli yardımına koşan Enstitü Sekreterimiz İlknur KARAOSMANOĞLU'na

Tez materyallerimin temini, hazırlanması ve tüm laboratuvar çalışmaları boyunca sürekli yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Faruk BENER, Özcan DÜZCÜ, İren KIZILÖZ ve Yusuf SAĞIROĞLU'na

Tezimin hazırlanması sırasında istatistiksel çalışmalarına destek veren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Mehmet N. ORMAN'a

Tezimin yazımı sırasında bana destek olup sürekli beni yüreklendiren, ümitsizliğe kapılmama engel olan Mehtap ÜSTÜNADA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Huang FJ, Lan KC, Kung FT, Tsail MY, Chang CY, Huang HW, Lin YC, Chang SY. Human cumulus-free oocyte maturational profile and in vitro developmental potential after stimulation with recombinant versus urinary FSH. *Hum Reprod.* 2004, 19(2): 306-315.
2. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2003, 9(3): 237-249.
3. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: A predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2004, 19(12): 2869-2874.
4. Sirotkin AV, Dukesova J, Pivko J, Makarevich AV, Kubek A. Effect of growth factors on proliferation, apoptosis and protein kinase A expression in cultured porcine cumulus oophorus cells. *Reprod Nutr Dev.* 2002, 42: 35-43.
5. Luciano AM, Modina S, Gandolfini F, Lauria A, Amstrong DT. Effect of cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. *Biol Reprod.* 2000, 63: 1580-1585.
6. Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol.* 2005, 20(4): 715-723.
7. Prochazka R, Kalab P, Nagyova E. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol Reprod.* 2003, 68: 797-803.
8. Gitten JEI, Barr KJ, Vanderhyden BC, Kidder GM. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci.* 2005, 118: 113-122.
9. Bulgurcuoğlu S, Özsaıt B, Attar E. Büyüme faktörlerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerindeki etkisi. *Artemis.* 2003, 4(1): 18-26.
10. Amsterdam A, Selvaraj N. Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocr Rev.* 1997, 18(4): 435-461.

11. Larsen WJ, Sherman LS, Potter SS, Scott WJ. Human Embryology. Third Edition. Pennsylvania, Elsevier Health Science, 2001.
12. Moore KM, Persaud TVN. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
13. Perez GIP, Tilly JL. Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocyte of aged mice. *Hum Reprod.* 1997, 12(12): 2781-2783.
14. Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev Sci Tech Int Epiz.* 2005, 24 (1): 413-423.
15. Gosden RG. Ovulation 1: Oocyte development throughout life. Gametes the oocyte. Jurgis Geminidas Grudzinskas, John Yovich, United Kingdom, Cambridge University Press, 1995.
16. Carlsson IB. Regulation of human ovarian folliculogenesis in vitro. Stockholm, Karolinska Institutet, 2008.
17. Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
18. Gupta PK. Cell and Molecular Biology. India, Rastogi Publications, 2005.
19. Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrin.* 2006, 4(16): 1-11.
20. Bosco L, Ruvolo G, Morici G, Manno M, Cittadini E, Roccheri MC. Apoptosis in human unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2005, 84(5): 1417-1423.
21. Emery BR, Miller RL, Carrell DT. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with preantral cumulus cell attachment and developmental stage. *BMC Dev Biol.* 2001, 1:14.
22. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update.* 2008, 14(2): 159-177.
23. Russell D, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: Co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update.* 2007, 13(3): 289-312.
24. Salustri A, Ulisse S, Yanagishita M, Hascall VC. Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is electively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor- β . *J Biol Chem.* 1990, 265(32): 19517-19523.

25. Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci.* 2005, 118: 5257-5268.
26. Robert C, Hue I, McGraw S, Gagne D, Sirard MA. Quantification of cyclin B1 and p34^{cdc2} in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays. *Biol Reprod.* 2002, 67: 1456-1464.
27. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji.* İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2006.
28. Kagawa N, Sakurai Y, Miyano T, Manabe N. Effect of long-term grafting on follicular growth in porcine ovarian cortical grafts xenoplat to severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Reprod Dev.* 2005, 51(1): 77-85.
29. Anguita B, Paramio MT, Morato R, Romaguera R, Jimenez-Macedo AR, Mogas T, Izquierdo D. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Anim Reprod Sci.*
doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.01.007.
30. Kelkar RL, Dharma SJ, Nandedkar TD. Expression of fas and fas ligand protein and mRNA in mouse oocytes and embryos. *Reprod.* 2003, 126: 791-799.
31. Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *RBM Online.* 2007, 14: 758-764.
32. Tomanek M, Chronowska E. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. *Folia Histochem Cyto.* 2006, 44(4): 269-274.
33. Bar-Ami S, Goren HG, Brande JM. Different morphological and steroidogenic patterns in oocyte/cumulus-corona cell complexes aspirated at in vitro fertilization. *Biol Reprod.* 1989, 41: 761-770.
34. Antczak M. The synthetic and secretory behaviors (nonsteroidal) of ovarian follicular granulosa cells: Parallels to cells of the endothelial cell lineage. *Essential IVF Basic Research and Clinical Applications.* Ed: Jonathan Van Blerkom, Linda Gregory, London, Kluwer Academic Publishers, 2004.
35. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science.* 2004, 682: 303.

