



**FARKLI İNFERTİLİTE TANILARINA SAHİP KADINLARDAN ELDE
EDİLMİŞ KUMULUS HÜCRELERİNİN EGF, GDF-9, BMP-15
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ**

Halil RUSO

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabul ettiğimi beyan ederim.

Halil RUSO

05/07/2024

FARKLI İNFERTİLİTE TANILARINA SAHİP KADINLARDAN ELDE EDİLMİŞ
KUMULUS HÜCRELERİNİN EGF, GDF-9, BMP-15 SEVİYELERİNİN
İNCELENMESİ
(Doktora Tezi)

Halil RUSO

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2024

ÖZET

İnfertilite, dünya genelinde çiftlerin %10-15'ini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Bu tez çalışmasında, farklı infertilite tanılarına sahip kadınlardan elde edilen kumulus hücrelerinde Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Büyüme Farklılaşma Faktörü-9 (GDF-9) ve Kemik Morfogenetik Protein-15 (BMP-15) seviyelerinin immünohistokimyasal olarak boyanıp klinik veriler ile birlikte incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca aynı hücre gruplarında apoptoz seviyeleri "dUTP nick end" etiketleme (TUNEL) yöntemi ile analiz edilmiştir. Araştırmaya erkek faktör infertilitesi, Polikistik Over Sendromu (PCOS), endometriozis, düşük over rezervi (DOR), açıklanamayan infertilite ve ileri kadın yaşı tanısı almış toplam 60 infertil birey dahil edilmiştir. Her bir gruptan 10 kadın yer almıştır. Kumulus hücreleri, *in vitro* fertilizasyon (IVF) tedavisi sırasında elde edilmiştir. Elde edilen bulgular, siklus parametreleri ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları, farklı etiyolojik nedenlere sahip infertil bireylerde kumulus hücre verilerinin ve siklus parametrelerinin farklılıklarını ortaya koymuştur. PCOS ve ileri kadın yaşı gruplarında EGF seviyelerinin belirgin şekilde yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Endometriozis ve DOR gruplarında EGF seviyeleri daha düşük bulunmuştur. GDF-9 seviyeleri PCOS grubunda artış gösterirken, DOR grubunda belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. BMP-15 seviyeleri endometriozis grubunda yüksek bulunurken, açıklanamayan infertilite grubunda daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir. TUNEL analizi sonuçlarına göre, DOR ve ileri kadın yaşı gruplarında apoptoz oranlarının yüksek olduğu saptanmıştır. PCOS ve endometriozis gruplarında apoptoz oranlarının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, infertilite tedavilerinde kullanılan kumulus hücrelerinin biyokimyasal ve moleküler özelliklerinin, farklı infertilite tanılarına sahip kadınlar arasında değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, özellikle IVF tedavilerinde daha başarılı sonuçlar elde edebilmek için kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin önemini vurgulamaktadır.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : PCOS, Endometrioma, DOR, Unexplained infertility, İleri kadın yaşı, Erkek faktör infertilite, YÜT, Tüp bebek
Sayfa Adedi : 92
Danışman : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

EXAMINATION OF EGF, GDF-9, BMP-15 LEVELS IN CUMULUS CELLS
OBTAINED FROM WOMEN WITH DIFFERENT DIAGNOSES OF INFERTILITY
(Ph.D. Thesis)

Halil RUSO

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

June 2024

ABSTRACT

Infertility is a serious health issue affecting 10-15% of couples worldwide that are in need of Assisted Reproductive Technologies (ART) to be able to reproduce. One of the critical steps in ART is controlled ovarian hyperstimulation (COH) to achieve numerous competent oocytes to obtain embryos. However, although there are various non-invasive tests to assess the competence of oocytes, to-date their clinical utilization has been limited. One of those approaches is to investigate the cumulus cells to assess oocyte competence. This thesis aims to investigate the levels of Epidermal Growth Factor (EGF), Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9), and Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15) in cumulus cells obtained from women with different infertility diagnoses. Additionally, the levels of apoptosis in these cells were analysed using the "dUTP nick end" labelling (TUNEL) method. Total of 60 women with different diagnoses were included in the study to examine the levels of EGF, GDF-9, BMP-15, and apoptosis of cumulus cells and those outcomes were correlated with clinical outcomes. ART cycles involving male factor infertility, Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), endometriosis, diminished ovarian reserve (DOR), unexplained infertility, and advanced maternal age were investigated in this thesis. Ten women from each group were included, and cumulus cells were collected during IVF treatment for analysis. EGF levels were found to be high in women with PCOS and advanced age. EGF levels were lower in women with endometriosis and DOR. GDF-9 levels increased in the PCOS group, while they decreased in the DOR group. BMP-15 levels were high in the endometriosis group and low in the unexplained infertility group. According to TUNEL analysis, the apoptosis rates were high in women with DOR and advanced age. Apoptosis rates were lower in the PCOS and endometriosis groups. This study demonstrates that the biochemical and molecular characteristics of cumulus cells used in infertility treatments vary significantly among women with different diagnoses. These findings underscore the importance of personalized treatment strategies to achieve more successful outcomes in IVF treatments.

Science Code : 1033
Key Words : PCOS, Endometrioma, DOR, Unexplained infertility, Advanced maternal age, Male factor infertility, ART, In vitro fertilisation
Page Number : 92
Supervisor : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca sadece akademik değil aynı zamanda kariyer ve sosyal hayatım konusunda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman tecrübesi ve engin bilgisiyle bana yol gösterici olan pek değerli danışmanım ve aynı zamanda Ana Bilim Dalı Başkanı'mız sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a sonsuz şükranlarımı sunmayı hayatım boyunca bir borç bilirim. Değerli hocam'a bir ömür yol gösterici olmasından dolayı her zaman içtenlikle sonsuz saygılarımı sunacağım.

Doktora eğitimim boyunca gerek ders konularımızda gerekse bilimsel sohbetlerimizle bu süreci daha da değerli kılan ve Tez İzleme Komitemde yer almakla beni şerefliendiren Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOLU ve Prof. Dr. Cem KORKMAZ'a, doktora derslerimize katılarak bizlerin yetişmesinde katkıları olan Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na,

Doktora eğitimim sürecinde bana olan sonsuz destekleri ve paha biçilmez yardımlarından dolayı çok değerli dostum Dr. Duygu DAYANIR ve Doç. Dr. Cemile Merve SEYMEN, Doktora eğitim sürecinde dostluklarını edinmekten mutlu olduğum Dr. Süheyla Esra ÖZKOÇER ve Meltem ATEŞ'e, Tez aşamasında ve tabii ki hayatımda olmalarından sonsuz mutluluk duyduğum ekip arkadaşlarım Seren ŞENYURT, Mehmet Fatih AĞAÇKANLI ve Esma BAŞŞAHİN'e,

Tüm zor zamanlarımda her zaman kayıtsız ve koşulsuz yanımda olan ve bana her zaman destek ve motivasyon verip hayatımı güzelleştiren eşim Duygu SAYKAN RUSO'ya,

Doktora sürecimde dünyaya gelen hayata bakışımı kökten değiştiren, hayatıma daha fazla anlam katan, sevginin ne demek olduğu konusunda boyut kazandıran canım oğlum Arden RUSO'ya,

Benim bu imkanlara sahip olmamdaki yegâne mimarları olan biricik babam Ahmet RUSO, annem Gülsün RUSO ve abim Mustafa RUSO'ya,

Son olarak bu tez çalışmasını mümkün kılan ve bilimin ilerlemesine katkıda bulunan tez çalışmasının isimsiz gönüllü hastalarına,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Primordial Germ Hücrelerinin Göçü.....	7
2.2. Gametlerin Olgunlaşması Sırasındaki Morfolojik Değişimler	7
2.3. Ovaryum.....	9
2.3.1. Ovaryum gelişimi	10
2.3.2. Ovaryum histolojisi	13
2.4. Follikülogenez ve Üremedeki Rolü.....	13
2.4.1. Föllikülogenez aşamaları, hormonal ve moleküler kontrolü	14
2.4.2. Follikulogenez: Moleküler regülasyonu ve matürasyon	18
2.4.3. GDF-9 ve BMP-15 sinyal yolları	19
2.4.4. EGF sinyal yolları ve oosit matürasyonu	21
2.5. Oosit Kompetansı ve Üremedeki Rolü	23
2.6. Kumulus-Oosit Kompleksi	27
2.6.1. Kumulus-oosit kompleksi ve biomarker ilişkisi.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31

	Sayfa
3.1. Gönüllülere Ait Özellikler ve Gruplandırma.....	31
3.1.1. Gönüllüler için işleme kriterleri	31
3.1.2. Gönüllüler için dışlama kriterleri	32
3.1.3. Gönüllülere ait örneklerde incelenen parametreler	32
3.2. Kumulus Hücrelerinin Elde Edilmesi	32
3.2.1. Kontrollü over hiperstimülasyonu.....	33
3.2.2. OPU, denüdasyon, mikroenjeksiyon ve embriyo kültür süreci.....	33
3.3. İmmünohistokimyasal Prosedür.....	34
3.3.1. İmmünohistokimyasal takip	34
3.4. TUNEL Prosedürü	35
3.5. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR	37
4.1. Gruplar Arası Demografik ve Klinik Embriyolojik Veriler.....	37
4.2. Gruplar Arasında EGF, GDF-9, MBP-15 İmmünohistokimyasal ve TUNEL Verileri	39
4.2.1. Kontrol grubu.....	40
4.2.2. PCOS grubu.....	41
4.2.3. Endometrioma grubu.....	46
4.2.4. Maternal age grubu.....	50
4.2.5. DOR grubu	54
4.2.6. Unexplained grubu	58
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	71
EKLER.....	87
EK-1. Etik Komisyon İzni	88

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ	90
----------------	----

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Gruplar arası demografik veriler, KOH değişkenleri ve siklus parametreleri	38
Çizelge 4.2. Gruplar arası GDF-9, BMP-15, EGF ve TUNEL verileri.....	40

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Primordial follikülün yapısı	8
Şekil 2.2. Kadın üreme sistemi anatomisi	9
Şekil 2.3. Dişi ve erkek gonadların gelişim aşamalarının şematik reprezentasyonu	11
Şekil 2.4. Follikülogenez sırasında oosit ve follikül hücrelerinin şematik reprezentasyonu.....	15
Şekil 2.5. TGF- β ailesi üyesi major proteinlerin over fonksiyonları üzerine olan etkilerinin şematik reprezentasyonu.....	20
Şekil 2.6. LH hormonunun mural granüloza etkileri.....	22
Şekil 2.7. Oosit kalitesinin niteliksel ve niceliksel olarak incelenmesini sağlayan materyaller ve parametreler	24
Şekil 4.1. GDF-9 seviyelerinin gruplar arası seviyeleri	44
Şekil 4.2. BMP-15 seviyelerinin gruplar arası seviyeleri.....	44
Şekil 4.3. EGF seviyelerinin gruplar arası seviyeleri.....	45
Şekil 4.4. Apoptoz seviyelerinin gruplar arası seviyeleri.....	46
Şekil 4.5. EGF-9 seviyelerinin endometrioma grubuna göre olan seviyeleri	48
Şekil 4.6. BMP-15 seviyelerinin endometrioma grubuna göre olan seviyeleri.....	49
Şekil 4.7. EGF seviyelerinin endometrioma grubuna göre olan seviyeleri.....	49
Şekil 4.8. Apoptoz seviyelerinin endometrioma grubuna göre olan seviyeleri.....	50
Şekil 4.9. GDF-9 seviyelerinin maternal age grubuna göre olan seviyeleri.....	52
Şekil 4.10. BMP-15 seviyelerinin maternal age grubuna göre olan seviyeleri	53
Şekil 4.11. EGF seviyelerinin maternal age grubuna göre olan seviyeleri	53
Şekil 4.12. Apoptoz seviyelerinin maternal age grubuna göre olan seviyeleri	54
Şekil 4.13. GDF-9 seviyelerinin DOR grubuna göre olan seviyeleri.....	56
Şekil 4.14. BMP-15 seviyelerinin DOR grubuna göre olan seviyeleri	57
Şekil 4.15. EGF seviyelerinin DOR grubuna göre olan seviyeleri	57
Şekil 4.16. Apoptoz seviyelerinin DOR grubuna göre olan seviyeleri	58

Şekil	Sayfa
Şekil 4.17. GDF-9 seviyelerinin unexplained grubuna göre olan seviyeleri	60
Şekil 4.18. BMP-15 seviyelerinin unexplained grubuna göre olan seviyeleri	61
Şekil 4.19. EGF seviyelerinin unexplained grubuna göre olan seviyeleri	61
Şekil 4.20. Apoptoz seviyelerinin unexplained grubuna göre olan seviyeleri	62

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDFF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı	41
Resim 4.2. PCOS grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı	43
Resim 4.3. Endometrioma grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı	48
Resim 4.4. Maternal age grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı	52
Resim 4.5. DOR grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı	56
Resim 4.6. Unexplained grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
--------------------	--------------------

µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
H	Hidrojen
kg	Kilogram
mg	Miligram
mm	Milimetre
Na	Sodyum
NO	Nitrik Oksit
°C	Santigrat
OH	Hidroksil
sn	Saniye

Kısaltmalar	Açıklamalar
--------------------	--------------------

DET	Dondurulmuş embriyo transferi
DOR	Düşük Over Rezervi
GnRH	Gonadotropin releasing hormon
H	Hidrojen
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IUI	İntraüterin İnseminasyon
IVF	İn-vitro Fertilizasyon
kg	Kilogram
mg	Miligram
mm	Milimetre

Kısaltmalar**Açıklamalar****Na**

Sodyum

NO

Nitrik oksit

°C

Santigrat

OH

Hidroksil

PCOS

Polikistik over sendromu

PGH

Primordial Germ Hücre

sn

Saniye

SRY

Sex Determining Region on Chromosome Y

WHO

Dünya Sağlık Örgütü

YÜT

Yardımcı Üreme Teknikleri

1. GİRİŞ

İnfertilite, 1 yıllık düzenli korunmasız cinsel ilişkiden sonra klinik bir gebelik elde edilememesi olarak tanımlanan bir hastalıktır [1]. Global olarak infertilite insidansı incelendiğinde metodolojik farklar ile yaklaşık 48,5 ile 72,4 milyon çiftin infertilite ile mücadele ettiği düşünülmektedir [2, 3]. İnfertilite prevalansı ise üreme çağındaki çiftlere göre %12,6-17,5 aralığında değişmektedir [4]. Bu sorunu yaşayan çiftler farklı tedavi modaliteleriyle infertilite sorunlarına çözüm bulabilmektedir. Ülkemiz incelendiğinde bu oran evli çiftlerde yaklaşık olarak %10-20 aralığında olduğu ifade edilmektedir [5]. Hacettepe üniversitesi tarafından yürütülen çalışmalara göre Türkiye doğurganlık katsayısı yıllar içerisinde düşüş göstermektedir [6]. TNSA verilerine göre 1993 yılında Türkiye geneli doğurganlık kat sayısı 2.7 iken 2018 yılı verilerine göre bu oran 2.3 seviyesi düşmüş bulunmaktadır [6]. Doğurganlık katsayısındaki bu düşüş sadece kısırlık sebepleri ile açıklanamayacak olup sosyoekonomik parametrelerin de bu tablodaki payının büyük olabileceği unutulmamalıdır. Gelecekte ise, mevcut literatür ışığında özellikle batı coğrafyasında kısırlık insidansının artacağı ve Yardımlı Üreme Teknolojileri (YÜT)’ne olan ihtiyacın artacağı tahmin edilmektedir [7].

YÜT kapsamında infertilite etiyolojisine göre değişiklik gösteren inseminasyon metotları bulunmaktadır. Bunlar, i) İntrauterin İnseminasyon (IUI), ii) İn-vitro Fertilizasyon (IVF) ve iii) İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) olarak sınıflandırılabilir. IUI tedavi biçiminde fallop tüplerin açık olması ve erkek faktör infertilite sebeplerinin bulunmaması önemlidir. IVF tedavi biçimi ise tubal faktör infertilitede kullanılması gereken bir tedavi biçimi olmakla birlikte eğer erkek faktörü bulunuyorsa ICSI tedavisi tercih edilmelidir. IVF ve ICSI inseminasyon tedavilerindeki temel felsefe ise belirli aşamaya gelmiş folliküllerden aspire edilen oositlerin laboratuvar ortamında gerek IVF gerekse ICSI metotlarıyla döllendikten sonra, *in vitro* kültür şartlarında geliştirilip embriyo haline geldikten sonra intrauterin kaviteye transferidir. YÜT işlemleri, maliyetli olmasının yanı sıra, genellikle zaman alıcı, fiziksel ve duygusal olarak zorlayıcı ve klinik başarı açısından da belirsizdir [8-10]. Geçmişten günümüze incelendiğinde, YÜT tedavilerinin başarı şansları diğer tıp dalları ile kıyaslandığında gerek jinekolojik gerekse klinik embriyolojik tüm teknolojik gelişmelere rağmen düşük kalmaktadır [7]. YÜT kapsamında uygulanan taze embriyo transferi (TET) ve dondurulmuş embriyo transferi (DET) işlemlerini 1997-2019 yılları arasında Avrupa’da inceleyen çalışmada yıllar içerisinde başarı oranlarında bir artış sağlandığı gösterilmiştir [7].

Klinik başarıdaki bu artışın belirli sebepleri bulunmaktadır. Bunlar, YÜT kapsamında kullanılan gonadotropin ve diğer “*controlled ovarian hyperstimulation* (KOH)” amaçlı ilaçlardaki gelişmeler, *in vitro* gamet ve embriyo kültürü için kullanılan kültür ortamlarındaki gelişmeler ve uzatılmış *in vitro* kültür kullanımı olarak özetlenebilir. Fakat, özellikle son 10 yıl incelendiğinde TET ve DET işlemlerinde başarı şanslarında plato grafiği izlenmektedir [7]. Dolayısı ile, mevcut teknolojik gelişmeler ışığında klinik başarıyı arttırabilmek için izlenebilecek stratejiler arasında daha kompetan oosit elde edilmesi ve daha kompetan embriyonun seçilebilmesi bulunmaktadır. Özellikle kadın üreme sistemindeki patolojiler varlığında bu ihtiyaç daha da önem kazanmaktadır. Polikistik over sendromu (PCOS), düşük over rezervi (DOR) ve endometriozis gibi hormonal dengesizliklerle karakterize durumlarda bahsi geçen KOH ve gamet/embriyo seçimi girişimleri daha da önemli olmaktadır.

Üreme çağındaki kadınlarda en yaygın endokrin sistem rahatsızlıklarından biri PCOS veya hiperandrojenik anovulasyon (HA) veya Stein-Leventhal sendromu olarak da bilinen bu kronik ve heterojen bozukluk, adet düzensizliği, kısırlık, hirsutizm, akne ve obezite gibi komplikasyonların varlığı ile karakterize bir sendromdur [11, 12]. PCOS, en az bir yumurtalığın hacimsel olarak 10 ml’den büyük ve en az bir yumurtalığın tahmini on adet küçük kisti olduğu durumlarda teşhis edilir [13]. Genellikle yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan komplikasyonlar geliştikçe teşhis edilir (örneğin, alopesi, akne ve kısırlıkla ilgili sorunlar, [14]). Dünya çapında, üreme çağındaki kadınların %4-10'unun PCOS'yla yaşadığı tahmin edilmektedir [11]. WHO tarafından 2012 yılından yayımlanan rapora göre PCOS'un dünya genelinde 116 milyon kadını (%3,4) etkilediğini tahmin etmektedir [15]. Bu yüksek prevalans, ovülasyon ve menstrüasyon düzensizlikleri, kısırlık, saç dökülmesi ve metabolik sorunlarla ilişkili olması, PCOS'un önemli finansal yükünü vurgular [12, 14]. PKOS her yaşta, menarşla itibariyle görülebilir, ancak vakaların çoğu 20-30 yaşları arasında tanı alır [16]. Son araştırmalar, PCOS'un geleneksel olarak sadece yetişkin kadınları etkileyen bir bozukluk olduğunu göstermekle birlikte, intraüterin yaşam sırasında ortaya çıkan ve ömür boyu süren bir sendrom olduğunu ortaya koymaktadır [17]. Bu çok faktörlü bozukluğun tam nedeni bilinmemekle birlikte, kalıtsal ve çevresel faktörlerin kombinasyonunun önemli roller oynadığı düşünülmektedir. PCOS'un patofizyolojisi, hormonal dengesizlik, kronik düşük dereceli inflamasyon, insülin direnci ve hiperandrojenizmle ilgilidir ve sonuç olarak follikülogenez süreçleri bozulmakla birlikte endometriyal kanser ve tip II diyabet gibi ilişkili eşlik eden hastalıkların riskini artırır [18]. Uluslararası önerilere göre, PKOS tanısı için

kullanılan üç ana faktör hiperandrojenizm, over morfolojisi ve anovulasyondur [18]. Coğrafya, diyet, sosyoekonomik durum ve çevresel kirleticiler de dahil olmak üzere çeşitli çevresel faktörler, PCOS'un gelişimine, ortaya çıkmasına ve ilerlemesine katkıda bulunabilir [19]. PCOS'ta, bozulmuş follikülogenez, hiperandrojenik durumla başlar [20]. Aşırı serbest testosteron, hipotalamustan “*gonadotropin releasing hormone (GnRH)*”nın yüksek darbe frekanslı salınımını artırırken, hipofizden gonadotropin hormonunun salınımını artırır. Ayrıca, luteinize edici hormon, yumurtalık teka hücrelerinde androjen üretimini teşvik ederken, foliküler uyarıcı hormon, androjenleri östrojenlere dönüştürmek için yumurtalık granüloza hücrelerinde etki gösterir. Bu hipotalamik-hipofizer-yumurtalık ekseninin dengesizliği, PCOS'lu kadınlarda aşırı bir orana yol açar [21]. Sonuç olarak, yumurtalık işlevi bozulur ve gelişmekte olan folliküller erken bir aşamada durur, bu da küçük, olgunlaşmamış foliküllerin bolluğuna yol açar. Küçük foliküllerin aşırı üretimi, FSH indüklemeli aromataz aktivitesini inhibe eder ve foliküler gelişimi engeller, bu da yumurtalık hasarına yol açar [20]. Bu gelişmemiş foliküller, PCOS adının temelidir. Büyüyen foliküllerin morfolojisi, sayısı, boyut ve olgunluk açısından heterojendir. Ancak bu fazla foliküller, tam olarak gelişmemiş ve yetkin bir yumurta olma potansiyeline ulaşmadıkları için iyi kalitede folikülleri temsil etmezler. Dolayısıyla, bu durumda folliküler arrest'i arttırırlar [20, 21]. Bu sebeple, granüloza (kumulus) hücrelerinin moleküler belirteçleri, yumurta kalitesini değerlendirmek için potansiyel olarak güvenilir bir araçtır [22].

DOR genel sağlık üzerine etkileri ve tedavisi hakkında yeterince bilgi mevcut değildir. Bununla birlikte, DOR'un yaşlanma, genetik ve çevresel faktörlerden etkilendiğini bilinmektedir [23, 24]. Ayrıca, DOR'un geri dönüşsüz olduğunu ve YÜT kapsamında KOH stimülasyonun DOR'u olan kadınlar için yeterince etkili olmadığı bilinmektedir. DOR, oositlerin kalitesini ve sayısını azalmasıyla birlikte sonuç olarak YÜT için kötü bir prognostik faktör teşkil eder [25]. Yaş, stres, yaşam tarzı vb. gibi bazı faktörler DOR'a neden olur. Bu faktörlerden, yaş DOR'a en yaygın neden olan faktördür [25]. Anormal over vaskülarizasyonun, serbest radikal dengesinin sebep açtığı REDOX dengesinin bozulması, toksik maddelere maruziyet ve genetik değişimler yumurta kalitesi ve sayısını etkileyip anormal sub-optimal klinik parametrelerin görülmesine sebep olabilmektedir. Buna benzer sebeplerle, IVF sikluslarında artan siklus iptali oranları ve düşük gebelik oranları DOR ile ilişkilendirilmiştir [26]. DOR, oositlerin miktar ve kalitesinde bir azalma ile karakterizedir [27]. Düzenli olarak adet gören, primer olarak ovulatuvar döngülere sahip olan üreme çağındaki kadınları, yaşlılarına göre daha düşük doğurganlık veya uyarım yanıtları olan

kadınları tanımlamak için kullanılabilir [28]. Erken over yetmezliğinden veya menopozdan farklıdır. Bir kadının kronolojik yaşının dışındaki diğer faktörler, over rezervindeki oosit sayısını etkiler. Son araştırmalar, DOR'un nedeni ile YÜT başarısı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir [28]. KOH sonucunda normal over rezervine sahip kadınlarla kıyaslandığında daha az yumurta alınmasına neden olan anormal derecede düşük folliküler yanıtla sonuçlanabilir [26]. Bu, zayıf over yanıtı (POR) olarak bilinir. Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) tarafından, POR'u tanımlamak için Bologna kriterleri yayımlanmıştır [29].

Endometriozis, üreme çağındaki kadınlarda kronik ağrıdan kısırlığa kadar çeşitli sorunlara yol açan ve yaşam kalitesini düşüren bir durumdur. Bu durum, öncelikle pelvik bölgede, ancak yalnızca burada sınırlı kalmamak kaydıyla, östrojen bağımlı stroma ve endometrial bezlerin varlığı ile karakterizedir [30]. Kesin bir tanı için cerrahi görselleştirmenin gerekli olması nedeniyle, hastalığın prevalansını ve insidansını kesin olarak değerlendirmek zordur [31]. Endometriozis prevalansı %5 olarak tahmin edilmekte olup, 25-35 yaş aralığında en yüksek seviyeye ulaşmaktadır [32]. 15-49 yaşları arasındaki kadınlar arasında yıllık insidans %0.1 olarak tahmin edilmektedir [33], bu da önemli sağlık harcamalarına yol açmaktadır (kadın başına yıllık ortalama maliyet €9579 olarak tahmin edilmiştir, [34]). Endometriozis ve kısırlık arasındaki ilişkinin kesin bir neden-sonuç bağlantısı olarak hala tartışmalı olmasına rağmen, klinik olarak tanı ve tedavileri tıp literatüründe kapsamlı bir şekilde desteklenmektedir [35]. Günümüzde endometriozisle ilişkili kısırlık, yalnızca fallop tüplerini ve buna bağlı olarak embriyo transportunu değil, aynı zamanda normal endometriumu da etkileyen değişmiş immünite ve genetikle ilgili sorunlarla karşı karşıya olan çok faktörlü bir sorun olarak görülmektedir [36]. Bugüne kadar, endometriozisin neden olduğu kısırlığın tedavisi, ektopik endometrial lezyonların eksizyonu veya azaltılması ve normal pelvik anatomisinin tıbbi, cerrahi veya YÜT aracılığıyla yeniden sağlanmasına odaklanmıştır [37]. Tıbbi yaklaşım, gnRH agonistleri ve oral kontraseptifler gibi çeşitli ilaçlarla over fonksiyonunu engellemeyi hedefler [38]. Tıbbi veya cerrahi girişimlerin istenen sonucu vermemesi durumunda, YÜT devreye girer [39]. IVF, özellikle tubal fonksiyon bozukluğu, anormal peritoneal anatomi veya diğer tedavi yöntemlerinin başarısızlığı durumunda, endometriozisle ilişkili kısırlık yaşayan hastalar için ana tedavi seçeneklerinden biri olduğunu göstermiştir [40]. Özellikle endometrial dokunun ektopik olarak overlerde lokalize olduğu endometrioma olgularındaki cerrahi girişimlerde, over rezervi etkileneceği için YÜT sonrası gebeliğe ulaşma süreleri önem kazanmaktadır. Bu

sebeple kompetan oositlerin ayırt edilmesi ve/veya kompetan embriyo seçilmesi özellikle bu hastalar açısından önceliklidir [41].

İleri maternal yaşı (AMA) kritik bir sosyal ve klinik sorundur. Günümüzde, çocuk sahibi olmayı hayatlarının geç 30'lu-40'lı yaşlarına kadar erteleyen kadınların oranı, özellikle Batı toplumlarında, büyük ölçüde artmıştır [42, 43]. Bu durumun nedenleri arasında artan eğitim ve kadın istihdamı, kariyer hedefleri, doğum kontrol yöntemleri ve ebeveynliği destekleyen sosyal teşviklerin azlığı. Tüm bunlara ek olarak, tüp bebek tedavisinin “yaşla birlikte doğal doğurganlık düşüşünü telafi edebileceği” şeklinde yaygın ve yanıltıcı bir fikir yer almaktadır [42]. Tüp bebek tedavisinin kesin çözüm sağlayacağına dair yanlış algı hem bilgi eksikliğinden hem de bu yöntemin giderek artan popüleritesinden kaynaklandığı düşünülebilir. Bu eğilim, 35 yaşından büyük kadınların hamilelik arayışında olmasıyla karşı karşıya kalan ve bu yaşı AMA hastası kabul etmek için bir sınır olarak belirleyen doğurganlık uzmanları için zorlu bir durum yaratmaktadır [44]. Bu eşik esas olarak genetik bir temele dayanmaktadır: 35 yaşından büyük kadınlarda, embriyo anöploidi oranı menopoza öncesi 40'lı yaşların sonlarına kadar %30'luk temel üretimden %90'a kadar dramatik bir artış göstermektedir [45]. Özellikle, 43 yaşından büyük kadınlarda kromozomal olarak normal bir blastokist üretme şansı %5'ten bile düşük olabilir [46, 47]. Bu durum, bir yandan kronolojik yaşa bağlı olarak over rezervinin kademeli olarak tükenmesine, diğer yandan ise canlı doğum üretebilme yeteneği olarak tanımlanan oosit/embriyo yetkinliğinin kademeli olarak azalmasına bağlanabilir [48-50]. Bu genetik senaryonun nedenleri arasında fonksiyonel olmayan kohezinler [51], mayotik iğ ipliği kontrol noktasının azalmış hassaslığı [52, 53], telomer kısalması [54, 55] ve bozulmuş mitokondriyal metabolik aktivite [56] gibi birçok süreç önerilmektedir. Bu süreçlerin tümü doğrudan veya dolaylı olarak doğru kromozom segregasyonunda rol oynar ve dolayısıyla embriyo yetkinliğinin modüle edilmesinde etkilidir [50].

Yukarıda bahsi geçen farklı etiyolojik infertilite nedenleri gerek tekil gerekse kombinasyon olarak infertilite nedenlerinin yaklaşık olarak %70'ini tanımlamaktadır. Geriye kalan %30'luk hasta grubunda ise infertilite nedeni herhangi bir patolojiye veya anomaliye bağlı olmaksızın bulunabilmektedir. Kısırlık hastalığı açısından herhangi bir tanı almamış bu hasta grubuna açıklanamayan infertilite tanısı getirilmiştir [57, 58]. Bu tartışmalı tanı, kadın ve erkek üreme sistemlerinde herhangi bir anormallik tespit edilmediğinde konulur. Açıklanamayan infertilite, diğer 'standart' araştırmaların ardından, dışlama yoluyla konulan

bir teşhistir. Ancak, tanısal incelemenin ortak bir standardizasyonu hala eksiktir. Uluslararası Yardımcı Üreme Teknolojilerini İzleme Komitesi (ICMART), açıklanamayan infertiliteyi, “görünüşte normal yumurtalık fonksiyonu, fallop tüpleri, rahim, serviks ve pelvis ile yeterli cinsel ilişki sıklığı olan çiftlerde ve görünüşte normal testis fonksiyonu, genito-üriner anatomi ve normal ejakülat olan çiftlerde kısırlık” olarak tanımlamıştır.

Planlanan bu tez çalışmasında IVF tedavisi amaçlı kliniğe başvuran erkek faktör infertilitesi (10), PCOS (10), endometriozis (10), DOR (10), açıklanamayan infertilite (10), ileri maternal yaş (10) tanısı almış toplam 60 bireyden elde edilmiş kumulus hücre örneklerinde EGF, GDF-9 ve BMP-15 değerleri immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Aynı hücre grubunda apoptoz seviyeleri “dUTP nick end” etiketleme (TUNEL) yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler siklus parametreleri ile istatistiki olarak değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Farklı etiyolojiye sahip infertil bireylerde kumulus hücre verileri ve siklus parametrelerindeki farklılıkların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu sayede farklı etiyolojilerin patogeneze süreçlerindeki ilişkiler ve farklılıkların aydınlatılması ve siklus çıktılarının incelenmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

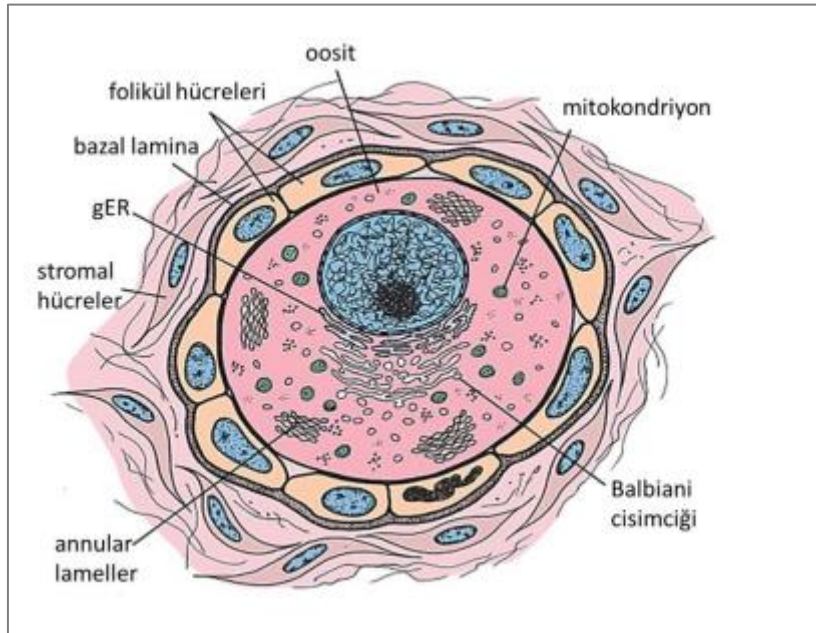
2.1. Primordial Germ Hücrelerinin Göçü

İnsanoğlunun gelişimi ve soyunun devamlılığı için gerekli gametlerin (sperm ve oosit) oluşumu PGH oluşumu ve farklılaşması aşamaları ile oluşmaktadır. Erken embriyonik gelişimin yaklaşık 2. haftasında epiblast içerisinde gelişen PGH primitif çizgi boyunca göçlerine devam eder. Embriyonik gelişimin 3. haftasında yolk kesesinin allantoise duvarında duraksar ve endoderm tabakası hücrelerinin arasına yerleşirler. Gelişimin 4. haftasından itibaren bağırsak mezenterinin dorsal tarafın boyunca pseudopodia yardımıyla hareket edip 5. haftayı takiben primitif gonadlara lokalize olurlar. PGH ile gonadların gelişimi arasında “*positive feedback*” ilişkisi bulunmaktadır. PGH’leri eğer herhangi bir sebeple genital sırtlara lokalize olmazlar ise primer ve sekonder gonadlar gelişmezler. Sayıları mitoz bölünme ile artan PGH hücreleri proliferere olmaya devam ederler gametogenez aşamasına ilerlerler. Y kromozomu üzerinde bulunan SRY bölgesi varlığında PGH hücreleri ilerde sperm hücrelerinin köken aldığı spermatogonia hücrelerine başkalaşırlar. Y kromozomunun yokluğunda ise PGH hücreleri proliferasyona devam edip oosit hücrelerinin köken aldığı oogonia hücrelerine başkalaşırlar. Proliferasyon ve mayoz yolağına giriş katalizör olarak devam etmekte olduğundan her iki overde gelişen 7×10^6 germ hücresi oluşur. Bu sayının pik noktası prenatal gelişimin yaklaşık 5. ayında gerçekleşir. Gelişimin 5. ayından sonra bu sayıda bir düşüş gözlemlenir ve 7. Aydan itibaren over yüzeyine yakın bulunmayan oogoniumların büyük bir kısmı dejenerasyona uğrar [59-63].

2.2. Gametlerin Olgunlaşması Sırasındaki Morfolojik Değişimler

Oosit öncü hücreleri olan oogonia hücrelerinden olgun oosit hücresine ulaşıncaya kadar olan gelişim aşamaları oogeneze olarak adlandırılır. Gonadlara yerleşip oogonia hücrelerine farklılaşan PGH’lerinden bir kısmı mitotik bölünme ile proliferasyona devam ederken bir kısım oogonia hücresi ise mayoz bölünme yolağına girip 1. mayozun bölünmenin profaz evresinde arreste uğrayıp primer oosit yapısını oluşturur. Primer oosit ise gelişimin 3. Ayının sonunda unilaminar bir yassı hücre tabakası çevrenmekte ve oluşan bu yapıya primoriyal follikül ismi verilmektedir (Şekil 2.1, [59]). Bu aşamada primordiyal follikül içerisindeki oosit, matür bir oosit hücresine kıyasla oldukça küçüktür (yaklaşık $30 \mu\text{m}$). Primer oositin morfolojik özellikleri incelendiğinde, özellikle ince dağılmış kromatin, polarize

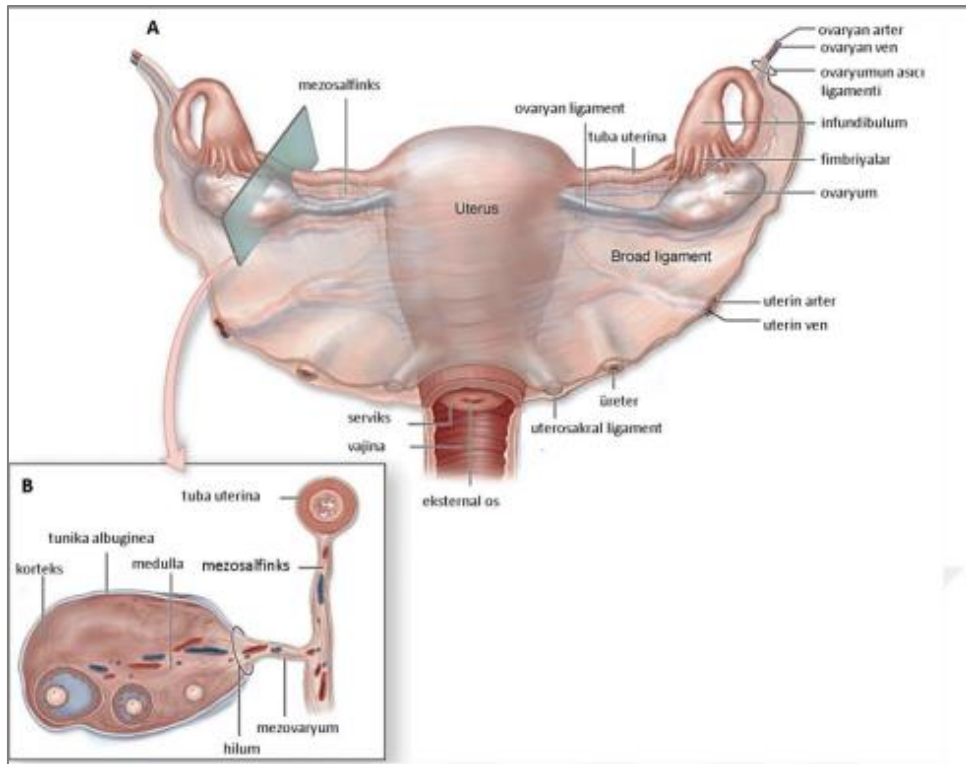
lokalizasyonlu bir nükleus ve bir veya daha fazla nükleolus yapısı dikkat çekmektedir. Sitoplazma içerisinde Golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun, çok sayıda mitokondria ve lizozomların kümeleşmesi halinde gözlemlenen ve Balbiani cisimciği olarak adlandırılan yapı bulunmaktadır. Bu yapıya ek olarak, küçük küre şekilli mitokondria ve çok sayıda küçük veziküller ile karakterize anüler lameller sitoplazmada irregüler şekilde bulunurlar [64]. Ogonium hücrelerinin çoğu mitoz ile bölünüp over havuzunu genişletmeye devam ederken bir kısım hücre Mayoz bölünmenin I evresinin profaz aşamasında arreste uğrayarak primer oosit yapısını oluşturur. Gelişimin 5. ayında overlerdeki germ hücre sayısı maksimum düzeyine yani yaklaşık 7×10^6 sayısına ulaşmaktadır. Gelişimin 7. ayında ise overlerdeki germ hücre sayısı azalmış ve aslında over yüzeyine yakın olanlar harici hemen hepsi dejenere olmuştur. Dejenerasyona uğramayan primer oositlerin tümü artık Mayoz I'in profaz aşamasında arreste uğramış vaziyette beklemektedir [59]. Erkek gametlerin gelişiminden farklı olarak ise primordiyal follikül sayısı sabittir ve bundan sonra oogonia, primer oosit veya primordiyal follikül sayısında proliferasyon gözlemlenmez. Erkeklerde ise spermatogonia hücrelerinin bir kısmı mayotik yolağa girip spermatogenez ve sonrasında spermiyogenez ile sperm yapımından sorumlu olurken, bir kısım spermatogonia hücreleri ise proliferat olup çoğalmaya devam ederler.



Şekil 2.1. Primordial follikülün yapısı [65]

2.3. Ovaryum

Kadınlarda üreme hücrelerini (oosit) üreten ovaryumlar uterus'un her iki pelvik duvarlara yakın olarak lateralde yer alan ve *fossa ovarica* denilen çuklurlara yerleşmiş yaklaşık olarak 3x2x1 cm ebatlarında ve yaklaşık 3-5 gram ağırlığında olan bir çift organdır. Embriyonik gelişim evrelerinde intraabdominal yerleşimli olan overler gelişimin ikinci ayını takiben pelvik boşluğa doğru inmeye başlayıp *arterica iliaca externa*, *arteria iliaca interna* ve *ligamentum latum uteri* arasında bulunan *fossa ovarica*'ya lokalize olurlar [66]. Ovaryum'un *facies medialis* ve *facies lateralis* olmak üzere iki yüzü, *margo mesovaricus* ve *margo liber* olarak isimlendirilen iki kenarı bulunur. *Broad ligament* adı verilen *mesovarium* ovaryum'un ön kenarına tutunur ve damar, sinir ve lenfatikleri barındırır. Bu yapıların ovaryuma girip çıktıkları yere ise *hilum ovarii* ismi verilir. *Ovarii proprium* aracılığı ile ovaryumun alt ucu *fundus uteri*'nin yan köşesine sabitlenir. Diğer yandan ise *ligemantum supersorium ovarii* adı verilen periton katlantısı da over'i pelvisin yan duvarına sabitler. *Tubal ostium*'dan başlayacak şekilde uterusun her iki lateralinden birer fallopian tüp overlere doğru uzanır ve saçaklı uzantılar ile over'den atılan COC'nin yakalanması işlevini görür, bu yapılara *fimbria ovarica* adı verilir (Şekil 2.2) [66, 67].

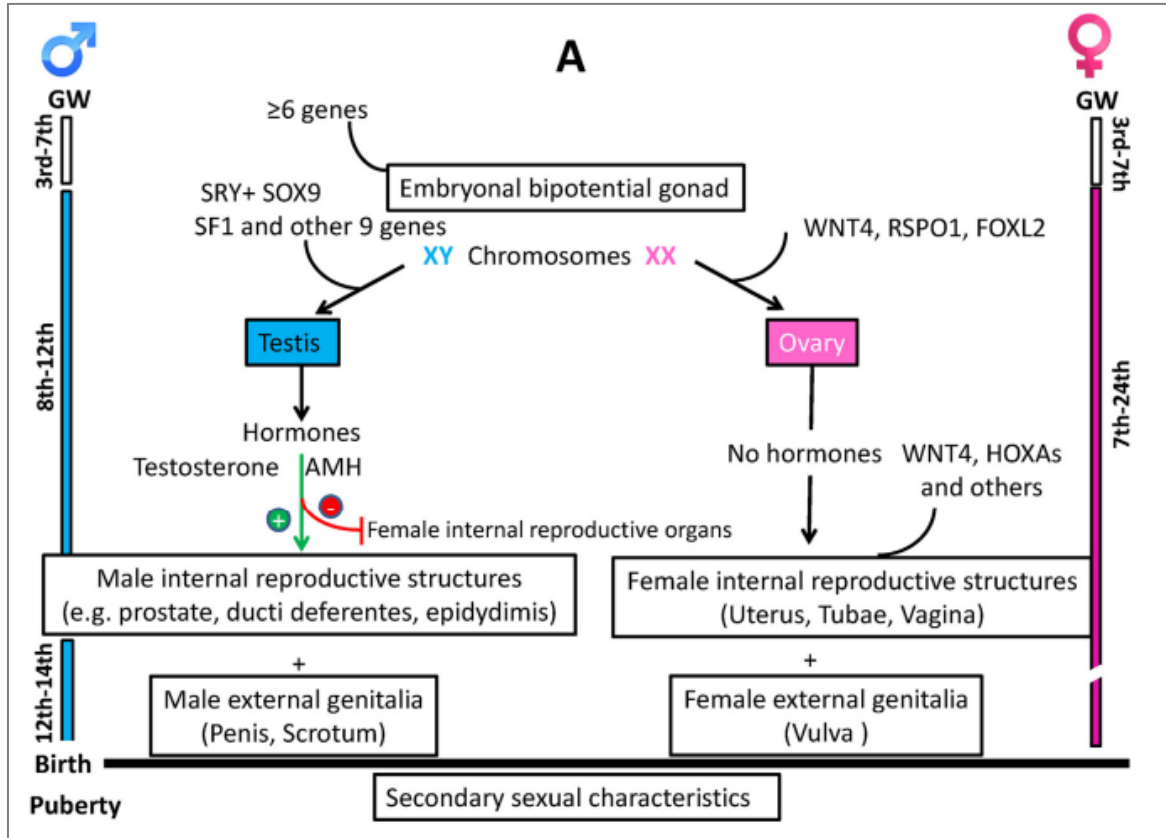


Şekil 2.2. Kadın üreme sistemi anatomisi. Kadın üreme sisteminin posterior görüntüsü (A). Tuba terina ve over'in sağıtal kesit görüntüsü (B) [67]

2.3.1. Ovaryum gelişimi

Gonadların gelişimi boyunca 3 kaynaktan köken alırlar. Bunlar i) karın arka duvar mezoteli, ii) altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve iii) PGH katmanlarıdır. Gonadal gelişim son derece karmaşık bir süreç ile yönetilmektedir. Farklılaşmaya uğramamış tek bir zigot hücresinden XX kromozomu varlığında dişi gonadlar gelişir, XY kromozom setinin varlığında ve Y kromozomu üzerinde bulunan *SRY* geni varlığında ise erkek gonadlar gelişir. *SRY* genlerinin keşfi ile bu karmaşık süreç, özellikle testis gelişimi açısından önemli bir ivme kazanmıştır [68, 69]. Bununla birlikte *Wnt4* geninin keşfiyle birlikte over farklılaşmasında da moleküler yollar üzerine önemli yol katedilmiştir. *Wnt4* geni ve sonrasında buna bağlı moleküler yolların anlaşılması da *FOXL2* ve *RSPOL* gen ürünlerinin keşfiyle daha da derinleşmiştir [70-72].