36. Jamnongjit M, Gill A, Hammes SR. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *PNAS*. 2005, 102(45): 16257-16262.
37. Shimada M, Gonzalez IH, Robayna IG, Richards J. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: Key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol*. 2006, 20(6): 1352-1365.
38. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardio Res*. 2000, 45, 528-537.
39. Eppig JJ. Growth and development of the mammalian oocyte-granulosa cell complex in culture. *Biology and pathology of the oocyte. Its Role in Fertility and Reproductive Medicine* Ed: Alan O. Trounson, Roger G. Gosden. United Kingdom, Cambridge University Press, 2003.
40. Zhuo L, Kimata K. Cumulus oophorus extracellular matrix: Its construction and regulation. *Cell Struc Func*. 2001, 26: 189-196.
41. Prochazka R, Kalab P, Nagyova E. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol Reprod*. 2003, 68: 797–803.
42. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A molecular approach*, Third Edition, Massachusetts, ASM Press-Sinauer Associates, 2004.
43. Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Stem Cells*. 2001, 19: 88-91.
44. Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod*. 1995, 53: 295-301.
45. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994, 369, 574-578.
46. Cazzalini O, Perucca P, Savio M, Necchi D, Bianchi L, Stivala LA, Ducommun B, Scovassi AI, Prosperi E. Interaction of p21^{CDKN1A} with PCNA regulates the histone acetyltransferase activity of p300 in nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res*. 2008, 36: 1713-1722.
47. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Stem Cells*. 1999, 17: 306-313.

48. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptosis mekanizmaları: Tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Akciğer Ars.* 2003, 4: 165-174.
49. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 1997, 45(7): 923-934.
50. Tomatır AG. Apoptoz: Programlı hücre ölümü. *T Klin Med Sci.* 2003, 23: 499-508.
51. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Derg.* 2001, 2(1): 91-95.
52. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology a text and atlas with cell and molecular biyology. Fourth Edition. USA, Lippincott Williams & Wilkins Publications, 2003.
53. Gewies A. Introduction to apoptosis. ApoReview. 2003. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>
54. Öniz H. Apoptoz: Ölmeye Yatmak. *SSK Tepecik Hast Derg.* 2004, 14(1): 1-20.
55. Ulukaya E. Apoptozis ders notları. 2003. <http://www20.uludag.edu.tr/~biokimya>
56. Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar-Derleme. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2002, 2(4): 323-329.
57. Bilgici B. Apoptozis. <http://biyokimyaci.net>
58. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2008, 19(1): 55-63.
59. Wit AA, Wurth YA, Kruip TA. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci.* 2000, 78: 1277-1283.
60. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH. Cumulus cell apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Ass Reprod Gen.* 2001, 18(99): 490-498.
61. Jansen K, Tucker KE. Gonadotropins-only based controlled ovarian hyperstimulation protocols: Benefits and drawbacks. Textbook of assisted reproductive techniques. Ed: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.
62. Pool TB, Ord VA. Oocyte treatment: From egg retrieval to insemination. Textbook of assisted reproductive techniques. Ed: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.

63. Granot I, Dekel N. Preparation and evaluation of oocytes for ICSI. Textbook of assisted reproductive techniques. Ed: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.
64. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth Edition. United Kingdom, Cambridge University Press, 2000.
65. De Vos A, Van Steirteghem A. Assisted reproduction techniques for male factor infertility: Current status of intracytoplasmic sperm injection. A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. Second edition. Ed: Brunsden PR, Rainsbury PA. United Kingdom, Parthenon Publishing, 1999.
66. Palermo GD, Raffaelli R, Hariprasad JJ, Neri QV, Takeuchi T, Veeck L, Rosenwaks Z. ICSI: Technical aspects. Textbook of assisted reproductive techniques. Ed: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.
67. Scott L. Analysis of fertilization. Textbook of assisted reproductive techniques. Ed: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.
68. 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. Ed: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.
69. Schoolcraft WB. Embryo transfer. Textbook of assisted reproductive techniques. Ed: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.
70. Koyutürk M, Ersöz M, Altıok N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. *Neuroscience Letters*. 2004, 370: 212-217.
71. Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod*. 1996, 55: 942-948.
72. Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles. *Hum Reprod*. 1997, 12(9): 1993-2001.

73. Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in *SCID/hpg* mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*. 1998, 13(5): 1133-1138.
74. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2003, 9(3): 237-249.
75. Nakayama M, Manabe N, Nishihara S, Miyamoto H. Species-specific differences in apoptotic cell localization in granulosa and theca interna cells during follicular atresia in porcine and bovine ovaries. *J Reprod Develop*. 2000, 46(3): 147-156.
76. Han ZB, Lan GC, Wu YG, Han D, Feng WG, Wang JZ, Tan JH. Interactive effect of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reprod*. 2006, 132: 749-758.
77. Amopour H, Mohammad AK, Mohiti MJ, Solaimani M. Rate of cumulus cell apoptosis from fertilized and unfertilized oocytes and acid phosphatase levels in follicular fluids after intracytoplasmic sperm injection. *Iranian Biomed Jour*. 2005, 9(4): 163-167.
78. Isobe N, Yoshimura Y. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J Reprod Develop*. 2007: 1119-1124.
79. 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. *Fertil Steril*. 2005, 84(3): 627-633.