Gestasyonun 1. haftasında insan embriyolarının gonadal farklılıkları sadece karyotip düzeyindedir. Gelişimin 3. haftasından itibaren embriyonun cinsiyetine özgü olan genlerin aktifleşmesiyle birlikte spesifik gonad gelişimleri başlamış olur. Gelişimin 6-7. haftalarında paramezonefrik (Müllerian kanal) ve mezonefrik (Wolfian kanal) kanallar yanyana gelişirler. Gelişimin 8. haftasında eğer embriyo Y kromozomu ve *SRY* genlerini taşıyorsa testosteron üretimi sağlanır ve mezonefrik kanalların proliferasyonu ile ileride *epididimis*, *vas deferens* ve prostatı oluşturur. Testis gelişimi olmaz ise, yani eğer embriyoda *SRY* genleri bulunmuyorsa, mezonefrik kanallar proliferasyonu olmayıp dejenerasyon olurlar. Buna karşın paramezonefrik kanallar proliferasyonu olur ve ileride fallop tüpleri, uterus ve vajinanın 1/3'lük kısmını geliştirir (Şekil 2.3) [59]. Testis gelişiminin aksine overler, embriyonik dönemde hormonal olarak inaktiftir.



Şekil 2.3. Dişi ve erkek gonadların gelişim aşamalarının şematik reprezentasyonu [73]

Mezodermden köken alan genital sırt, gelişimin 4. haftasında mezonefrozun ventromedial kısmında çöломik eptelin üzerinde kalınlaşır [74]. Yüzey epitelinin kalınlaşması ve genital sırt'ın oluşması *Gata4* ve *Emx2* transkripsiyon faktörlerine bağlıdır [75, 76]. Sonrasında, genital sırtın proliferere olması için gerekli ek genler devreye girer *Six1/4*, *Nr5a*, *Lhx9* ve *Wt1* bunlardan bazılarıdır [77-80]. PGH hücrelerinin primitif gonadlara lokalize olmalarının öncesinde ise genital sırttaki hücrelerin sayısı artar ve mezenşim içerisine gömülürler. Sonuç olarak bu yapılardan primitif cinsiyet kordonlarından oluşan primitif cinsiyet kordonları oluşmuş olur. Gonadlar bu aşamalara kadar farklılaşmamıştır ve gelişimin 10. haftasına kadar over dokusu histolojik anlamda ayırt edilemez [59]. Primitif hücre kordonları düzensiz hücre kümeleri şeklinde organize olup primer olarak overin medulla bölgesinde bulunurlar. Fakat bu yapılar rudimenterdir ve sonrasında kaybolup overin vasküler stroması oluşur. Gelişimin 7. haftasında gonadal yüzey epiteli proliferere olmaya devam edip ikinci nesil kordon olarak tanımlanan kortikal kordonlar gelişir. Bu kortikal kordonlar over yüzeyinden alt bölgede bulunan menezşime doğru penetre olurlar fakat epitel yüzeyine yakın olarak lokalize olmaya devam ederler. Sonrasında PGH'leri de bu yapılara katılmasıyla birlikte oogonia hücrelerine farklılırlar. Gelişimin 16. haftasından itibaren kortikal

kordonların izolasyonu ile birlikte her bir oogonium hücresinin etrafını tek tabaka olacak şekilde sarıp folliküler hücre tabakasını oluşturlar. Oluşan bu tek bir katman folliküler hücrelerden oluşmuş ve merkezinde tek bir oogonium hücresinin bulunduğu bu yapıya primordiyal follikül adı verilir (Şekil 2.1). Bir kısım oogonia hücresi mitoz bölünmeyle proliferer olurken bir kısım oogonia hücresi ise mayoz bölünme yolağına girer ve Mayoz I'ın profaz evresinde arrest'e uğrayıp primer oosit hücresini oluşturur. Oogonia hücrelerinin mayoz yolağına girmesinin devam etmesiyle primordiyal follikül yapılarının sayısı gelişimin 20. Haftasında yaklaşık olarak 7×10^6 sayısına ulaşır [59, 60].

Tüm bu süreçlerin kontrolü merkezi olarak aslında *SRY* gen ürünlerinin kontrolü altındadır. İnsanlarda varsayılan cinsiyet kadın olmakla birlikte PGH hücreleri aslında erkek, yani spermatogonium yolağına girme eğilimi taşımaktadırlar [73]. Cinsiyetin belirlenmesinden önce somatik hücrelerden over gelişimi için gen ekspresyonu açısından testis gelişiminden daha fazla gen grubu aktive olmaktadır [81]. Farelerde yapılan gen ekspresyonu çalışmaları varsayılan cinsiyet gelişiminin dışı üreme sistemi olduğunu destekler. Yapılan çalışmalara göre *SRY* gen ürününü olan *Sox9* geni üzerinde etkili olduğu göstermiştir [82]. SOX9, Sertoli hücrelerinin gelişmelerini tetikler ve hormonal kontrol sonrasında da testis gelişimi gerçekleşmiş olur. *Sox9* geninin *SRY* tarafından herhangi bir sebeple aktive edilmemesi durumunda ise Sertoli hücreleri gelişmeyip yerini pre-granüloza hücreleri alır ve over gelişimi başlamış olur. Bu sürecin ana regülatörü ise *CTNNB1* gen ürünüdür [83]. En basit haliyle testis gelişimi için yüksek SOX9, over gelişimi için ise düşük SOX9 ürünlerine ihtiyaç vardır. *SRY* ve SOX9 yolağının testis gelişimine etkileri literatürde detaylı olarak tanımlanmış olsa da over gelişimini regüle eden gen ve gen ürünlerinin tanımlanması testis gelişimini tanımlayanların aksine yeterli değildir. Hayvan modelleri ve cinsiyet gelişim anomali gösteren hastalar üzerinde yapılan çalışmalar *WNT4*, *RSPO1* ve *FOXL2* genleri ise over gelişimini regüle eden faktörler olarak literatüre kazandırılmıştır. WNT proteinleri transmembran LRP6 reseptörlerine bağlanma yeteneği bulunan büyüme faktörleridirler. LRP6 reseptörüne bağlanan WNT proteinleri *CTNNB1* yolağını aktive ederler [84]. *CTNNB1* seviyelerinin sitozolik olarak artmasıyla hücrenin nükleusuna geçip burada LEF/TCF transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşturulur ve böylelikle çeşitli hedef genlerin ekspresyonu sağlanır. Bu genlerden bir tanesinin *Axin2* olduğu düşünülmektedir [85]. WNT sinyal yolağına pozitif etki eden diğer bir aktivatör ise *RSPO1* proteindir. *RSPO1* ürünü over diferansiyasyonunda için gereklidir [86, 87]. *RSPO* proteini *NRF3* ürününün artmasına, *NRF3* ürünü ise *CTNNB1* yolağının aktif kalması için gerekli olan LRP6

reseptörünün plazmalemma üzerinde sayısının artmasına neden olur [88]. LRP6 reseptörünün sayısının artması sonucu WNT sinyal yolağının etkisi artar ve over farklanması desteklenmiş olur. Farelerde yapılmış *Wnt4^{-/-}* ve *Rspo1^{-/-}* çalışmalarda prematür granüloza hücre farklanması ve sonrasında da farklanmanın tersine döndüğü gösterilmiştir [73, 89, 90].

2.3.2. Ovaryum histolojisi

Henüz doğum yapmamış kadınlarda overler bir çift pembe-beyaz renginde olan organlardır. Overlerin stereoidogenez ve gametogenez olmak üzere iki temel görevi bulunmaktadır. Puberte öncesinde over yüzeyi daha düzenli olmakla birlikte puberte ve menarş ile düzensiz ve skarlı bir görünüm almaktadır. Menopoz sonrasında ise atrofi ile küçülme gösterir. Diğer intraperitoneal organlardan farklı olarak tunika seroza içermeyen overler doğum yapmamış kadınlarda puberte öncesine kadar çok katlı yassı epitel hücreleriyle döşenmiştir. Periton mezotelinden köken alan bu çok katlı epitel hücreleri daha sonra tek katlı ve kübik hale gelip *germinal epitel* olarak adlandırılır [67]. Germinal epitel incelendiğinde periton boşluğuna bakan kısımlarında bol miktarda mikrovillus gözlemlenir ve sitoplazmaları organel anlamında iyi gelişmişlerdir. Germinal epitellerin lateral yüzeylerinde desmozom tipi bağlantı birimleri bulunmaktadır [91]. Overlere beyazımsı rengini veren *tunica albuginea* katmanı ise germinal epitelin altında bulunmaktadır. Temel anlamda histolojik olarak overler 2 ana bölüm barındırırlar. Bunlar, aralarında keskin ve görünür bir sınır bulundurmeyen i) korteks ve ii) medulla kısımlarıdır [65, 91]. Korteks kısmı incelendiğinde oogenezin farklı evrelerinde olan veya atreziye uğramış folliküller, ovulasyon sonra kalan yapıda olan *korpus luteum* ve *korpus albicans* ve bunların arasında dağılmış sıkı bağ dokusu şeklindeki stoma gözlemlenir. Korteks stroması incelendiğinde kollajen ve elastik lifler ile birlikte retiküler lif ağları ve bunları sentezleyen stroma hücreleri gözlemlenir [65, 91]. Overin medulla tabakası incelendiğinde ise korteks'in tersine fibroelastik gevşek bağ dokusu yapısındadır. Medulla stromasında hilus yapısından overe giren kan ve lenf damarları, sinir uzantıları, intersitisyel hücreler ile bağ dokusu hücreleri ve hiler hücreleri gözlemlenir [65, 91].

2.4. Follikülogenez ve Üremedeki Rolü

Overlerin ana fonksiyonlarında biri follikülogenez ile korteks kısmında bulunan primordiyal folliküllerin menarş ile gelişmesi ve ovulasyon ile fallop tüplerine geçmesidir. İnsan neslinin

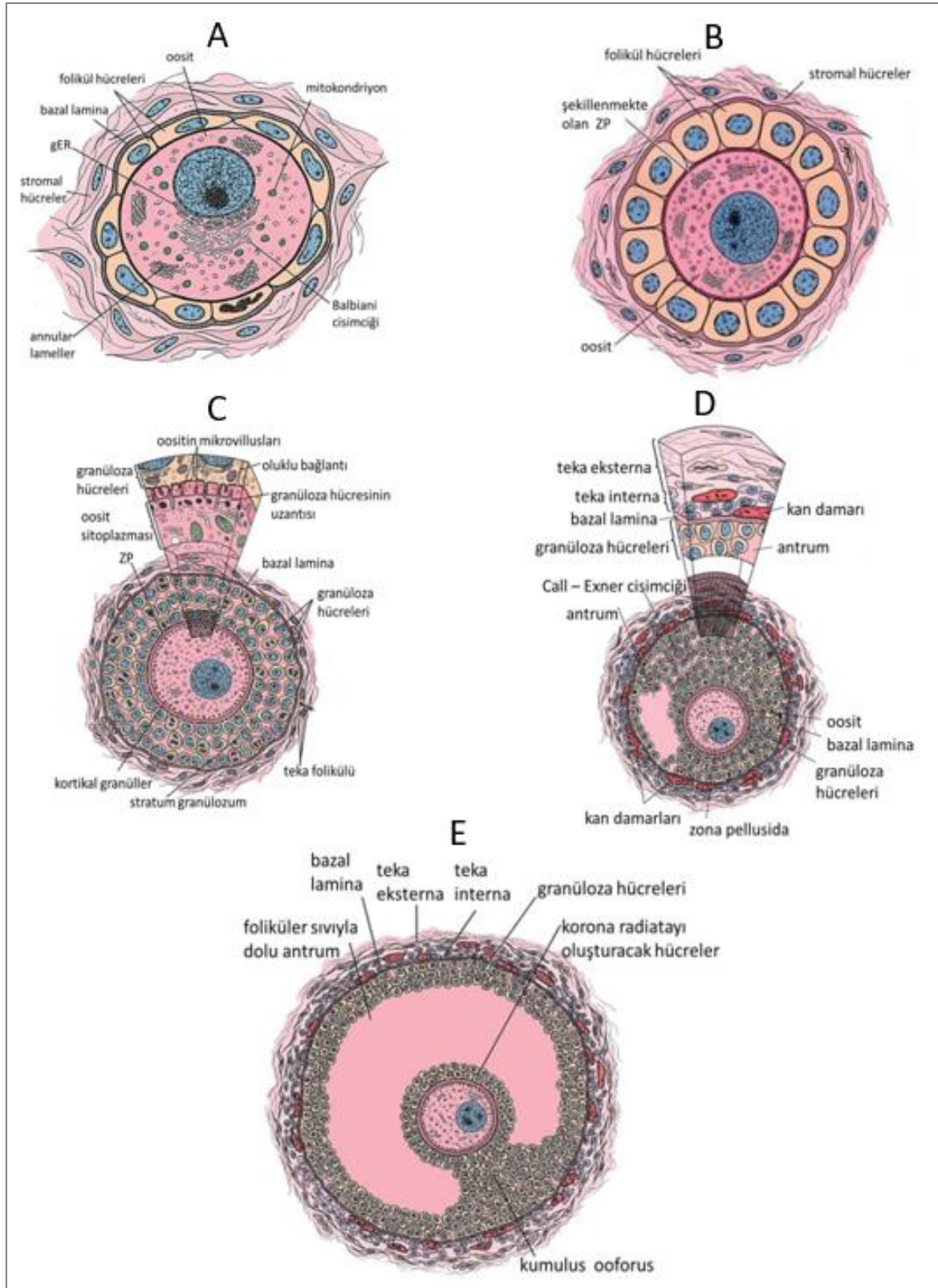
devamlılığı ve üreme sağlığı açısından son derece önemli olan follikülogenez aşamalarının sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi kompetan oosit elde edilmesi açısından elzemdir. Oosit fizyolojisi follikülogenez süreçlerine bağımlı olduğundan kompetan oositin eldesi büyük oranda bu süreçlere bağımlıdır. Bu sebeple, follikülogenez süreçlerinin üreme sağlığı açısından detaylı incelenmesi bu tez konusu kapsamındadır.

2.4.1. Föllikülogenez aşamaları, hormonal ve moleküler kontrolü

Fetal yaşam sırasında gelişmekte olan overler oogonia ile zenginleşir ve bu ooginialardan bir kısmı mayoz yolağına girip primordiyal föllikülleri oluştururlar. Oogonia'ların mayoz yolağına girmesiyle birlikte artık oosit ismini alırlar. Geç gestasyon aşamalarında ise bahsi geçen primordiyal folliküllerin büyük bir kısmı atreziye uğrarlar ve doğumla birlikte artık oogonia hücrelerinin proliferasyonu söz konusu değildir. Dolayısı ile, kadınlar tüm hayatları boyunca taşıyacakları folliküller ile doğarlar.

Yukarıda anlatılan ve primordial folliküllerin ortaya çıkmasıyla başlayan follikülogenez süreci term ile devam etmektedir. Term dönemine yaklaştıkça dejenerasyona uğramayan tüm primordiyal folliküller artık Mayoz I'in profaz evresinde arreste uğramış birer primer oosit hücresi barındırmaktadır. Puberteye kadar devam eden bu süreç sonunda artık Mayoz I'in diploten aşamasında arrest aşamasına geçip ovülasyon süreçlerinin ve sonrasında da mayozu tamamlamak adına sperm tarafından fertilize olmayı beklerler [59]. Primer oositlerin bu aşamada arreste kalmasını sağlayan follikül hücreleri tarafından salgılanan "*oocyte maturation inhibitör* (OMI)" peptid molekülüdür. İleri maternal yaş etiyolojisinde aslında canlı doğum oranlarında düşüşün sebebi de işte bu arrest sürecidir. Bahsi geçen mayotik arrest süreci ne kadar uzun olursa follikülogenez sürecinde mayoz bölünmeye devam edecek oositlerde anöploidi olasılığı o kadar fazla olacaktır [92]. Maternal yaş arttıkça kardeş kromatinleri bir arada tutan kohesin proteinleri degradasyona uğrar ve bu da sonuç olarak kromozom segregasyonunda hatalara sebep olup anöploidi problemlerine sebep açar [92].

Puberte itibariyle üreme çağına girmiş ve menarş süreci başlamış sağlıklı kadınların overlerinde sadece primordiyal follikül yapıları bulunmaktadır. Her menstrüel siklusta primordiyal follikül havuzundan 10-15 primordiyal follikül follikülogenez sürecinde ilerlemesi açısından seçilir. Seçilen primordial folliküller sırası ile 1) preantral-, 2) antral-, ve 3) preovulatuvar (Graffian)-follikül aşamalarından geçer (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Follikülogenez sırasında oosit ve follikül hücrelerinin şematik temsilasyonu. (A) primordiyal follikül, (B) Tek tabakalı primer follikül, (C) çok tabakalı primer follikül, (D) sekonder follikül, (E) Graaf follikülü [59]

Folikülogenez sürecinde ilk görülen olay primer oositi çevreleyen yassı follikül hücrelerinin kübikleşmeye başlamasıdır (Şekil 2.4, B). Unilaminar kübik follikül hücreleriyle karakterize olan bu yapıya tek katmanlı/erken/unilaminar primer follikül ismi verilir. Folikülogenez devam ederken unilaminar kübik follikül hücreleri mitoz bölünme ile çoğalıp çok katmanlı/geç/multilaminar kübik follikül hücrelerinin döşediği primer follikül oluşur. Bu multilaminar yapıya granüloza hücreleri ismi verilmektedir ve granüloza katmanı bir bazal lamina üzerine oturur [65, 91]. Follikülün gelişmesi sırasında oosit hücresi de olgunlaşır ve organel dağılımında farklılıklar gözükür. Özellikle serbest ribozom, mitokondriya, küçük veziküller ve düz endoplazmik retikulum tubuluslarının sayısı artar [65, 91, 93, 94]. Oosit fonksiyonlarının hazırlanmasıyla ilişkili olarak bu organellerin sayısındaki artış ilerideki fertilizasyon ve embriyogenez aşamaları düşünüldüğünde oldukça mantıklıdır. Bu aşamada, oosit hücresi ve onu çevreleyen granüloza hücreleri tarafın *zona pellucida* (ZP) ismi verilen ve glikozaminoglikanlar ve glikoprotein açısından zengin bir protein kılıf belirir [64]. Follikül hücrelerinin unilaminar kübik hücrelere dönüşmesiyle birlikte oosit çapının yaklaşık olarak 50-80 µm çapına gelmesiyle bu glikoprotein kılıf PAS (+) iyice boyanabilir. ZP yapısı incelendiğinde dimerik yapıda olan ZP1, ZP2 ve ZP3 olarak 3 farklı glikoprotein yapısı dikkat çekmektedir. ZP3 proteini, diğer başka proteinler yardımıyla sperm hücresinin ZP üzerine tutunması ve akrozom reaksiyonun başlatılması için bir reseptör görevi görmektedir. ZP1 ve ZP2 proteinleri ise polispermiyi engelleme amacı da içeren başka işlevlerde görev alırlar [95, 96]. Bunlara eş zamanlı olarak ise follikülü çevreleyen stroma hücreleri ise *teka* ismi verilen ve bağ dokudan oluşan bir katman oluşturur. *Teka* katmanı daha sonra granüloza hücrelerine komşu olan *teka interna* ve stromal tabakaya komşu olan *teka eksterna* olacak şekilde iki kısma ayrılır [64]. *Teka interna* tabakası kübik şekilli olan ve steroid üreten hücrelerden oluşmaktadır. Yüzeylerinde “*luteinizing Hormone* (LH)” reseptörü taşıyan bu hücreler LH uyarımıyla östrojen öncülü androjenleri ve -preovülasyon döneminde progesteron ile az miktarda follikül sıvısı ve intrafolliküler “*follicle stimulating hormone* (FSH)” üretirler. *Teka interna* katmanı incelendiğinde fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük kan damarları açısından zengin bir dolaşım sistemi barındırdığından dolayı tipik endokrin organ görünümündedir. *Teka eksterna* tabakası ise *teka interna* tabakasını stromal kompartmandan saran fibröz bağ dokusu ve düz kas hücreleriyle saran bir kapsül görevi görmektedir [64].

GnRH etkisiyle hipofiz bezinden salınan FSH etkisiyle granüloza hücreleri prolifer olmaya ve çoğalmaya devam ederler. Granüloza hücrelerinin çevirdiği oosit hücresi ise artık

yaklaşık olarak 125 µm çapındadır ve hacimsel olarak olgunluğa ulaşmış vaziyettedir. Granüloza hücrelerinin salgıladığı OMI Mayotik bölünmenin arrest kalmasını sağlar. Kübit granüloza hücrelerinin katman sayısı yaklaşık olarak 6-12 hücre kalınlığında geldiğinde multilaminer granüloza katmanı arasında içi sıvı dolu boşluklar ile karakterize yapılar yani *antrum* oluşmaya başlar. *Antrum* içerisindeki sıvı steroidler, hyaluronik asit, büyüme faktörleri ve gonadotropinler açısından zengin bir sıvıdır ve kan damarlarından gelen plazmanın *antrum* içerisine sızmasıyla oluşup adına follikül sıvısı denir. Antrum belirmesiyle artık folliküler yapıya sekonder veya *antral* follikül ismi verilir.

Follikül yapısı bundan sonra oosit hücrelerine göreceli olarak bir kutuplaşma gösterir ve granuloza hücrelerinin oosit hücrelerini sardığı bir tepecik formasyonu gerçekleşir. Bu tepecik görüntüsünü oluşturan granüloza hücrelerine tanımsal olarak kumulus hücreleri denilmekte ve oosit hücresi ile “*cumulus oocyte complex (COC)*” ismi verilir. Folliküller artık gonadotropinlere karşı sensitize olurlar ve viyabl kalabilmek için gonadotropinlere bağımlıdırlar.

Bu aşamadan sonra follikül çapı gonadotropinler varlığında artmaya devam eder ve yaklaşık olarak 10mm çapında veya daha büyük bir çapa sahip olabilir. Follikül çapı artmasıyla birlikte follikül korteks yüzeyinde in indentasyon yapar. Bu yapıya artık Graafian follikül denmektedir ve içerisinde COC yapısında 1 adet olgun primer oosit hücresi içerir. *Antrum*’un genişlemesiyle birlikte multilaminer katman sayısı azalır. *Teka* katmanını daha da belirgin hale gelmekle birlikte sitoplazmalarında lipid damlacıkları birikmesiyle birlikte tipik steroid sentezleyen hücre görünümü alırlar [64]. Bu aşamadan sonra dolaşımdaki hipofiz kaynaklı LH pik seviyesi ile ovülasyon aşamalarına geçilmiş olur. LH pik seviyesini takiben follikül korteks yüzeyine doğru *stigmata* adı verilen bir çıkıntı yapar. Follikül duvarlarında artan prostoglandin miktarı ile *teka eksterna* tabakasında kasılmalar meydana gelir. Buna destek olacak şekilde granüloza hücrelerinde salgılanan plazminojen aktivatör ile follikül sıvısında bulunan plazmin aktif formuna dönüşür ve follikül duvarlarında yıkıma sebep olur. Kasılmalar ve yırtılmalar ile *stigmata* yırtılır ve COC tubal fimbriya’lar yardımı ile intratubal lümene geçmiş olur.

Teka yapıları ise LH hormonun etkisiyle lüteinize, yani sarılaşır ve viabilitelerini çevredeki kan damarları yoluyla sürdürmeye devam eder. Oluşan bu sarımsı yapıya *korpus luteum* adı verilir. *Korpus luteum*’un granüloza hücreleri progesteron ve östrojen salgılayarak teka

interna hücreleri ise androstenedion ve testosteron salgılarlar. Ovüle olan oosit hücresi eğer döllenirse ve implantasyon gerçekleşir ise trofoblast tabakasındaki sinsityotrofoblast tarafından salgılanan “*human chorionic gonadotropin (hCG)*” etkisiyle *korpus luteum* proliferer olur ve gebeliğin devamı için gerekli progesteron hormonunu salgılamaya devam eder. Fertilizasyonun gerçekleşmediği durumlarda ise intratubal oosit dejenerasyona uğrar ve hCG yokluğunda *korpus luteum* dejenerasyona uğrayıp *korpus albicans* denilen skar dokusu haline gelir.

2.4.2. Follikulogenez: Moleküler regülasyonu ve matürasyon

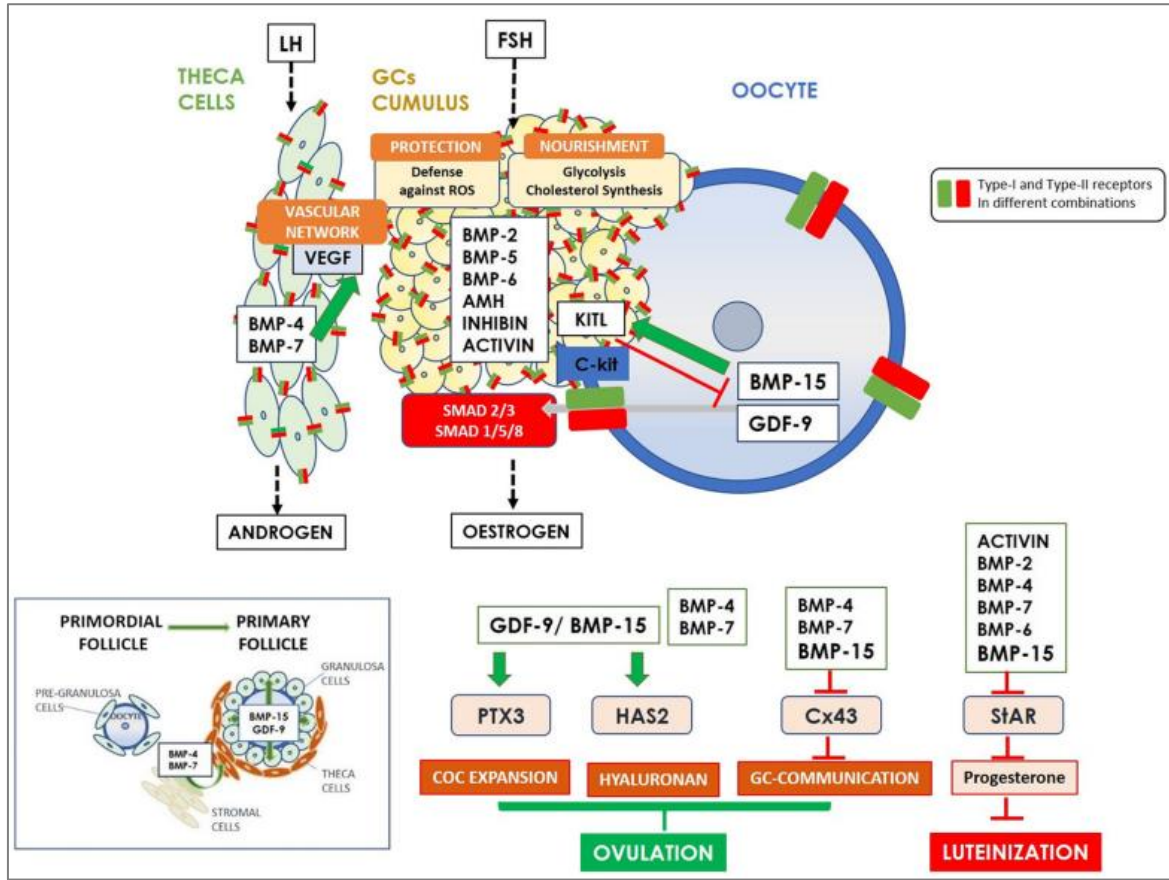
Gelişimsel anlamda kompetan oosit elde edilmesi bir seri karmaşık somatik-germinal interselüler olaylar kapsamına dayanmaktadır. Bu interselüler olayların regülasyonu ise nöral, endokrin, nöroendokrin ve otokrin/parakrin sinyal yollarının birbiriyle sinerjik ve uyumlu şekilde hareket etmesine dayanır. Bu somatik ve germinal hücreler arasında ilişki mayoz bölünme kontrolüne ek olarak oosit hücresinde sitoplazmik bir maturasyonu da sağlamaktadır. Bu sitoplazmik ve nükleer matürasyon ise sonuç olarak sağlıklı bir fertilizasyon ve embriyogenez için olmazsa olmazdır [97]. Lack ve arkadaşlarının 1959 yılında yaptığı ve oogeneze süreçlerinde moleküler kontrol mekanizmalarının aslında oosit tarafından regüle edildiği ilk deneyler yapılmıştır [98]. Bu deneylerde, tavşan follikülleri ektopik bölgelere yerleştirilmiş ve aslında oositin lüteinizasyon inhibitörünün kaynağı olduğu gösterilmiştir. Daha sonrasında 1970’li yıllarda yapılan deneylerde oosit hücresinin follikül içerisinde ablasyonunda follikulogenez sürecini bloke edebildiği gösterilmiştir [99, 100]. Bu deneyler sonucunda aslında oositin gerek granüloza gerekse kumulus hücrelerinin regülasyonunda önemli roller oynadığı bulguları son 30 yıldır follikulogenez çalışmaları arasında önemli yer tutmaktadır. Günümüzde ise oosit hücresinden salgılanan faktörlerin granüloza hücreleri üzerinde mitotik etkisinden başka FSH, büyüme faktörü ve androjen sentezi üzerine de önemli etkilerinin olduğu gösterilmiştir [101-105]. Oosit hücrelerinden salgılanan faktörler ile anti-apoptotik faktörü olan Bcl-2 proteini sentezinin granüloza hücrelerinde artırır ve pro-apoptotik faktörü olan Bax proteini sentezini ise azaltır. Dolayısıyla gerek granüloza gerekse kumulus hücreleri oosit hücreleri tarafından salgılanan faktörler tarafından apoptosis’e karşı korunmaktadırlar [106]. Buna ek olarak ise “*transforming growth factor- β (TGF- β)*” ailesi faktörleri granüloza hücreleri tarafından yeterli lüteinizasyonla progesteron salınmasını engellediği gibi over fonksiyonları için de gereklidir [107]. TGF- β ailesi üyelerinden olan “*bone morphogenic proteins (BMP)*” ve

“*growth differentiation factors* (GDF)” follikülogenezin regülasyonu üzerine önemli otokrin/parakrin görevler üstlenmektedirler [107]. *Teka* hücreleri tarafından sentezlenen BMP-4 ve BMP-7 faktörlerinin rat granüloza hücreleri üzerinde HSF-bağımlı progesteron üretimini azalttığı halde FSH-bağımlı östrojen üretimini stimüle ettiği gösterilmiştir [108]. Yine TGF- β ailesi üyesi BMP-15 ve BMP-6 faktörlerinin ise aynı şekilde FSH-bağımlı progesteron üretimini baskıladığı fakat östrojen sentezine etki etmediği belgelenmiştir [109]. BMP-7 faktörü ise vasküler büyümeyi VEGF faktörü üzerinden regüle eder ve folliküler anjiyogenez ile damarlanma yollarını aktive edip follikülün beslenmesini sağlar [110, 111]. Oosit kaynaklı TGF- β ailesi üyesi faktörlerden GDF-9 ve BMP-15 follikülogenez sürecinde kilit görevler üstlenir ve çeşitli infertilite etiyolojilerinde de bu iki faktörün sinyal yollarında anomalilik tespit edilmiştir [112-115].

2.4.3. GDF-9 ve BMP-15 sinyal yolları

BMP-15 faktörü X kromozomu üzerinde kodlanır ve primordiyal follikül içerisindeki primer oosit ve sonraki aşamaların hepsinde salgılanır [115]. GDF-9 faktörü ise 5 numaralı kromozomun q kolunda kodlanır ve unilaminar follikül aşamasından itibaren ovulasyona kadar aşamaların hepsinde oosit tarafından salgılanır [116]. GDF-9 ile BMP-15 arasında aminoasit sekansı açısından yüksek düzeyde homoloji gözlemlenir ve bu sebepten dolayı GDF-9/BMP-15 heterodimeri oluşumu gözlemlenir. Bu yapıya kumulin adı verilmiş ve hem granüloza hücreleri hem de kumulus hücreleri fonksiyonlarında önemli regülasyon görevleri üstlenmiş ve oosit kalitesi ile korelasyon olduğu saptanmıştır [117, 118]. Oosit hücrelerinden salgılanan GDF-9 ve BMP-15 proteinleri granüloza hücreleri üzerinde bulunan kendilerine özgü reseptörlere bağlanıp granüloza hücrelerinin metabolik ve döngüsel regülasyonunu sağlamaktadırlar. Bu fonksiyonlar arasında over fonksiyonlarını regüle eden granüloza hücre proliferasyonu, farklılaşma, steroidogenez, apoptoz ve kumulus ekspansiyonu vardır [101, 102, 119-121]. GDF-9^{-/-} farelerde graafian follikül gelişiminin gerçekleşmediği ve bu farelerin infertil olduğu gösterilmiştir [119]. Farelerin fenotipleri incelendiğinde primer follikül aşamasının ilerisinde herhangi bir follikül gelişimi gözlemlenmemiş ve ovülasyonun gerçekleşmemesi sebebiyle de bu fareler gebelik elde edememiştir. Erken gelişim aşamalarına kadar normal mayotik gelişim gösteren bu oositlerin hacmi normal oositlere kıyasla %70 oranında artmış olarak gözlemlenmiş ve morfolojik anlamda kortikal granüllerin yokluğu ile birlikte germinal vesikül etrafında organel gruplanmalarında artış görülmüştür. Granüloza hücrelerinde ise mitotik aktivitenin düşmüş olması, hücreler

üzerinde FSH reseptörünün bulunmaması ve apoptozun yokluğu ise dikkat çekmektedir. BMP-15^{-/-} fare modellerinde ise GDF-9 molekülünde olduğu gibi dramatik bir etki gözlemlenmemiştir. Bu farelerdeki follikulogenez süreçleri incelendiğinde mutasyon sonucu follikül gelişiminde minimal etki yarattığı fakat hasarın daha çok ovülasyon süreçleri, kumulus ekspansiyonu ve sonuç olarak fertilizasyon süreçlerine etki ettiği bulunmuştur [122, 123].



Şekil 2.5. TGF-β ailesi üyesi major proteinlerin over fonksiyonları üzerine olan etkilerinin şematik reprezentasyonu [124]

BMP-15 molekülünün follikül matürasyonu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Gonadotropin stimülasyonuna tepkisiz olunan evrelerde granuloza hücrelerinin FSH hormonuna tepkisinin regülasyonunu sağlayan BMP-15 molekülü granuloza hücrelerinin apoptoza yolağına girmesini engeller. GDF-9 ve BMP-15 moleküllerinin granuloza hücrelerinde gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Bunlara örnek olarak, Kit Ligand (KITL) oosit büyümesi için kritik öneme sahiptir ve bu proteinin kontrolü parakrin faktörler ve hormonal kontrol ile sağlanmaktadır [101]. GDF-9 molekülünün KITL üzerinde

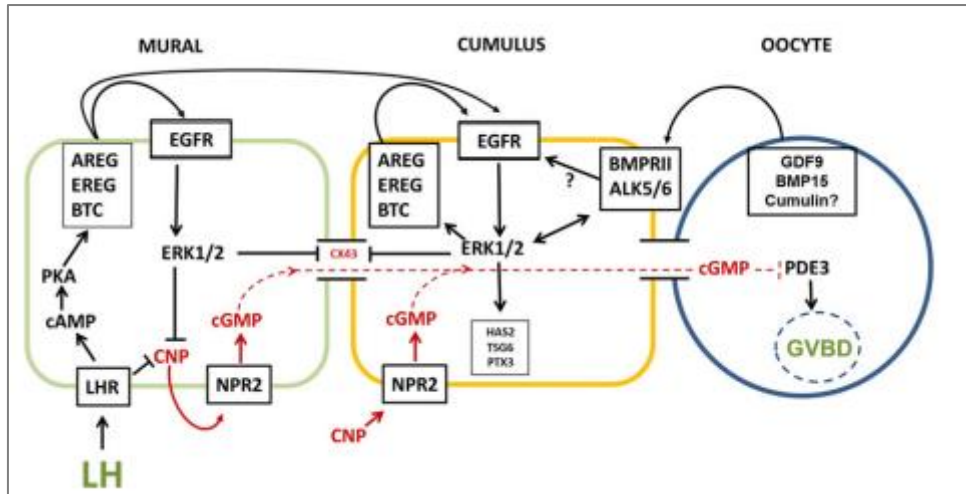
anatagonist bir etkiye sahip olduğu, BMP-15'in ise agonist bir etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla belgelenmiştir. Ek olarak, her iki molekülün aynı zamanda granüloza hücrelerindeki glikoliz ve kolesterol sentezi üzerine de pozitif etkilerinin olduğu bilinmektedir. Özellikle bu iki biyokimyasal yolak oosit hücrelerinin yüksek düzeyde ihtiyaç duyduğu pirüvat, laktik asit ve kolesterol bileşenleri oluklu bağlantılar aracılığı ile oosit hücresine sağlanmaktadır [103, 125]. Oosit kompetansı ile alakalı olan ve kumulus hücrelerinin ekspansiyonu ile karakterize olan kumulus ekspansiyonu yine BMP-15 ve GDF-9 moleküllerinin etkisi altındadır. COC ekstraselüler matriks ana komponenti olan hyaluronik asit, granüloza hücreleri tarafından “*hyaluronan synthase 2 (Has2)*” enzimi tarafından sentezlenir. Bu enzimin ekspresyonu ise LH ile artmaktadır. BMP-15 ve GDF-9 moleküllerinin ise Has2 ekspresyonu üzerinde tetikleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [117, 126].

GDF-9 ve BMP-15 proteinlerinin follikülogenez ve oosit kompetansına olan kritik etkilerinin literatüre kazandırılmasıyla insanlardaki olası defektleri klinik alanda da yer kazanmıştır. GDF-9 seviyelerinin folliküler sıvıdaki seviyeleri gerek oosit matürasyonu ve kalitesi gerekse bu oositlerden edilen embriyo kaliteleri ile ilişkilendirilmiştir [127]. BMP-15 ise insan üremesinde çeşitli aşamalarda kritik olabileceği belgelenmiştir. GDF-9 mutasyonlu kadınlarda artmış dominant follikül sayısı bulunabilmektedir ve bu durum dizigotik ikizlik olasılığına arttırabilir [128, 129]. PCOS tanısı almış kadınların oositlerinden artmış miktarda GDF-9 ve BMP-15 miktarları gösterilmiş olsa da bu kadınlardan elde edilen kumulus hücrelerinde azalmış GDF-9 ve BMP-15 seviyeleri olduğu gösterilmiştir [130]. Bu durum PCOS tanılı kadınlarda prematür lüteinizasyon, kötü oosit kalitesi ve lteal disfonksiyona sebep açabilmektedir.

2.4.4. EGF sinyal yolakları ve oosit matürasyonu

Granüloza hücreleri antral follikül evresinde iki farklı hücre popülasyonu haline gelir. Bu hücre popülasyonları follikül duvarını çevreleyen i) mural granüloza hücreleri ve oosit hücresini çevreleyen ii) kumulus hücreleridir. Pre-ovülatuar LH yükselmesi hem folliküler hücrelerde hem de oosit hücresinde bazı dramatik değişikliklere sebep olmaktadır. Bunlar, oosit hücresinde mayozun yeniden devam etmesi, cumulus hücrelerinde gerekli adaptasyonun sağlanabilmesi için özellikle hyaluronik asit sentezi ve mural granüloza hücrelerinde lteinizasyonun sağlanması olarak özetlenebilir. LH'nın mural granüloza

hücrelerine extraselüler LH reseptörü ile sağlanmaktadır. Fakat, kumulus hücrelerinde LH reseptörü oldukça düşük miktarda bulunduğundan LH ile tetiklenen sinyal yolağı başka yollarla kumulus hücrelerine iletilmek zorundadır [131]. Bu baskılanmanın sebebi ise kumulus hücrelerinin prematür lüteinizasyonu ile oosit gelişimi ve matürasyonu için sub-optimal bir mikro çevre yaratılmasını önlemek olabilir [132]. Pre-ovülatuar folliküllerde kumulus hücrelerindeki LH reseptör eksikliği ise EGF sinyal yolları ile aşılmakta ve LH seviyesindeki yükseliş kumulus hücrelerine bu yolla iletilmektedir [133]. Mural granüloza hücrelerinde EGF molekülleri (ANEG, EREG, BTC) *antrum* içerisine salınmakta ve bu moleküllerin kumulus hücreleri üzerinde bulunan EGF-reseptörlerine (EGFr) bağlanmasıyla kumulus ekspansiyonu ve mayozun yeniden başlaması sağlanmaktadır (Şekil 2.6). LH reseptörü, “*G protein-coupled receptor*” yapısında olan bir reseptördür ve mural granüloza hücrelerine bağlandığında adenil siklaz enzimini aktive eder. Siklaz enziminin aktive olmasıyla birlikte sitoplazmik cAMP miktarında bir artış gerçekleşir ve bu sekonder sinyal molekülündeki artış EGF proteinlerinin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanır [134]. ANEG, EREG ve BTC antrum içerisine salınır ve bu EGF molekülleri kumulus hücreleri üzerinde bulunan EGF reseptörlerine bağlanır. Kumulus hücreleri üzerinde bulunan EGF reseptörleri “*transmembrane receptor tyrosine kinase (RTK)*” yapısında olup ligand bağlantısı yaptığında ERK1/2 hedef moleküllerinde değişiklik yapıp kumulus ekspansiyonu ve mayotik arrest’in kaldırılması gibi önemli görevlerin gerçekleşmesini sağlar [135].



Şekil 2.6. LH hormonunun mural granüloza etkileri. LH hormone mural granüloza hücreleri üzerindeki LH reseptörüne bağlanıp EGF ve benzeri peptidlerin salınmasını (AREG, EREG, BTC) sağlar ve LH yükselmesiyle başlayan sinyal yolağını EGF ile cumulus hücrelerine iletir [136]

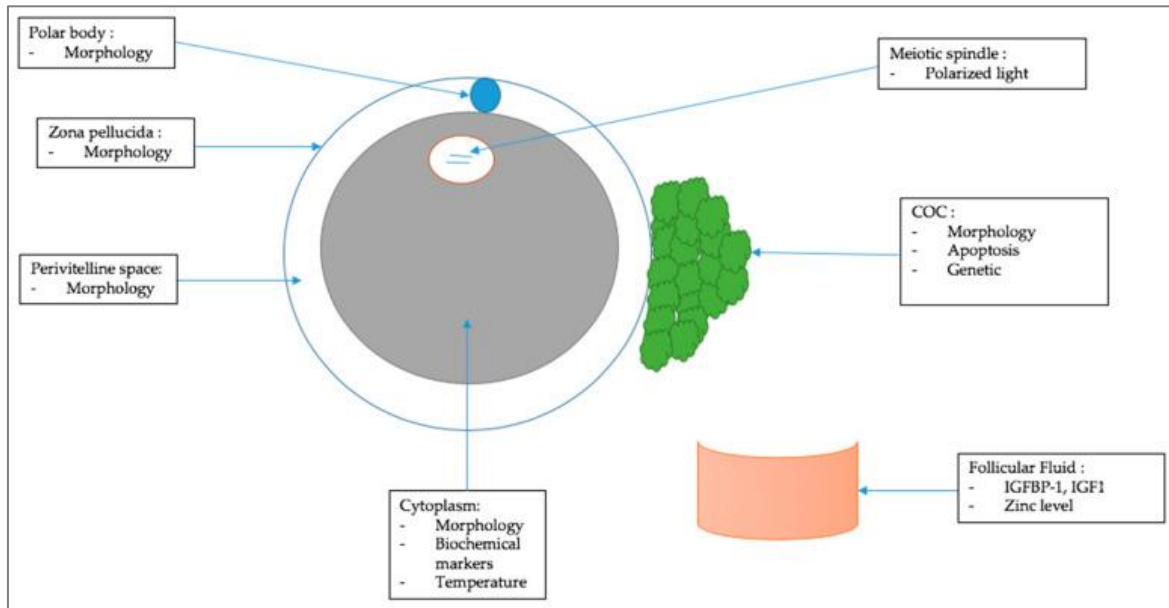
2.5. Oosit Kompetansı ve Üremedeki Rolü

Vücudumuzdaki tüm süreçlerin gerçekleştirilmesi aslında ortak görevi paylaşan çok sayıdaki hücre gruplarının oluşturduğu ağ tarafından yürütülmektedir. Bu hücre topluluklarının oluşturduğu yapılar en basit anlamıyla organ olarak adlandırılabilir. Fakat, üreme söz konusu olduğunda tek bir oosit hücresinden çok fonksiyonlu ve son derece kompleks bir görev beklenmektedir. Kadınlar yaşamları boyunca yaklaşık olarak 400 oosit hücresi ovulasyonu yapmaktadırlar. Bu ovulasyonların yaklaşık olarak yarısı üreme çağlarında gerçekleşmektedir. Kadınların doğuştan itibaren yaklaşık 1,000,000 oosit hücresi ile doğdukları bilinmektedir. Üreme gibi son derece katmanlı bir süreç için çok küçük bir hücre popülasyonuna bu ölçekte büyük bir sorumluluk verilmesi felsefi açıdan tartışılması gereken bir konudur. Bahsi geçen ve ovülasyonla sonuçlanabilen yaklaşık 400 oosit hücresindeki yapısal veya fizyolojik bozukluklar üreme fonksiyonları açısından büyük ve katastrofik sonuçlara sebep açabilirler. Bunlar özetle; fertilizasyon başarısızlığı, klivaj başarısızlığı, embriyonik arrest, implantasyon başarısızlığı ve gebelik kaybı olarak sıralanabilir. Üreme çağında gerçekleşen spontan gebelikler incelendiğinde bu gebeliklerin 1/4-5 gibi önemli oranda kayıpla sonuçlandığı görülmektedir. Buna karşın, YÜT ile elde edilen embriyoların sadece %15 gibi küçük bir kısmının canlı doğum ile sonuçlandığı da düşünüldüğünde, sözü geçen yaklaşık 400 oosit hücresine yüklenen sorumluluğun boyutu daha iyi anlaşılabilir. Tüm bunlara ek olarak kadın yaşına bağlı olarak artan anöplöidi oranları ile insan üremesindeki riskler artmaktadır.

Bir oosit hücresinin nükleer ve sitoplazmik matürasyonunu tamamlaması, fertilize olabilmesi potansiyeline sahip olması, fertilizasyon sonrası *in vitro* viyabl embriyogenez sürecini tamamlayabilmesi, implantasyon sonrası gebelik oluşturabilmesi ve canlı doğumla sonuçlanabilmesi onu kompetan oosit olarak tanımlar. Oosit hücrelerinin bu özellikleri birçok intrinsek ve ekstrinsik faktörün etkisi altındadır. Bunlar, genetik ve epigenetik faktörler [137, 138], mitokondriyal [139, 140], nükleer ve sitoplazmik matürasyon [141, 142], hormonal etkenler [102, 143] ve çevresel faktörler [144, 145] olarak özetlenebilir.

Bahsi geçen ve oosit kompetansı olarak adlandırılan bu potansiyelin standart bir şekilde ölçülebilir olması günümüz YÜT tedavileri açısından kritik bir öneme sahiptir. Günümüzde her bir embriyo transferi sonrası gebelik oranı yaklaşık olarak %35 oranındadır [146]. Embriyonun gelişim ve implantasyon potansiyelini, yüksek oranda oosit kompetansı

belirlediğinden dolayı bu hücrelerin invaziv olmayan şekillerle skorlanması ve kalitelerinin belirlenebilir olması YÜT başarısı ve performansı açısından paha biçilmez olacaktır. Geleneksel olarak oosit kompetansı mikroskobik yöntemler ile ölçülmektedir. İnvaziv olmayan mikroskopi tekniklerinin ise niteliksel ve subjektif sonuçlar vermesinden dolayı kullanımları oldukça limitli ve klinik çıktılar açısından da düşük korelasyon sağlamasından dolayı anlamsız olabilmektedir [147]. Bu sebeple, literatür incelendiğinde, oosit kalitesinin invaziv olmayan metotlar kullanılarak nicel, objektif ve standart teknikler kullanılarak incelenmesi konusu detaylı şekilde araştırılmıştır [147]. Bu tekniklerden bazıları direkt olarak oosit kalitesini farklı mikroskopi teknikleri kullanılarak araştırılmasıyla, diğerleri ise indirekt yollarla farklı biyolojik materyal kullanarak (granuloza/kumulus hücreleri ve folliküler sıvı) incelenmesiyle veri elde edilmeye çalışılmıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Oosit kalitesinin niteliksel ve niceliksel olarak incelenmesini sağlayan materyaller ve parametreler [147]

Ooplazmanın geleneksel yöntemlerle vital olarak mikroskobik incelenmesi oosit kalitesinin birincil değerlendirme metodudur. Doğal olarak ooplazma özellikleriyle alakalı çok sayıda çalışma ve derleme bulunmaktadır [148]. Ooplazma ile alakalı sitoplazmik dismorfizmler ilk olarak Van Blerkom ve Henry tarafından 1992 yılında raporlanmış bu dismorfizmlerin erken embriyo gelişimlerine olan etkileri belirtilmiştir [149]. Normal ooplazma tanımı homojen bir sitoplazma ve sitoplazmik eklentilerin granülarizasyonun yokluğu, organel gruplanmasının ve vakülllerin barınmadığı ooplazma için mevcuttur [148]. Ooplazmanın

granüler olma sıklığı aslında oldukça fazladır. Bu potansiyel anomalinin sebepleri yeterince anlaşılmış değildir, fakat, folliküler fazdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Granüleritenin diğer sitoplazmik anomalilerden farklarının anlaşılabilmesi için ışık mikroskobu altında iyi analiz edilmelidir. Özellikle refraktif ve lipofuskin cisimlerden [150] ve organel topluluklarından [148] iyi ayırt edilmeleri önemlidir. Bugüne kadar bildirilmiş en patolojik ooplazmik dismorfizm “*smooth endoplasmic reticulum* (SER)” kümelenmesidir. Geçmişte yapılan çalışmalara göre SER kümelenmesi bulunan oositler insemine edilmemeli ve aynı kohort’tan elde edilmiş kardeş oositler SER varlığı açısından detaylı araştırılmalıdır [151, 152]. SER kümelenmesi bulunan oositlerle elde edilmiş gebeliklerde fetal kayıplar ve Beckwith-Wiedemann Sendromu gibi bazı “*imprinting*” hastalıklara sebep açabileceği bilinmektedir [153]. Buna karşı olarak, daha güncel yayınlarda aslında SER kümelenmesi ile de sağlıklı gebelik ve canlı doğum elde edilebileceği gösterilmiştir [154, 155]. Xu ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yapılan ve SER kümelenmelerini inceleyen çalışmada 43 SER- ve 43 SER+ olgularından elde edilmiş embriyo transfer siklusları sonrası klinik gebelik oranlarında (%55,81 vs %65,11, p: 0,5081), implantasyon oranlarında (%47,89 vs %50,70, p: 0,8667) ve canlı doğum oranlarında (%48,84 vs %55,81, p: 0,6659) istatistiki olarak anlamlı farklılık gösterilmemiştir [154]. Morfolojik anlamda oosit morfolojisinin kesinlikle etki ettiği en belirgin patoloji dev oosit oluşumudur. Dev oosit olgularında oositlerin nükleer matürasyonunu belirli sebeplerle tamamlayamadığı durumlarda oluşur ve bu oositler normal ooplazma miktarının yaklaşık hacim olarak 2 kat olması ile karakterizedir. Bu durumun prevalansı ise oosit kohortunda %0,26 hasta popülasyonunda ise %7,6 ile oldukça düşük görülmektedir [156]. Fakat, prevalansının düşük görülmesiyle birlikte bu oositlerden elde edilen zigotların triploidi (3PN) göstermesiyle karakterize sonuçlar doğurmaktadır [156]. Bir diğer dismorfizm olgularından olan ooplazmada vakuol gözlemlenmesi yine dikkat edilmesi gereken unsurlardan bir tanesidir. Özellikle SER kümelenmesinden ayırt edilmesi kolay bir dismorfizm olan vakuolarizasyon ebatlarına bağlı olarak önemli sonuçlara sebep açabilir. Az sayıda 5-10µm çapındaki vakuollerin zigot, embriyogenez ve klinik sonuçlara etki etmesinin daha az ihtimal olduğu $\geq 14\mu\text{m}$ çapındaki vakuollerin ise fertilizasyon, klivaj ve blastokist oranlarına etki edebileceği bildirilmiştir [148].

Mikroskopik olarak geleneksel yöntemler kullanılarak morfolojik anlamda incelenen ve oosit kalitesi ile klinik embriyologlara bilgi sağlayabilen parametrelerden diğer bir tanesi ise birinci kutup cisimciğidir. Oosit matürasyon evreleri sırasında asimetrik olarak bölünen oosit hücresinden ilk aşamada 1 adet küçük hücre ayrılmaktadır. Bu küçük hücrenin içerisinde 23

kromozom bulunur ve mayoz bölünme ile kromozom sayısının haploid özelliğe geçmesi açısından bu kutup cisimciğinin oosit bünyesinden atılması önemlidir. Yapılan çalışmalara göre kutup cisimciğinin bütünlüğü, şekli ve ebatları oosit kalitesinin anlaşılması ve ovülasyon sonrası *in vitro* yaşlanmanın anlaşılması için kullanılabilmektedir [157, 158]. Kutup cisimciğinin regüler ve doğru ebatlarda olduğu oositlerde ICSI sonrası daha yüksek fertilizasyon oranları ve morfolojik anlamda daha iyi embriyo kalitesi göstermesi bu parametrenin kullanımını desteklemektedir [146, 159]. Fakat, kutup cisimciğinin analizi subjektif bir metot olduğundan dolayı tam tersini savunur şekilde kutup cisimciği incelemesinin klinik çıktılar üzerine etkisinin olmadığı da gösterilmiştir [151, 158, 160]. Çalışmalardaki gerek metodolojik gerekse bulgusal heterojenite sebebiyle kutup cisimciğinin oosit kalitesinin incelenmesi amaçlı kullanımı son derece limitli olarak değerlendirilmelidir. Oosit nükleer matürasyonundaki genel algı birinci kutup cisimciği varlığında metafaz II aşamasında mayotik arrest olunduğu ve oositin doğru matürasyon aşamasında olduğu üzerine kurgulanmıştır. Fakat, yapılan güncel çalışmalar ile faz kontrast ışık mikroskopisi ile bu durumun aslında yanıltıcı olduğu ve polarize ışık mikroskopisi ile nükleer matürasyonun daha doğru tayin edilebileceği yönünde güncel bilgiler bulunmaktadır [161]. Polarize ışık mikroskopisi ile metafaz plağının “*birefringent*” (çift kırılma) özelliğinden faydalanarak gözlemleyebilmek mümkündür. Metafaz plağının gözlemlenebildiği oositlerde fertilizasyon ve embriyogenez potansiyelinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir [160, 161]. Buna karşın, geniş kapsamlı ve yeterli güçteki meta-analiz sonuçlarına göre metafaz plağı varlığı gösteren oositlerdeki bu potansiyelin klinik parametrelere yansımadağı sonucuna ulaşılmıştır [162]. Bunun sebebi ise aslında çalışmalarda kullanılan metodolojilerin metafaz plağının dinamik yapısını göz ardı etmeleri olarak özetlenebilir. Bilindiği üzere iğ ipliklerini oluşturan actin filamenleri dinamik bir şekilde matürasyon sürecinde monomerize ve polimerize olabilmektedir. Metafaz I aşamasından birinci kutup cisimciğinin atılması sürecine kadar metafaz yolağının kaybolup geri oluştuğu daha önce belgelenmiştir. Daha da önemlisi ise metafaz plağının laboratuvar da uygulanan girişimlerden etkilenebilmesidir [163-165]. Metafaz plağının varlığına ek olarak ise birinci kutup cisimciğine göre göreceli olarak metafaz plağının lokalizasyonunun da oosit kompetansının tayininde etkili olabileceği gösterilmiştir. Plağın birinci kutup cisimciğine göreceli olarak %90 fark göstermesi durumunda fertilizasyon oranlarında azalma beklenmelidir [163]. Bu durum fizyolojik nedenlere dayandırılabilceği gibi ICSI esnasında metafaz plağının fiziksel hasar almasından da kaynaklanabilmektedir. Rutin ICSI işlemi sırasında genel pratik birinci kutup cisimciğinin saat 6 veya 12 hizasında işlemin

geçekleşmesi olduğundan işlem sırasında metafaz plağına fiziksel zarar gelmesi daha olası olacaktır.

Oosit hücresi tarafından üretilen *zona pellucida* glikoprotein kompleksi de indirekt olarak oosit kompetansının ölçülebileceği parametreler arasındadır. Primer olarak oosit hücresi tarafından üretilmesi sebebiyle bu glikoprotein kompleksi üreticisinden gelen defektleri de taşıyabilmesi sebebiyle klinik uygulamalarda rutin olarak oosit kalitesinin tayini açısından incelenmektedir [95]. Bazı çalışmalara göre *zona pellucida*'nın morfolojik olarak olumlu değerlendirmesiyle fertilizasyon oranları arasında ilişki kurulmuştur [146]. Buna karşın, literatürde bu çalışmaların tersini destekler bulgular da mevcuttur [159]. Bu sebeple, *zona pellucida* özelliklerinin incelenmesiyle objektif ve standart olarak oosit kalitesi hakkında bilgi edinmenin diğer parametrelerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir [147]. Zona pellucida ile bağlantılı olarak *perivitallin* aralık (PVA) da oosit kalitesinin anlaşılması açısından önemli sayılabilir. Çeşitli çalışmalara göre elde edilen oositlerde geniş PVA görülme oranı 1/3 gibi yüksek bir orandadır. PVA'nın geniş olduğu oositlerde ise azalmış fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesi görme oranı fazladır [166, 167]. Geniş PVA gözlemlenen oositlerle yapılan çalışmalarda bu oositlerin post-matür olduğu konusunda bulgular bulunmaktadır [168, 169].

Yukarıda detaylarıyla açıklanmış intra/extra-ooplazmik faktörler bütünsel olarak incelenmeli ve YÜT tedavisi sırasında görülen tüm dismorfizm ve diğer anomaliler hasta dosyasına kalite standartları gereği not edilmelidir. YÜT başarısını arttırmak adına oosit kohortunda mümkün olan en yüksek gelişimsel potansiyele sahip oositlerden elde edilen embriyoların transfer aşamasında önceliklendirilmesi gebeliğe ulaşma süresinin kısaltılmasına katkıda bulunacaktır. Klinik olarak anlamlı bulguların 2011 yayımlandığı ESHRE/ALPHA İstanbul “*Consensus*” makalesi literatürde mevcut olmakla birlikte klinik embriyologlar için bir kılavuz niteliği taşımaktadır [148]. Ortak görüş niteliğinde olan kılavuz, bu tezin yazıldığı zamanlarda güncellenme aşamasındadır ve yukarıda bahsedilen özellik ve parametrelerde yakın zamanda bir güncellenme olması beklenmektedir.

2.6. Kumulus-Oosit Kompleksi

Foliküler *antrum* oluşumu sırasında follikül duvarını çevreleyen granuloza hücreleri mural granuloza hücreleri ismi verilen hücreler halini alırlar. Oosit hücresinin yakınlarında olan

hücrelere ise kumulus hücresi ismi verilir. Oosit hücresini saran hücrelere ise *corona radiata* ismi verilir ve bu hücreler sitoplazmik projeksiyonlar ile *zona pellucida*'yı geçip oolemma ile gap junction bağlantılar yaparlar. Bu organize yapının bütününe kumulus-oosit kompleksi ismi verilir.

2.6.1. Kumulus-oosit kompleksi ve biomarker ilişkisi

YÜT tedavilerinin keşfedilmesi itibariyle klinik anlamda en kompetan oositten elde edilmiş embriyoların, tedavinin transfer aşamasında önceliklendirilip gerek gebeliğe ulaşma süresinin kısaltılması gerekse tek embriyo transferi ile tekil ve sağlıklı gebelik elde edilmesi hedeflenmiştir. YÜT tedavilerindeki hatırı sayılır teknolojik ve fizyolojik ilerlemelere rağmen maalesef bu konuda halen anlamlı bir ilerleme kaydedilememiştir. Gerek KOH ilaç protokollerinde, gerekse embriyoloji laboratuvarı girişimlerdeki gelişmelere rağmen YÜT ile elde edilmiş embriyoların yaklaşık %50 gibi bir kısmı blastokist evresine ulaşabilmekte, bu embriyoların transferi sonrası da yaklaşık %38 oranında canlı doğum elde edilebilmektedir [170]. Bu sebeple, YÜT uygulamalarında birden fazla embriyonun reseptif bir endometriyuma sahip uterin kaviteye transfer edilmesi gebelik ve canlı doğum oranlarını arttırmak adına yapılan yaygın uygulamalardan bir tanesidir. Buna karşın, oosit hücrelerinin yakın ilişki kurduğu ve oosit kompetansı ile direkt veya indirekt yollarla ilişki olan kumulus hücrelerinin bir “*biomarker*” olarak kullanılabilmesi fikri gelişmiş ve bu konuda çeşitli temel bilim dallarından klinik çalışmalar yayımlanmıştır [171]. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda glukoz metabolizması (PFKP), kalsiyum homeostazı (CAMK1D), COC ekstraselüler matriks komponentleri (HAS2, VCAN), TGF- β ailesi (BMP-15, GDF-9) ve prostoglandin sentezi (PTGS2) ile alakalı mRNA miktarının artmış olarak gözlemlenmesi oosit kalitesi, fertilizasyon, embriyo kalitesi, gebelik ve canlı doğum oranlarıyla pozitif korelasyon sergilediği gösterilmiştir [172-180]. Fakat, bu girişimlerin neredeyse hepsi için özel ekipman, yetiştirilmiş operatör ve daha da önemlisi sonuçların hazırlanıp analiz edilmesi için zamana gereksinim duyulmaktadır. Bu sebeple, bahsi geçen bu testlerin klinik olarak kullanımı rutin klinik işlemler düşünüldüğünde maalesef pratik değildir. Yine de bu testlerin kullanılmasıyla gerek embriyo transferi sayısı gerekse gebeliğe ulaşma süresinde çeşitli avantajlar elde edilebilmektedir. Bu konu hakkındaki en güzel örneklerden biri Belçikalı Johan Smits grubunun EFNB2, SASH1 ve CAMK1D transkriptlerinin kumulus hücreleri üzerinde transtomics olarak analiz etmesiyle ortaya çıkan ve alanda Corona testi olarak bilinen veriler olabilir [181]. Bu çalışmada, hasta örneklerinde elde edilmiş kumulus hücreleri

transcriptomics ile incelenmiş ve bahsi geçen 3 faktörün seviyelerinden faydalanarak embriyo transfer sayısı azaltılmış ve daha da önemlisi ise bu teknolojinin kullanımıyla gebelik elde edilebilmesi için gereken YÜT sayısı 3 siklus azaltılabilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gönüllülere Ait Özellikler ve Gruplandırma

Bu tez çalışmasına, Etlik Şehir Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 12.06.2024 tarihli toplantısı ile girişimsel olmayan araştırmalar AEŞ-BADEK-2024-595 sayılı etik kurul onayı ile çalışmaya başlanmıştır. İlgili karar formu EK-1 bölümünde paylaşılmıştır.

Çalışmaya, BGOF ile detaylı olarak sözlü ve yazılı olarak klinisyen ve embriyolog tarafından bilgi verilmiş ve onam vermiş gönüllüler dahil edilmiştir. Araştırma amaçlı gönüllü alımı etik kurul onayı takiben Haziran 2024 ve Temmuz 2024 tarihleri arasında Gürkan Klinik Kadın Sağlığı, İnfertilite ve Tüp Bebek merkezine infertilite şikâyeti ile başvuran çiftler arasından işleme/dışlama kriterlerine uygun ciflerin çalışmaya katılma daveti ile veriler elde edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen gönüllüler araştırma ve kontrol grubu olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Araştırma grubunda 10 PCOS tanısı almış, 10 endometrioma tanısı almış, 10 ileri maternal yaş tanısı almış, 10 azalmış over rezervi tanısı almış, 10 açıklanamayan infertilite tanısı almış, toplam 50 birey dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise 10 erkek faktör infertilite tanısı almış bireyler dahil edilmiştir. Araştırmada toplam 60 bireyden elde edilmiş kumulus hücreleri ve klinik parametreler incelenmiştir.

KOH sonrası YÜT tekniği olarak IVF ve inseminasyon tekniği olarak ICSI planlanarak yumurta toplama işlemine (*oocyte pick up*, OPU) alınan gönüllülerden kumulus hücreleri aşağıda anlatılan protokoller takip edilerek toplandı. Her gönüllüden 3 dominant follikül (≥ 17 mm çapından büyük folliküller) aspirasyonundan elde edilmiş COC'nden elde edilmiş kumulus hücreleri toplandı.

3.1.1. Gönüllüler için işleme kriterleri

Her bir gönüllü için sadece tek bir infertilite tanısı almış olması şartıyla birlikte aşağıdaki özelliklere göre gönüllüler çalışmaya dahil edilmiştir. Birden fazla infertilite sebebi olması durumunda gönüllüler çalışmadan dışlanmıştır.

- 18 – 49 yaş aralığı
- BMI 25kg/m² veya altı olması
- Düşük Over Rezervi tanısı almış olması
- Erkek faktör infertilite tanısı almış olması
- Açıklanamayan infertilite tanısı almış olması
- Polikistik over sendromu tanısı almış olması
- Endometrioma tanısı almış olması

3.1.2. Gönüllüler için dışlama kriterleri

- Daha önce over rezervini etkileyebilecek cerrahi girişim öyküsü
- Turner Sendromu
- SRY- Erkek bireyler
- İşleme kriterlerinin sağlanmadığı durumlar
- Herhangi bir sebeple tedavi protokolünün tamamlanması
- Bireyin araştırmadan ayrılma talebi

3.1.3. Gönüllülere ait örneklerde incelenen parametreler

Folikülogeneze ve oosit gelişimine etkili olduğu bilinen EGF, GDF-9 ve BMP-15 pozitif kumulus hücrelerinde imünohistokimyasal olarak belirlendi.

- Kumulus hücrelerinde TUNNEL pozitif hücrelerin imünohistokimyasal olarak işaretlenmesiyle apoptotik hücrelere ilişkin veriler elde edildi.
- IVF siklus kilit parametreleri (oosit sayısı, matürasyon oranı, fertilizasyon oranı, klivaj oranı, blastulasyon oranı, gebelik oranı, implantasyon oranı) ve jinekolojik klinik bulgular (FSH, LH, estradiol, AMH), EGF, GDF-9, BMP-15 ve apoptotik hücre seviyeleri ile ilişkilendirildi.

3.2. Kumulus Hücrelerinin Elde Edilmesi

Kumulus hücreleri matriks komponenti ile yumurta toplama (“*oocyte pick-up*”, OPU) işlemi sırasında elde edilmiştir. OPU işleminden önce kontrollü over hiperstimülasyonu

(“*controlled over hyperstimulation*”, COH) işlemi hastanın etiyolojisine uygun protokoller uygulanarak kadın hastalıkları ve doğum uzmanlarınca gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Kontrollü over hiperstimülasyonu

Hastaların etiyolojik özellikleri, özellikle “*body mass index (BMI)*”, antral follikül sayısı ve AMH değerlerine göre uygun dozda adet 3. gününde rekombinant gonadotropin dozu başlanmasıyla overler uyarılır. Rekombinant gonadotropin olarak follitropin alfa (Gonal-F, Merck Serono) kullanılmıştır. Her 2 günde 1 olacak şekilde hastalar follikül büyüme takibi için kliniğe çağırılmış ve transvajinal ultrasonografi yardımıyla follikül gelişimle takip edilmiştir. Gerekli görülen durumlarda gonadotropin doz ayarlaması yapılmış ve gerekli takipler yapılmıştır. En az 3 follikülün dominatlaşması ve 17 mm çapına ulaşmasıyla gonadotropin kullanımı sonlandırılıp trigger aşamasına geçilmiştir. Trigger ajanına, yine hastanın etiyolojisine ve “*ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS)*” riskine göre karar verilmiştir. Eğer östrojen seviyesi 2500 pg/mL seviyesinin altında ise hCG (chorigonadotropin alfa, Ovitrelle 20 mcg (6500 IU), Merck Serono) bu seviyelerin üzerinde ise triptorelin acetate (Gonapeptyl, Ferring) kullanılmıştır. Trigger ajanı administrasyonundan 34-36 saat sonra OPU işlemi gerçekleştirilmiştir. OPU işleminden sonra eğer siklus planlaması taze embriyo transferine göre planlandıysa hastalara günlük vajinal progesteron (crinone gel 8%BID, Merck Serono; progestan 200 mg, Koçak Farma) luteal faz desteği amaçlı kullanılmıştır. Gebelik oluşması durumunda progesteron desteğine gestasyonel gelişimin 10. haftasına kadar devam edilmiştir.

3.2.2. OPU, denüstasyon, mikroenjeksiyon ve embriyo kültür süreci

OPU işlemi genel sedasyon altında yapılmıştır. Transvajinal probe ile sağ ve sol overler gözlemlenmiş ve prob üzerine monte edilmiş çift lümenli OPU iğnesi “guide” yardımıyla folliküller penetre edilip follikül içeriği aspire edilmiştir. Follikül sıvısında COC bulunmadığı durumlarda follikül içeriği ASP (Vitrolife) ile yıkanmış ve tekrar aspire edilmiştir. Embriyoloji laboratuvarında izole edilen COC’leri üzeri mineral yağ ile örtülü (OVOIL, Vitrolife) %5 “*human serum albumin (HSA)*” içeren G-MOPS+ (Vitrolife) tamponlu kültür sıvısına taşınmıştır. Toplanan COC’lerin fazla matriks kısımları eğilmiş insülin enjektör uçları ile kesilip daha sonra çalışılmak üzere kültür kabında bırakılmıştır. OPU işlemi sonrası toplanan COC’leri G-TL+ (Vitrolife) solüsyonu ile yıkanıp aynı kültür

sıvısı içerisinde 37 °C, %7 CO₂ ve %5 O₂ kültür ortamında yaklaşık 1 saat kültür edilmiştir. Gerekli süredeki kültür sonrası COC'ler önce 40 IU hyaluronadise (Hyase 10X, Vitrolife) içeren enzimatik solüsyon içerisinde yavaşça yıkanmış ve kumulus matrikslerinin çözülmesi sağlanmıştır. Sonrasında sırasıyla 150µm ve 130µm çaplarında ateşte çekilmiş pastör pipetleri kullanılarak mekanik denüdasyonları sağlanmış ve *corona radiata* hücrelerinden arındırılmıştır. Denüdasyon işlemi tamamlanan oosit hücreleri matürasyon aşamalarına göre (MII, MI ve GV) ayrılıp tekrardan G-TL+ (Vitrolife) kültür sıvısı içerisinde kültür edilmiştir. Kültür süresinin sonunda ICSI işlemi için hazırlanmış Narishige Mikromanipülatör yardımı ile ICSI işlemi gerçekleştirilmiştir. İnsemine edilen oositlerin fertilizasyon kontrolü post-ICSI 16. saatte yapılmış ve fertilizasyon skorları her oosit için belirlenmiştir (2PN, 1PN, 3PN, multiPN, FF, 0PN). Sonrasında her gün gerekli embriyo kontrolleri yapılmış ve gerekli embriyo skorlamaları gerek elektronik takip programına (TüpBEBEX, Türkiye) gerekse hasya dosyasına kaydedilmiştir. Siklus taze transfer için organize edildiyse Allwin (Allwin Medical Devices, ABD) iç ve dış kateter seti kullanılarak embriyo transferi gerçekleştirilmiş veya embriyolar uygun kriyoprezervasyon protokolleri kullanılarak dondurulmuştur.

3.3. İmmünohistokimyasal Prosedür

OPU işlemi sırasında elde edilen kumulus hücreleri polilizinli lamaların üzerine alınıp stereo mikroskop altında Pasteur pipeti kullanılarak yayıldı. Bu işlem öncesinde kültür ortamından gelen mineral yağların arındırılmasına büyük özen gösterildi. Lam üzerin ealınan kumulus hücreleri oda sıcaklığında (25 °C) kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemini takiben %4 formaldehit ile hücrelerin fikse olması sağlandı. Tez kapsamında olan tüm hastaların örnekleri toplanıncaya kadar kuru ve ışık almayan bir ortamda kumulus hücrelerini içeren lamalar muhafaza edilip immünohistokimyasal takip süreçlerine başlandı.

3.3.1. İmmünohistokimyasal takip

Elde edilen ve %4 formaldehit ile fikse edilen kumulus hücreleri 2 defa 15 dk boyunca ksilol içerisinde bekletildi. Ksilol aşamasından sonra örneklerin dehidrasyonu aşamasına geçildi. Sırasıyla, %100, %96, %90, %80 ve %70 v/v etil alkol çözeltilerinde her biri 10 dk olacak şekilde işleminden geçirildi. Sonrasında, 2 defa her biri 5 dk olacak şekilde distile su içerisinde rehidrasyon yapıldı. Lam üzerindeki dokuların etrafı PAP-Pen ile çizilerek nemli ortamda immünohistokimya barında 3 defa her biri 3 dk olacak şekilde pH 7.4 “*phosphate buffered*

saline (PBS)” ile yıkandı. Non-spesifik bağlanmayı engellemek adına 10 dk boyunca “serum blocking solution” uygulanan örnekler anti-GDF-9 (Cat: ab15640, Lot: 962605, *Santa Cruz Biotechnology Inc.*, Europe), anti-BMP-15 (Cat: ab198226, Lot: GR211311-2, Abcam) primer antikorları ile +4 °C’de 1 gece inkübe edildi. Gece inkübasyonu sonrası örnekler diğer aşamalar için PBS ile yıkanarak hazırlandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi amacıyla 15 dk boyunca %3 hidrojen peroksit (LabVision, Fremont, ABD) çözeltisi ile uygulama yapıldı. Örneklerin PBS ile yıkanmasından sonra biotinli sekonder antikor (Cat: 54-003, Lot: 40522067, Acu-stain Mouse+rabbit HRP kit, Genemed Biotechnologies, ABD) uygulandı. Sonrasında PBS ile 3 defa her biri 3 dk olacak şekilde örnekler yıkandı ve diaminobenzedin (DAB) subtratı içeren kromojen (Cat: DABS-125, Lot: HD25395, Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) uygulanarak gözle görünebilir immün tepkime gerçekleşene kadar bekletildi. PBS ile yıkama sonrası, zemin boyası olarak Mayer’in Hematoksileni kullanıldı. Son kez alkol serisiyle dehidre edilen örnekler ksilolde bekletildikten sonra entellan kullanarak lamel ile kapatıldı ve ışık almayan karanlık bir ortamda muhafaza edildi. Tüm örneklerin mikroskopik incelemesi Leica DM4000 (Almanya) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde Leica Q Vin3 programında fotğrafları çekildi ve gerekli sayımları yapıldı. Her mikroskop slaytı için bağımsız 5 alanda boyanan hücreler sayıldı.

3.4. TUNEL Prosedürü

Kumulus hücrelerindeki DNA hasarının tespit edilebilmesi amacıyla TUNEL metodu kullanıldı. Elde edilen ve %4 paraformaldehit ile fikse edilmiş hücreler 20 dakika süresince 20 µg/ml konsantrasyondaki proteinaz K (Roche Diagnostics, Almanya) ile kültür edildi. Bunu takiben, 5 dakika boyunca oda sıcaklığında (25 °C) nemli bir ortamda endojen peroksidasyonun bloke edilmesi amacıyla %3 hidrojen peroksit (LabVision, Fremont, ABD) çözeltisi ile işlem den geçirildi. Fazla sıvı dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra 37 °C nemli bir ortamda 1 saat süresince TdT enzim çözeltisi ile inkübe edildi. Sonrasında, anti-digoksinin peroksidaz çözeltisi ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında (25 °C) inkübe edilip diaminobenzidin (DAB) ile boyandı. Zemin boyası olarak Mayer’in Hematoksilen boyası kullanıldı. Tüm örneklerin mikroskopik incelemesi Leica DM4000 (Almanya) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde Leica Q Vin3 programında fotğrafları çekildi ve gerekli sayımları yapıldı. Her mikroskop slaytı için bağımsız 5 alanda boyanan hücreler sayıldı.

3.5. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiki hesaplamalar için GraphPad Prism (Version 10.2.3 (403), ABD) istatistik programı kullanıldı. Değişkenlerin normal veya anormal dağılımda olduğu (parametrik vs non-parametrik dağılım) testi için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Parametrik dağılım şartını sağlayan değişkenlerin analizi için Student's t-testi kullanıldı. Non-parametrik değişkenlerin analizi için ... kullanıldı. Örnek volümünü tanı gruplarına göre karşılaştırmak için ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. ANOVA sonucunda fark bulunduğunda farkın kaynağı Bonferroni post-hoc testi ile araştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Gruplar Arası Demografik ve Klinik Embriyolojik Veriler

Tedavi grupları arasında çeşitli demografik ve klinik parametrede istatistiki olarak anlamlı farklar saptanmıştır (Çizelge 4.1). Kadın yaşı parametresinde gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.0001$). Bu fark sadece maternal age (45.60 ± 1.91 vs 30.63 ± 3.84 , $p<0.0001$) grubu ve DOR (37.11 ± 3.63 vs 30.63 ± 3.84 , $p: 0.0048$) grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ortaya çıkmaktadır. Gruplar karşılaştırıldığında AMH değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.0001$). Bu fark sadece PCOS (4.89 ± 1.44 vs 3.13 ± 1.13 , $p: 0.0020$), maternal age (0.27 ± 0.25 vs 3.13 ± 1.13 , $p<0.0001$) ve DOR (0.14 ± 0.11 vs 3.13 ± 1.13 , $p<0.0001$) grupları arasında istatistiki olarak anlamlıdır. Gruplar arasında hCG günü estradiol değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.0001$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında bu fark PCOS grubu için istatistiki olarak anlamlıdır (3080.13 ± 1789.52 vs 750 ± 340.09 , $p: 0.0011$). Toplanan oosit sayısı parametresinde gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.0001$). Bu fark, maternal age (4.50 ± 2.25 vs 14.75 ± 6.4 , $p: 0.0004$) ve DOR (2.89 ± 2.28 vs 14.75 ± 6.4 , $p<0.0001$) gruplarının kontrol grubuna kıyaslandığı zaman istatistiki olarak anlamlıdır. Toplam M2 sayısı parametresinde gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.0001$). Bu fark, maternal age (3.30 ± 1.62 vs 11 ± 6.12 , $p: 0.0045$) ve DOR (2.11 ± 1.66 vs 11 ± 6.12 , $p: 0.0012$) grupları ile kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlıdır. Karşılaştırılan diğer parametreler olan BMI, deneme sayısı, toplam M1 sayısı, matürasyon oranları, fertilizasyon oranları ve klivaj oranları gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık göstermemiştir. Blastulasyon oranlarında ise DOR grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı fark mevcuttur (0 ± 0 vs 64.07 ± 16.72 , $p: 0.0451$). Fakat, DOR grubunda embriyonik gelişimin beşinci gününe takip edilmiş sadece tek embriyo bulunduğundan, örneklem sayısı yetersizliği ile bu istatistiki fark göz ardı edilebilir.

Çizelge 4.1. Gruplar arası demografik veriler, KOH değişkenleri ve siklus parametreleri. Her parametre için ortalama ve $\pm$ standart sapma değerleri belirtilmiştir. Tüm parametrelerin kontrol grubu (Male Faktör) ile arasında istatistiki olarak anlamlı fark olup olmadığı ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır, (*) kontrol grubu ile istatistiki anlamlı farkı belirtir. P değerleri ANOVA testi ile hesaplanmıştır. $p \leq 0.05$ istatistiki olarak anlamlı kabul edilir

	PCOS (n: 10)	Endometrioma (n: 10)	Maternal Age (n: 10)	DOR (n: 10)	Unexplained (n: 10)	Male Faktör (n: 10)	p-değeri
Kadın Yaşı	28.10 $\pm$ 4.97	31.00 $\pm$ 3.38	45.60 $\pm$ 1.91 ****	37.11 $\pm$ 3.63 **	34.2 $\pm$ 3.54	30.63 $\pm$ 3.84	0.0001
BMI (kg/m2)	23.25 $\pm$ 2.12	21.91 $\pm$ 1.82	22.12 $\pm$ 2.09	22.09 $\pm$ 2.20	21.76 $\pm$ 2.68	22.05 $\pm$ 2.59	0.7778
Deneme Sayısı	1.30 $\pm$ 0.64	1.70 $\pm$ 1.55	3.80 $\pm$ 3.68	3.11 $\pm$ 1.91	2.2 $\pm$ 1.6	1.63 $\pm$ 1.32	0.0979
AMH (ng/ml)	4.89 $\pm$ 1.44 **	2.98 $\pm$ 0.68	0.27 $\pm$ 0.25 ****	0.14 $\pm$ 0.11 ****	3.01 $\pm$ 1.14	3.13 $\pm$ 1.13	0.0001
hCG Günü E2 (ng/ml)	3080.13 $\pm$ 1789.52 **	2047 $\pm$ 581.63	707 $\pm$ 470.86	318.57 $\pm$ 194.77	571.33 $\pm$ 363.06	750 $\pm$ 340.09	0.0001
Toplanan Oosit Sayısı	18.60 $\pm$ 6.95	10.40 $\pm$ 5.58	4.50 $\pm$ 2.25 ***	2.89 $\pm$ 2.28 ****	11.3 $\pm$ 3.13	14.75 $\pm$ 6.4	0.0001
Toplam M2	15.40 $\pm$ 6.39	7.60 $\pm$ 4.84	3.30 $\pm$ 1.62 **	2.11 $\pm$ 1.66 **	7.8 $\pm$ 3.34	11 $\pm$ 6.12	0.0001
Toplam M1	1.20 $\pm$ 1.4	1.20 $\pm$ 1.72	0.50 $\pm$ 0.92	0.78 $\pm$ 0.78	1.4 $\pm$ 1.11	0.63 $\pm$ 0.69	0.5407
Toplam GV	2.00 $\pm$ 1.67	1.60 $\pm$ 1.74	0.60 $\pm$ 1.2	0 $\pm$ 0 *	2 $\pm$ 2.37	2.75 $\pm$ 2.22	0.0269
Matürasyon Oranı (%)	83.98 $\pm$ 13.1	65.82 $\pm$ 26.89	78.81 $\pm$ 24.59	73.28 $\pm$ 31.30	68.35 $\pm$ 21.46	72.66 $\pm$ 17.61	0.5990
Fertilizasyon Oranı (%)	78.93 $\pm$ 10.77	61.82 $\pm$ 23.49	75.50 $\pm$ 27.59	49.74 $\pm$ 33.95	68.59 $\pm$ 19.22	58.01 $\pm$ 18.45	0.1188
D2 Klivaj Oranı (%)	92.13 $\pm$ 14.23	98.15 $\pm$ 5.24	98.33 $\pm$ 5	92.86 $\pm$ 11.29	100 $\pm$ 0	97.5 $\pm$ 6.61	0.3225
Blastulasyon Oranı (%)	59.97 $\pm$ 16.62	66.15 $\pm$ 21.97	50.00 $\pm$ 30	0 $\pm$ 0 *	73.08 $\pm$ 13.27	64.07 $\pm$ 16.72	0.0623

4.2. Gruplar Arasında EGF, GDF-9, MBP-15 İmmünohistokimyasal ve TUNEL Verileri

Foliküler gelişimin her basamağında granüloza ve kumulus hücrelerinde farklı seviyelerde sitoplazmik olarak ifade edildiği bilinen EGF, GDF-9 ve BMP-15 proteinlerinin immünreaktivitesi tüm deney gruplarında değerlendirildi.

Tedavi grupları arasında GDF-9, BMP-15, EGF ve TUNEL parametrelerinde istatistiki olarak anlamlı farklar saptanmıştır (Çizelge 4.2). Tüm çalışma gruplarının GDF-9, MBP-15, EGF ve TUNEL seviyeleri kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki olarak farklı bulunmuştur ($p<0.0001$). PCOS grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (6.00 ± 2.00 vs 18.70 ± 1.27 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Endometrioma grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (6.00 ± 1.00 vs 18.70 ± 1.27 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Maternal age grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (4.20 ± 0.98 vs 18.70 ± 1.27 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. DOR grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (3.89 ± 1.20 vs 18.70 ± 1.27 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Unexplained grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (9.70 ± 1.68 vs 18.70 ± 1.27 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile kontrol BMP-15 seviyeleri (7.20 ± 1.26 vs 11.30 ± 2.19 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Endometrioma grubu ile kontrol BMP-15 seviyeleri (7.10 ± 1.30 vs 11.30 ± 2.19 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Maternal age grubu ile kontrol BMP-15 seviyeleri (4.50 ± 1.26 vs 11.30 ± 2.19 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. DOR grubu ile kontrol BMP-15 seviyeleri (3.22 ± 1.03 vs 11.30 ± 2.19 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Unexplained grubu ile kontrol BMP-15 seviyeleri (9.70 ± 1.68 vs 11.30 ± 2.19 , $p: 0.0044$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile kontrol EGF seviyeleri (7.00 ± 1.26 vs 14.70 ± 1.95 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Endometrioma grubu ile kontrol EGF seviyeleri (7.10 ± 1.83 vs 14.70 ± 1.95 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Maternal age grubu ile kontrol EGF seviyeleri (4.80 ± 1.33 vs 14.70 ± 1.95 , $p<0.0001$)

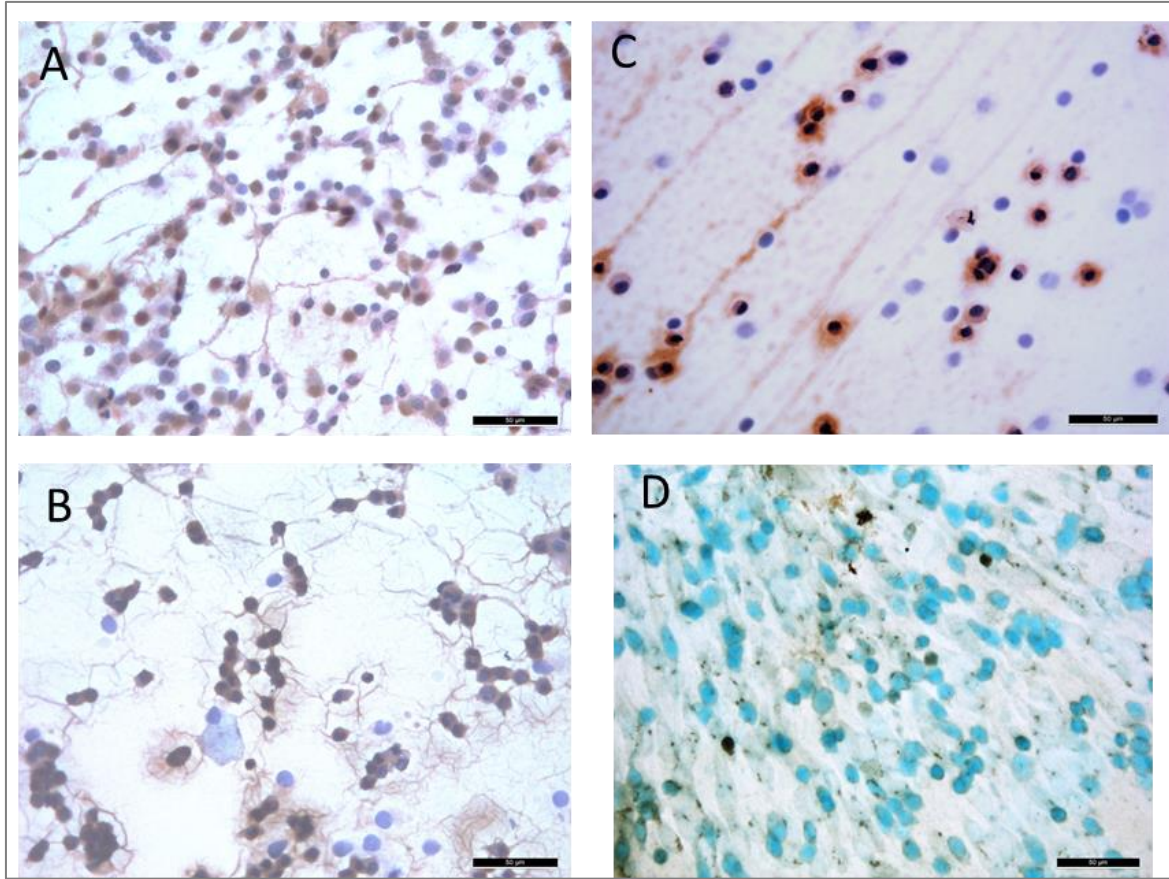
açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. DOR grubu ile kontrol EGF seviyeleri (4.33 ± 1.56 vs 14.70 ± 1.95 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Unexplained grubu ile kontrol EGF seviyeleri (10.50 ± 1.28 vs 14.70 ± 1.95 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile kontrol apoptoz seviyeleri (12.10 ± 1.51 vs 1.70 ± 1.10 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Endometrioma grubu ile kontrol apoptoz seviyeleri (8.20 ± 1.47 vs 1.70 ± 1.10 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Maternal age grubu ile kontrol apoptoz seviyeleri (11.50 ± 2.20 vs 1.70 ± 1.10 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. DOR grubu ile kontrol apoptoz seviyeleri (11.89 ± 1.51 vs 1.70 ± 1.10 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Unexplained grubu ile kontrol apoptoz seviyeleri (6.20 ± 1.25 vs 1.70 ± 1.10 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2. Gruplar arası GDF-9, BMP-15, EGF ve TUNEL verileri. Her parametre için ortalama ve $\pm$ standart sapma değerleri belirtilmiştir. Tüm parametrelerin kontrol grubu (Male Faktör) ile arasında istatistiki olarak anlamlı fark olup olmadığı ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır, (*) kontrol grubu ile istatistiki anlamlı farkı belirtir. P değerleri ANOVA testi ile hesaplanmıştır. $p \leq 0.05$ istatistiki olarak anlamlı kabul edilir

	PCOS	Endomet.	Maternal Age	DOR	Unexpla.	Male Faktör	p-değeri
GDF-9	$6.00 \pm 2.00^*$	$6.00 \pm 1.00^*$	$4.20 \pm 0.98^*$	$3.89 \pm 1.20^*$	$9.70 \pm 1.68^*$	18.70 ± 1.27	0.0001
BMP-15	$7.20 \pm 1.83^*$	$7.10 \pm 1.3^*$	$4.50 \pm 1.20^*$	$3.22 \pm 1.03^*$	$8.70 \pm 1.55^*$	11.30 ± 2.19	0.0001
EGF	$7.00 \pm 1.26^*$	$6.50 \pm 1.69^*$	$4.80 \pm 1.33^*$	$4.33 \pm 1.56^*$	$10.50 \pm 1.28^*$	14.70 ± 1.95	0.0001
TUNEL	$12.10 \pm 1.51^*$	$8.20 \pm 1.47^*$	$11.50 \pm 2.20^*$	$11.89 \pm 1.97^*$	$6.20 \pm 1.25^*$	1.70 ± 1.10	0.0001

4.2.1. Kontrol grubu

Kontrol grubu male faktör grubu hastalardan oluşmaktadır. GDF-9, BMP-15 ve EGF seviyeleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında en fazla pozitif boyama gösteren grup kontrol grubu olmuştur (çizelge 4.2). Apoptoz seviyeleri ise TUNEL verisine göre en düşük grup olarak gözlemlenmiştir.



Resim 4.1. Kontrol grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografi

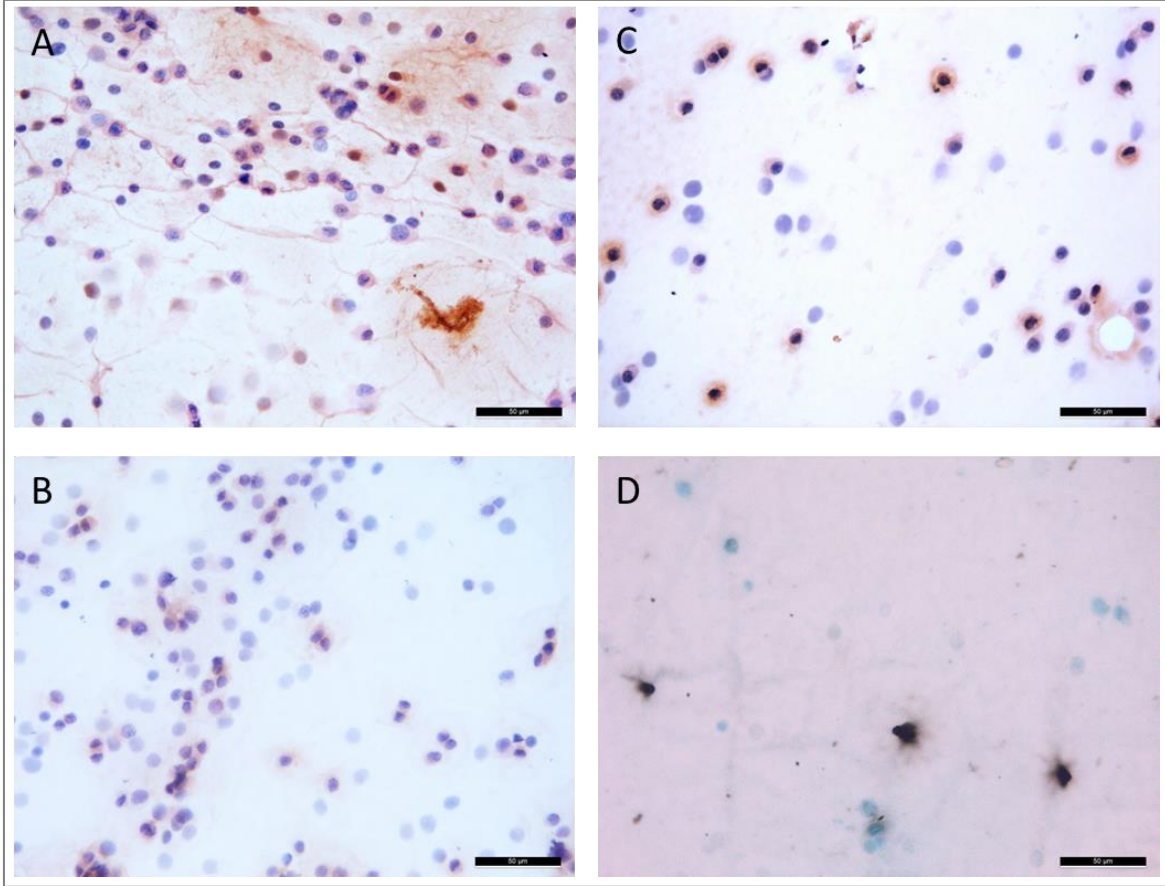
4.2.2. PCOS grubu

PCOS grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (6.00 ± 2.00 vs 18.70 ± 1.27 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile diğer gruplar GDF-9 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (çizelge 4.2, $p < 0.0001$). PCOS grubu ile maternal age grubu GDF-9 seviyeleri (6.00 ± 2.00 vs 4.20 ± 0.98 , $p: 0.0374$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile DOR grubu GDF-9 seviyeleri (6.00 ± 2.00 vs 3.89 ± 1.20 , $p: 0.0137$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile unexplained grubu GDF-9 seviyeleri (6.00 ± 2.00 vs 9.70 ± 1.68 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Buna karşın, PCOS grubu ile endometrioma grubu (6.00 ± 2.00 vs 6.00 ± 1.00 , $p > 0.9999$) arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunamamıştır (şekil 4.1).

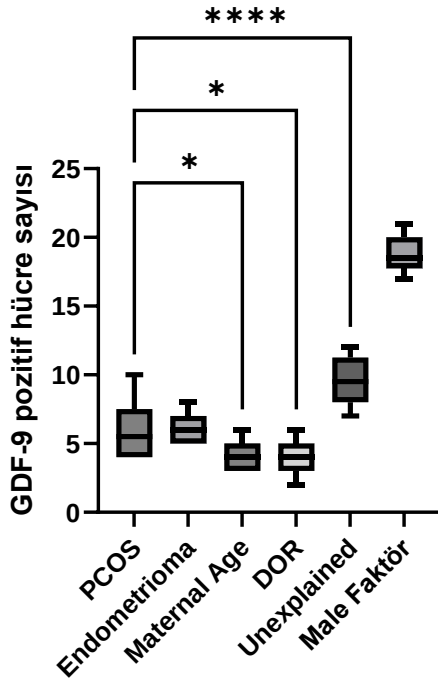
PCOS grubu ile kontrol BMP-15 seviyeleri (7.20 ± 1.26 vs 11.30 ± 2.19 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile diğer gruplar BMP-15 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.2, $p < 0.0001$). PCOS grubu ile maternal age grubu BMP-15 seviyeleri (7.20 ± 1.83 vs 4.50 ± 1.20 , $p: 0.0029$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile DOR grubu BMP-15 seviyeleri (7.20 ± 1.83 vs 3.22 ± 1.03 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Buna karşın, PCOS grubu ile endometrioma (7.20 ± 1.83 vs 7.10 ± 1.30 , $p > 0.9999$) ve unexplained (7.20 ± 1.83 vs 8.70 ± 1.30 , $p: 0.1773$) grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunamamıştır (şekil 4.2).

PCOS grubu ile kontrol EGF seviyeleri (7.00 ± 1.26 vs 14.70 ± 2.19 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile diğer gruplar EGF seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.3, $p < 0.0001$). PCOS grubu ile maternal age grubu EGF seviyeleri (7.00 ± 1.26 vs 4.80 ± 1.33 , $p: 0.0159$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile DOR grubu EGF seviyeleri (7.00 ± 1.26 vs 4.33 ± 1.56 , $p: 0.0033$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile unexplained grubu EGF seviyeleri (7.00 ± 1.26 vs 10.50 ± 1.28 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Buna karşın, PCOS grubu ile endometrioma (7.00 ± 1.26 vs 7.10 ± 1.30 , $p: 0.9357$) grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

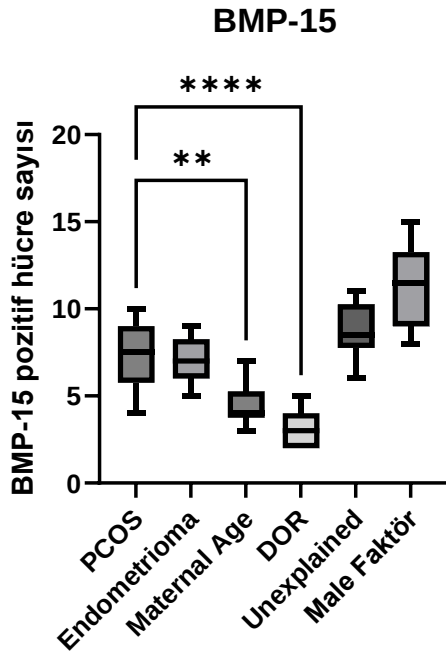
PCOS grubu ile kontrol apoptoz seviyeleri (12.10 ± 1.51 vs 1.70 ± 1.10 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile diğer gruplar apoptoz seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.4, $p < 0.0001$). PCOS grubu ile endometrioma grubu apoptoz seviyeleri (12.10 ± 1.51 vs 8.20 ± 1.47 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile unexplained grubu apoptoz seviyeleri (12.10 ± 1.51 vs 6.20 ± 1.25 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Buna karşın, PCOS grubu ile maternal age (12.10 ± 1.51 vs 11.50 ± 2.20 , $p: 0.8983$) ve DOR (12.10 ± 1.51 vs 11.89 ± 1.97 , $p: 0.9990$) grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunamamıştır.



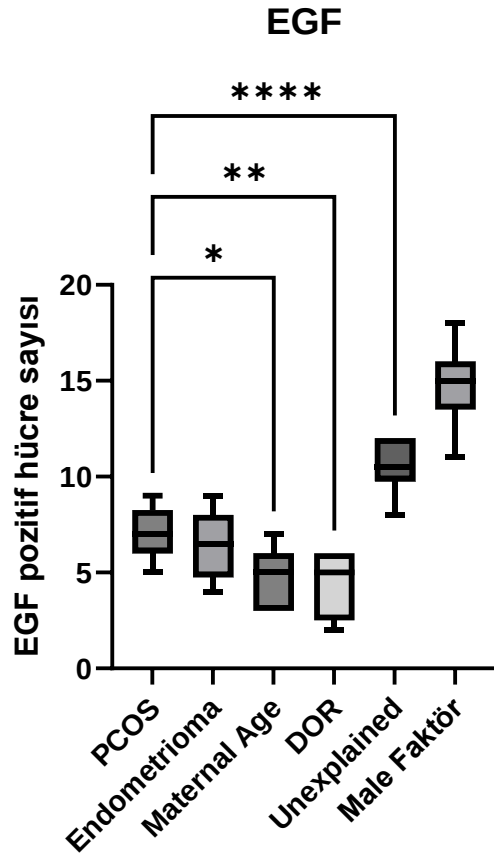
Resim 4.2. PCOS grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı



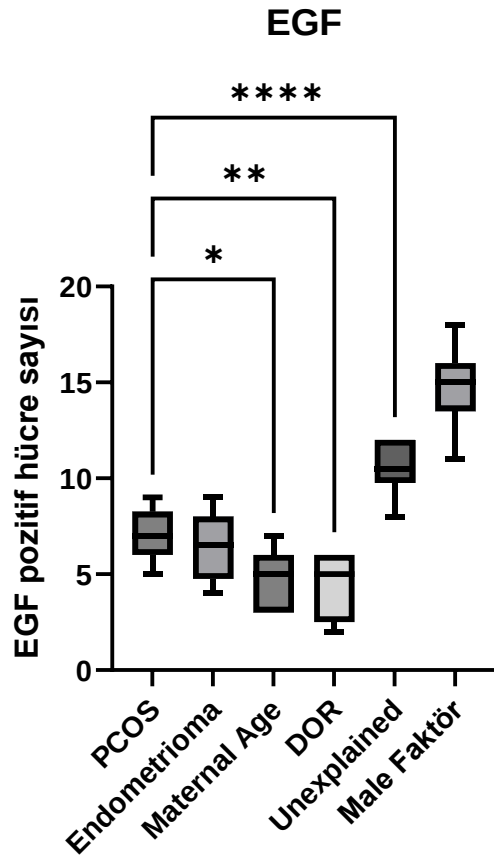
Şekil 4.1. GDF-9 seviyelerinin gruplar arası seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.2. BMP-15 seviyelerinin gruplar arası seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.3. EGF seviyelerinin gruplar arası seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistikî fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.4. Apoptoz seviyelerinin gruplar arası seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır

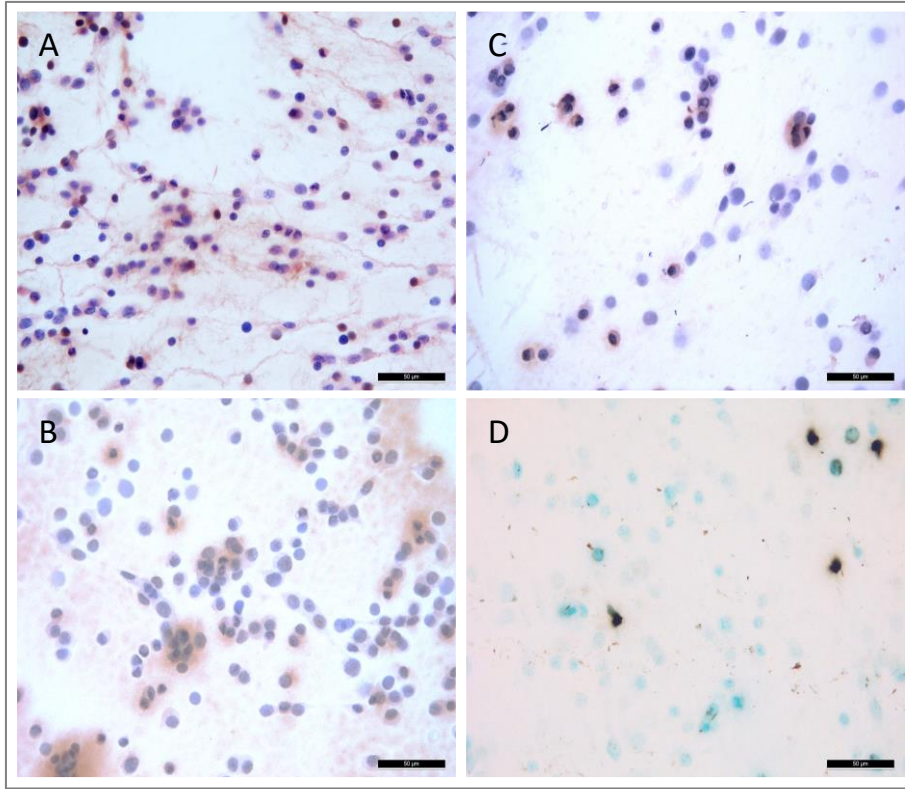
4.2.3. Endometrioma grubu

Endometrioma grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (6.00 ± 1.00 vs 18.70 ± 1.27 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. PCOS grubu ile diğer gruplar GDF-9 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.5, $p < 0.0001$). Endometrioma grubu ile PCOS grubu GDF-9 seviyeleri (6.00 ± 1.00 vs 6.00 ± 2.00 , $p: 0.9999$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Buna karşın endometrioma grubuyla GDF-9 seviyeleri maternal age (6.00 ± 1.00 vs 4.20 ± 0.98 , $p: 0.0374$), DOR (6.00 ± 1.00 vs 3.89 ± 1.20 , $p: 0.0137$) ve unexplained (6.00 ± 1.00 vs 9.70 ± 1.68 , $p < 0.0001$) grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmaktadır.

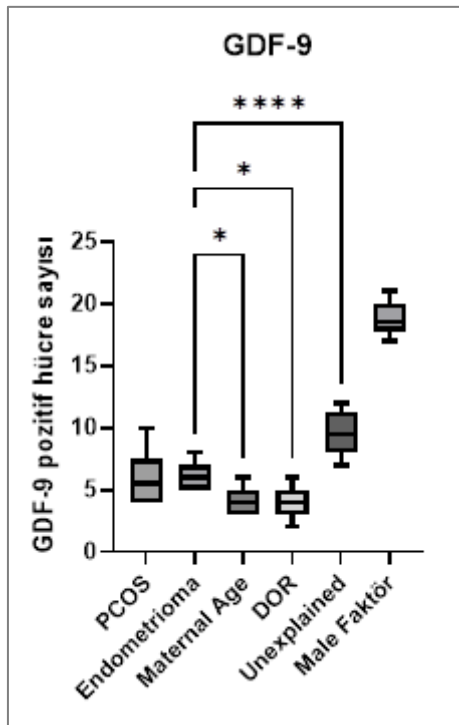
Endometrioma grubu ile kontrol BMP-15 seviyeleri (7.10 ± 1.30 vs 11.30 ± 2.19 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Endometrioma grubuyla BMP-15 seviyeleri maternal age (7.10 ± 1.30 vs 4.50 ± 1.20 , $p: 0.0044$) ve DOR (7.10 ± 1.30 vs 3.22 ± 1.03 , $p < 0.0001$) grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmaktadır. Buna karşın, endometrioma grubu ile PCOS (7.10 ± 1.30 vs 7.20 ± 1.83 , $p > 0.9999$) ve unexplained (7.10 ± 1.30 vs 8.70 ± 1.55 , $p: 0.1353$) grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunamamıştır (şekil 4.6).

Endometrioma grubu ile kontrol EGF seviyeleri (6.50 ± 1.69 vs 14.70 ± 1.95 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Endometrioma grubu ile diğer gruplar BMP-15 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.7, $p < 0.0001$). Bu farklılık sadece DOR (6.50 ± 1.69 vs 4.33 ± 1.56 , $p: 0.0223$) ve unexplained (6.50 ± 1.69 vs 10.50 ± 1.28 , $p < 0.0001$) grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlıdır. Buna karşın, endometrioma grubunun EGF seviyeleri açısından PCOS (6.50 ± 1.69 vs 7.00 ± 1.26 , $p: 0.9357$) ve maternal age (6.50 ± 1.69 vs 4.80 ± 1.33 , $p: 0.0880$) karşılaştırmasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.

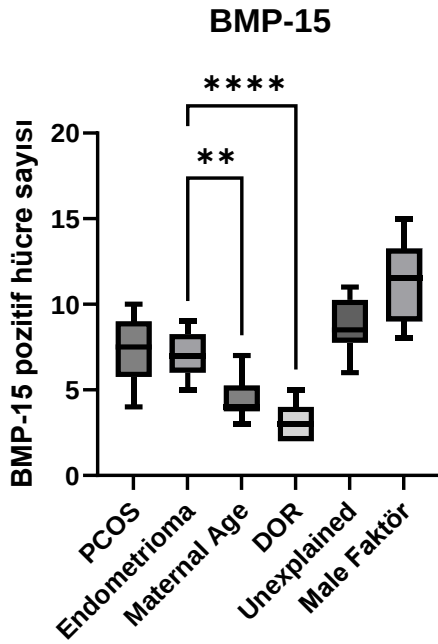
Endometrioma grubu ile kontrol apoptoz seviyeleri (8.20 ± 1.47 vs 1.70 ± 1.10 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Endometrioma grubu ile diğer gruplar apoptoz seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.8, $p < 0.0001$). Endometrioma grubu ile PCOS (8.20 ± 1.47 vs 12.10 ± 1.51 , $p < 0.0001$), maternal age (8.20 ± 1.47 vs 11.50 ± 2.20 , $p: 0.0003$), DOR (8.20 ± 1.47 vs 11.89 ± 1.97 , $p < 0.0001$) ve unexplained (8.20 ± 1.47 vs 6.20 ± 1.25 , $p: 0.0481$) grupları arasında apoptoz seviyeleri açısından istatistiki fark bulunmuştur.



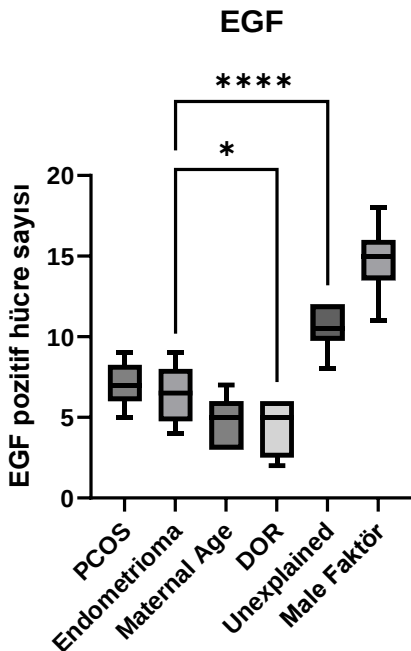
Resim 4.3. Endometrioma grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı



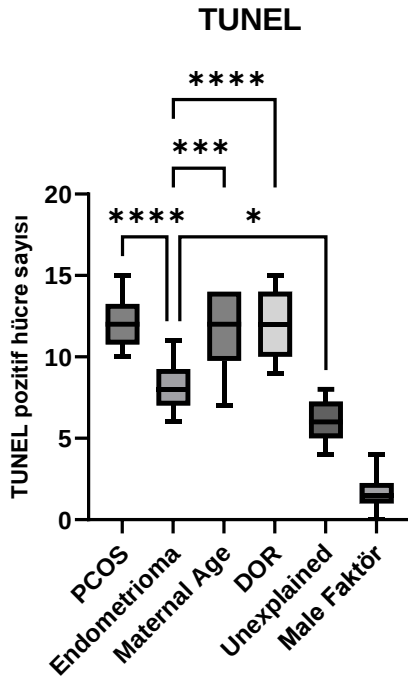
Şekil 4.5. EGF-9 seviyelerinin endometrioma grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.6. BMP-15 seviyelerinin endometrioma grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.7. EGF seviyelerinin endometrioma grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.8. Apoptoz seviyelerinin endometrioma grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır

4.2.4. Maternal age grubu

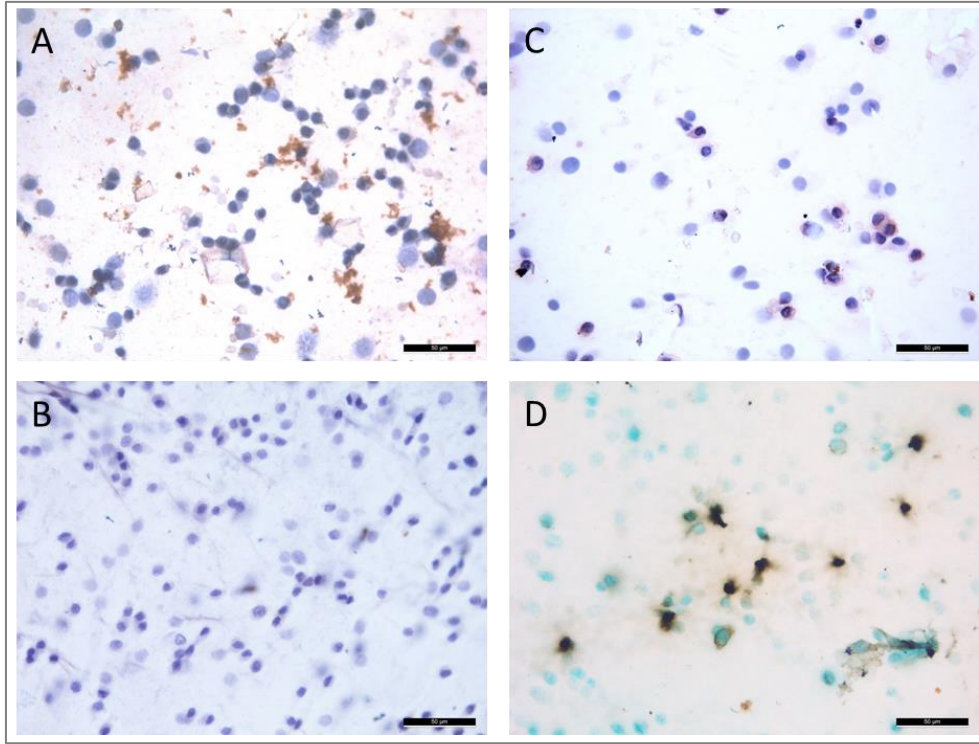
Maternal age grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (4.20 ± 0.98 vs 18.70 ± 1.27 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Maternal age grubu ile diğer gruplar GDF-9 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.9, $p < 0.0001$). Bu farklılıklar, GDF-9 seviyeleri açısından PCOS (4.20 ± 0.98 vs 6.00 ± 2.00 , $p: 0.0374$), endometrioma (4.20 ± 0.98 vs 6.00 ± 1.00 , $p: 0.0374$) ve unexplained (4.20 ± 0.98 vs 9.70 ± 1.27 , $p < 0.0001$) grupları ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlıdır. Fakat, maternal age ile DOR grubu GDF-9 seviyeleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark çıkmamaktadır (4.20 ± 0.98 vs 3.89 ± 1.68 , $p: 0.9885$).

Maternal age grubu ile kontrol BMP-15 seviyeleri (4.50 ± 1.20 vs 11.30 ± 2.19 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Bu fark, PCOS (4.50 ± 1.20 vs 7.20 ± 1.83 , $p: 0.0029$), endometrioma (4.50 ± 1.20 vs 7.10 ± 1.3 , $p: 0.0044$) ve unexplained (4.50 ± 1.20 vs 8.70 ± 1.55 , $p < 0.0001$) grupları ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlıdır. Maternal age ile DOR grubu BMP-15 seviyeleri açısından

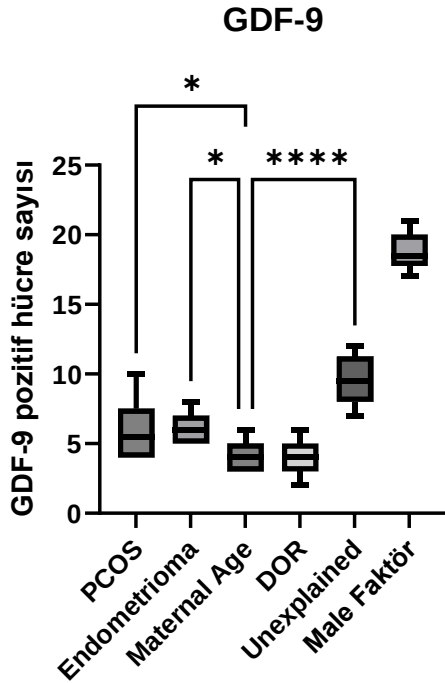
karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (şekil 4.10, 4.50 ± 1.20 vs 3.22 ± 1.03 , $p: 0.3302$).

Maternal age grubu ile kontrol EGF seviyeleri (4.80 ± 1.33 vs 14.70 ± 1.95 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Maternal age grubunun diğer çalışma grupları ile EGF seviyelerinin karşılaştırmasıyla istatistiki farklılıklar tespit edilmiştir (şekil 4.11). Bu farklılıklar PCOS (4.80 ± 1.33 vs 7.00 ± 1.95 , $p: 0.0159$) ve unexplained (4.80 ± 1.33 vs 10.50 ± 1.28 , $p < 0.0001$) gruplarıyla istatistiki olarak anlamlı şekilde farklı bulunmuştur. Buna karşın, endometrioma (4.80 ± 1.33 vs 6.50 ± 1.69 , $p: 0.0880$) ve DOR (4.80 ± 1.33 vs 4.33 ± 1.56 , $p: 0.9557$) grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Maternal age grubu ile kontrol apoptoz seviyeleri (11.50 ± 2.20 vs 1.70 ± 1.10 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir.

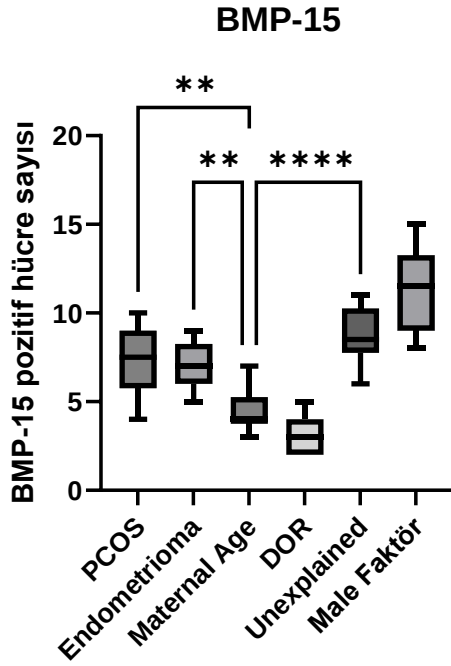
Maternal age grubunun diğer çalışma grupları ile karşılaştırılmasıyla istatistiki farklar tespit edilmiştir (şekil 4.12). Bu farklılıklar, maternal age grubu ile endometrioma (11.50 ± 2.20 vs 8.20 ± 1.47 , $p: 0.0003$) ve unexplained (11.50 ± 2.20 vs 6.20 ± 1.25 , $p < 0.0001$) grupları arasında istatistiki olarak anlamlıdır. Buna karşın, maternal age grubu ile PCOS (11.50 ± 2.20 vs 12.10 ± 1.51 , $p: 0.8983$), ve DOR (11.50 ± 2.20 vs 11.89 ± 1.97 , $p: 0.9837$) grupları arasında apoptoz seviyeleri açısından istatistiki olarak anlamlı fark bulunamamıştır.



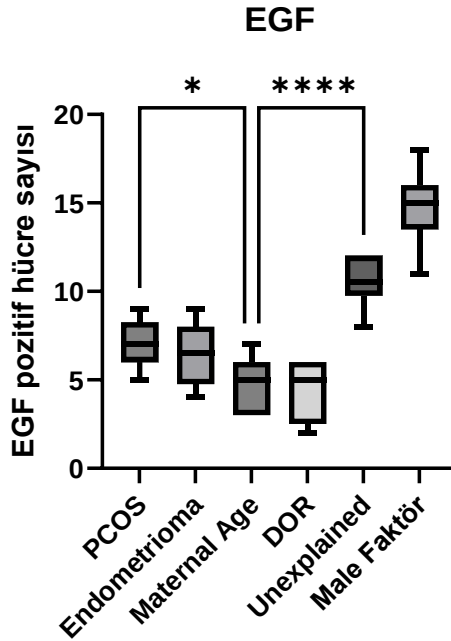
Resim 4.4. Maternal age grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı



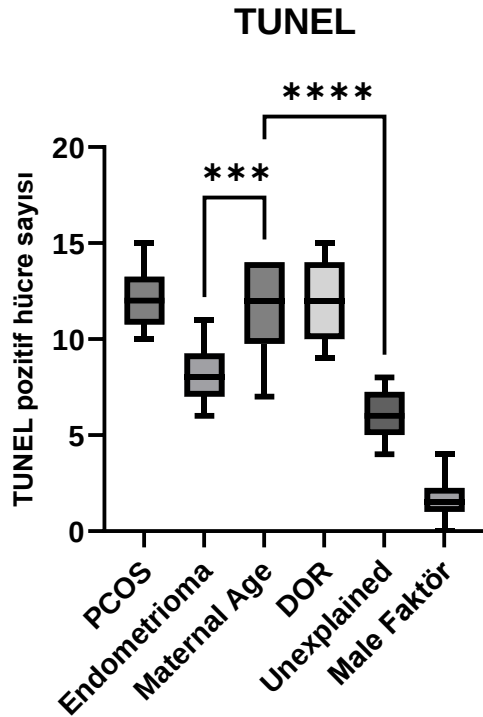
Şekil 4.9. GDF-9 seviyelerinin maternal age grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiksel fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.10. BMP-15 seviyelerinin maternal age grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.11. EGF seviyelerinin maternal age grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.12. Apoptoz seviyelerinin maternal age grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır

4.2.5. DOR grubu

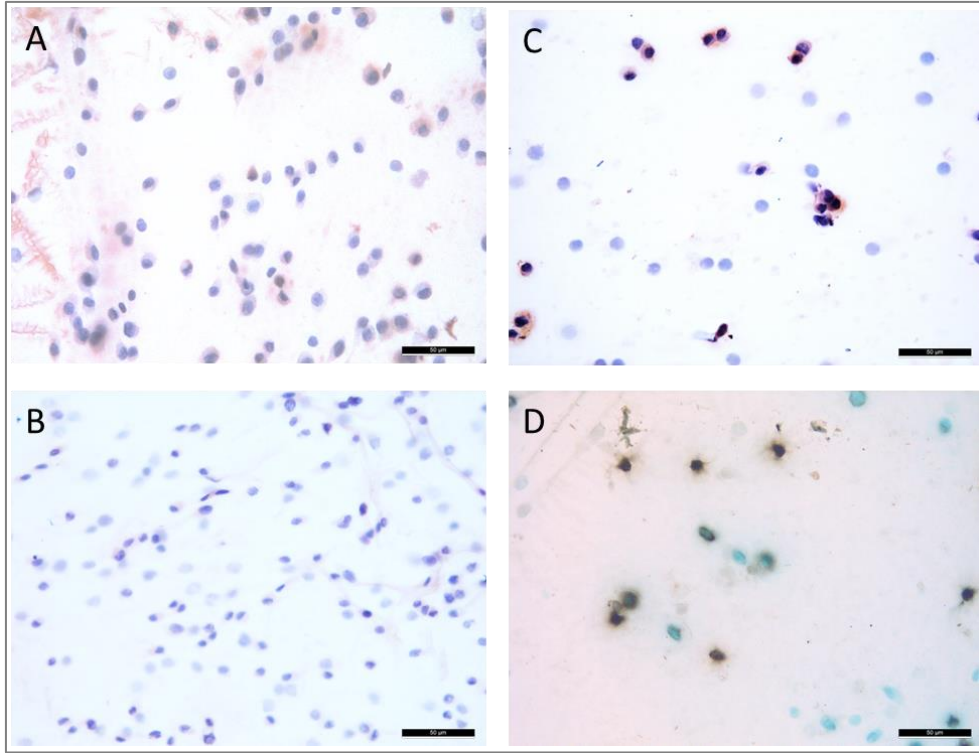
DOR grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (3.89 ± 1.20 vs 18.70 ± 1.27 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. DOR grubu ile diğer gruplar GDF-9 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.13, $p < 0.0001$). Gruplar arası farklılıklar incelendiğinde DOR grubu ile PCOS (3.89 ± 1.20 vs 6.00 ± 2.00 , $p: 0.0134$), endometrioma (3.89 ± 1.20 vs 6.00 ± 1.00 , $p: 0.0134$) ve unexplained (3.89 ± 1.20 vs 9.70 ± 1.68 , $p < 0.0001$) grupları arasında GDF-9 seviyeleri açısından istatistiki olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. DOR grubu ile maternal age grubu arasında ise istatistiki olarak anlamlı fark saptanamamıştır (3.89 ± 1.20 vs 4.20 ± 0.98 , $p < 0.0001$).

DOR grubu ile kontrol grubu BMP-15 seviyeleri (3.22 ± 1.03 vs 11.30 ± 2.19 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. BMP-15 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.14,

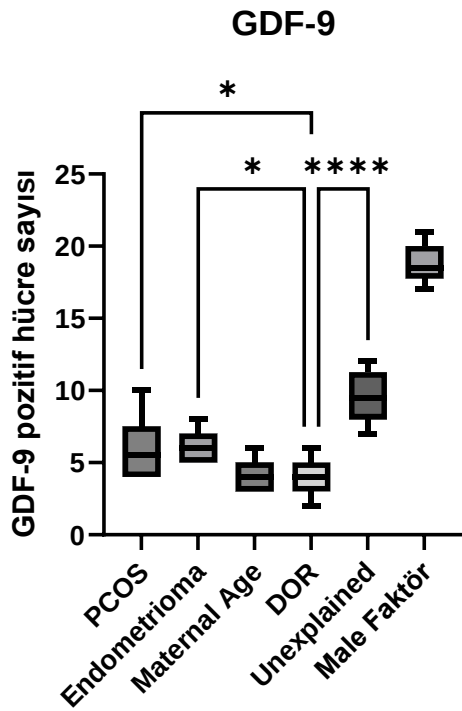
$p<0.0001$). Gruplar arası farklar incelendiğinde DOR grubuyla karşılaştırıldığında PCOS (3.22 ± 1.03 vs 7.20 ± 1.83 , $p<0.0001$), endometrioma (3.22 ± 1.03 vs 7.10 ± 1.30 , $p<0.0001$) ve unexplained (3.22 ± 1.03 vs 8.70 ± 1.55 , $p<0.0001$) grupları arasında BMP-15 pozitif hücre sayıları açısından istatistiki olarak anlamlı farklar bulunmaktadır. DOR ile maternal age grupları arasında BMP-15 seviyeleri açısından istatistiki olarak anlamlı fark bulunamamıştır (3.22 ± 1.03 vs $4.50.30\pm1.20$, $p: 0.3217$).

DOR grubu ile kontrol grubu EGF seviyeleri (4.33 ± 1.56 vs 14.70 ± 1.95 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. BMP-15 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.15, $p<0.0001$). DOR grubu ile PCOS (4.33 ± 1.56 vs 7.00 ± 1.26 , $p: 0.0033$), endometrioma (4.33 ± 1.56 vs 6.50 ± 1.69 , $p: 0.0218$) ve unexplained (4.33 ± 1.56 vs 10.50 ± 1.28 , $p<0.0001$) grupları arasında EGF seviyeleri açısından istatistiki olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir. EGF faktörü açısından DOR grubu ile maternal age grubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır (4.33 ± 1.56 vs 4.80 ± 1.33 , $p: 0.9522$).

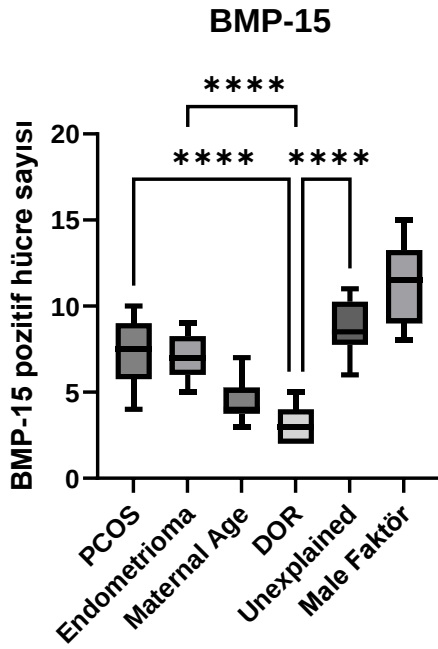
DOR grubu ile kontrol grubu apoptoz seviyeleri (11.89 ± 1.97 vs 1.70 ± 1.10 , $p<0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. BMP-15 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.16, $p<0.0001$). Apoptoz seviyeleri açısından DOR grubu ile endometrioma (11.89 ± 1.97 vs 8.20 ± 1.10 , $p<0.0001$) ve unexplained (11.89 ± 1.97 vs 6.20 ± 1.25 , $p<0.0001$) grupları kıyaslandığında bu gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı farklar bulunmuştur. DOR grubu ile PCOS (11.89 ± 1.97 vs 12.10 ± 1.51 , $p: 0.9989$) ve maternal age (11.89 ± 1.97 vs 11.50 ± 2.20 , $p: 0.9822$) grupları kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı fark tespit edilememiştir.



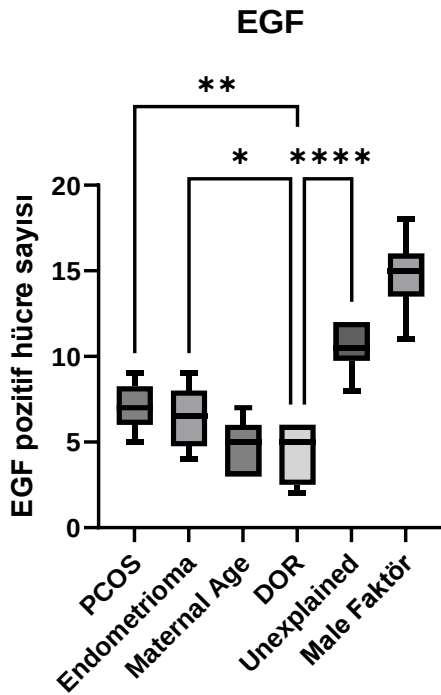
Resim 4.5. DOR grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı



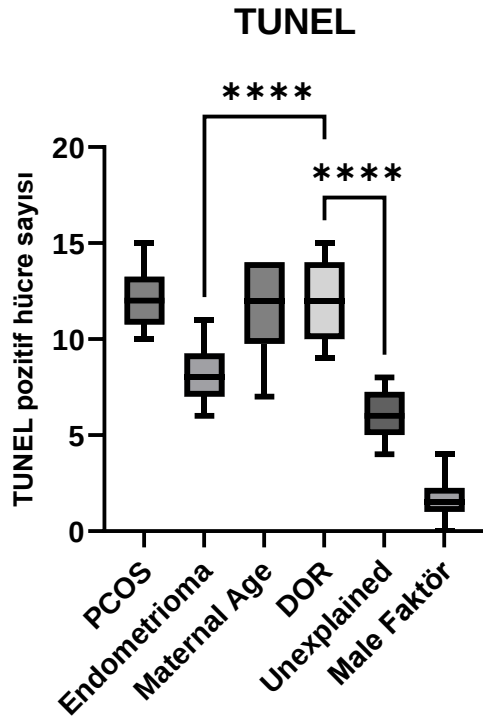
Şekil 4.13. GDF-9 seviyelerinin DOR grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistikî fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.14. BMP-15 seviyelerinin DOR grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.15. EGF seviyelerinin DOR grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.16. Apoptoz seviyelerinin DOR grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır

4.2.6. Unexplained grubu

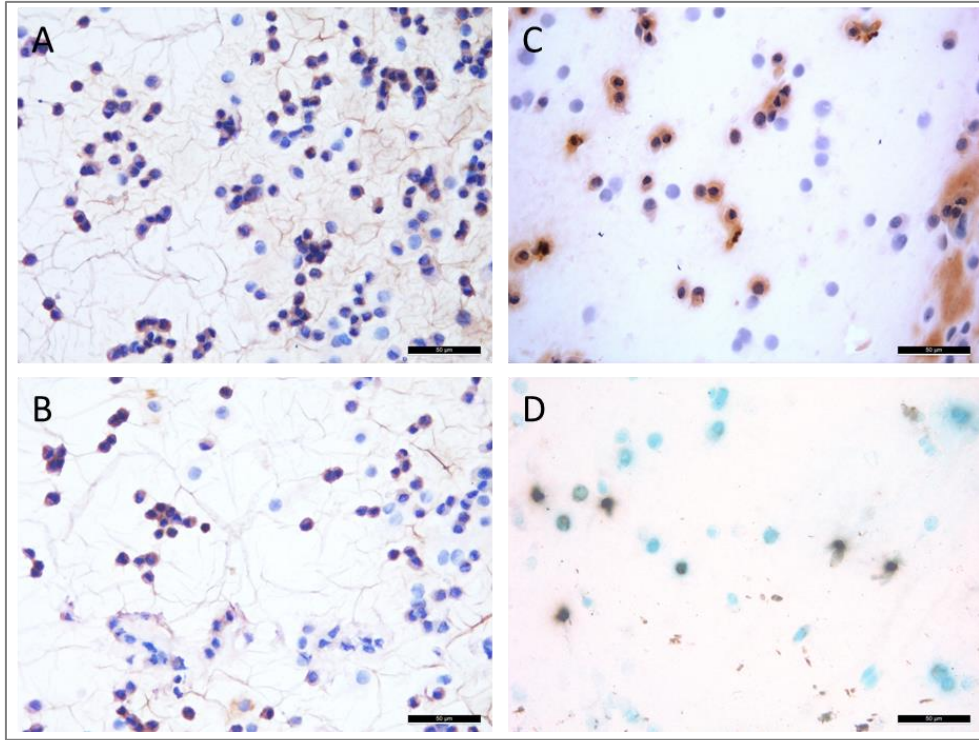
Unexplained grubu ile kontrol grubu GDF-9 seviyeleri (9.70 ± 1.68 vs 18.70 ± 1.27 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. DOR grubu ile diğer gruplar GDF-9 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.17, $p < 0.0001$). Unexplained grubu ile PCOS (9.70 ± 1.68 vs 6.00 ± 2.00 , $p < 0.0001$), endometrioma (9.70 ± 1.68 vs 6.00 ± 1.00 , $p < 0.0001$), maternal age (9.70 ± 1.68 vs 4.20 ± 0.98 , $p < 0.0001$) ve DOR (9.70 ± 1.68 vs 3.89 ± 1.20 , $p < 0.0001$) grupları arasında GDF-9 seviyeleri arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Unexplained grubu ile kontrol grubu BMP-15 seviyeleri (8.70 ± 1.55 vs 11.30 ± 2.19 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. DOR grubu ile diğer gruplar BMP-15 seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.18, $p < 0.0001$). Unexplained grubu ile maternal age (8.70 ± 1.55 vs 4.50 ± 1.20 , $p < 0.0001$) ve DOR (8.70 ± 1.55 vs 3.22 ± 1.03 , $p < 0.0001$) grupları arasında BMP-15 seviyeleri arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmaktadır. Buna

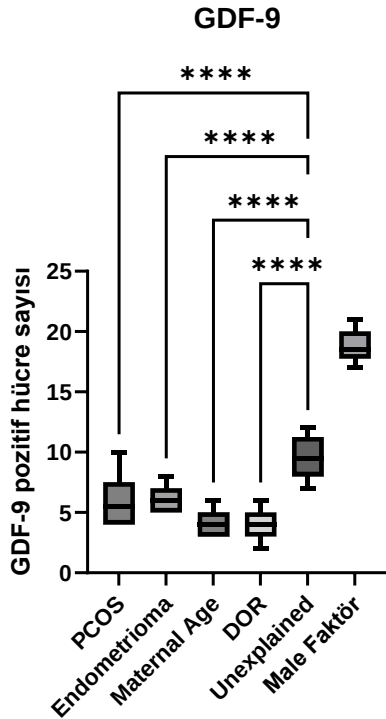
karşın, unexplained grubu ile PCOS (8.70 ± 1.55 vs 7.20 ± 2.19 , $p: 0.1773$) ve endometrioma (8.70 ± 1.55 vs 7.10 ± 1.30 , $p: 0.1353$) grupları karşılaştırıldığında BMP-15 seviyeleri açısından istatistiki anlamlı fark bulunmamaktadır.

Unexplained grubu ile kontrol grubu EGF seviyeleri (10.50 ± 1.28 vs 14.70 ± 1.95 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. DOR grubu ile diğer gruplar EGF seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.19, $p < 0.0001$). Unexplained grubu ile EGF seviyeleri açısından karşılaştırma yapıldığında PCOS (10.50 ± 1.28 vs 7.00 ± 1.26 , $p < 0.0001$), endometrioma (10.50 ± 1.28 vs 6.50 ± 1.69 , $p < 0.0001$), maternal age (10.50 ± 1.28 vs 4.80 ± 1.33 , $p < 0.0001$) ve DOR (10.50 ± 1.28 vs 4.33 ± 1.56 , $p < 0.0001$) grupları arasında istatistiksel anlamlı fark çıkmaktadır.

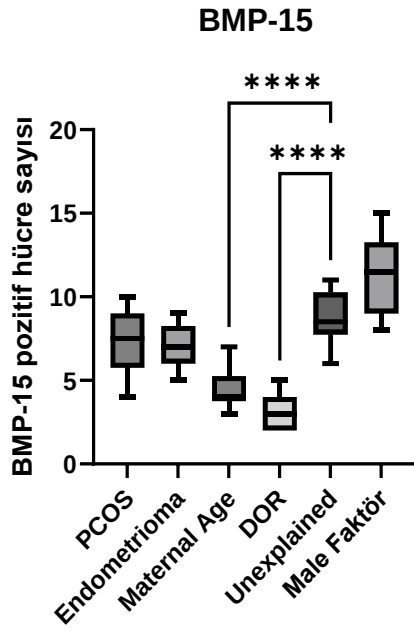
Unexplained grubu ile kontrol grubu apoptoz seviyeleri (6.20 ± 1.25 vs 1.70 ± 1.10 , $p < 0.0001$) açısından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. DOR grubu ile diğer gruplar apoptoz seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve bazı gruplar ile anlamlı fark bulunmuştur (şekil 4.20, $p < 0.0001$). Unexplained grubu apoptoz seviyeleri incelendiğinde PCOS (6.20 ± 1.25 vs 12.10 ± 1.51 , $p < 0.0001$), endometrioma (6.20 ± 1.25 vs 8.20 ± 1.47 , $p: 0.0481$), maternal age (6.20 ± 1.25 vs 11.50 ± 2.20 , $p < 0.0001$) ve DOR (6.20 ± 1.25 vs 11.89 ± 1.97 , $p < 0.0001$) grupları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmaktadır.



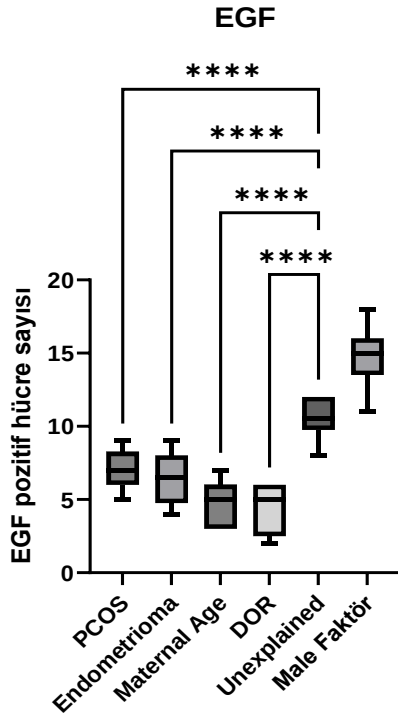
Resim 4.6. Unexplained grubuna ait cumulus hücrelerinde (A) GDF-9, (B) BMP-15, (C) EGF ve (D) TUNEL boyama fotomikrografı



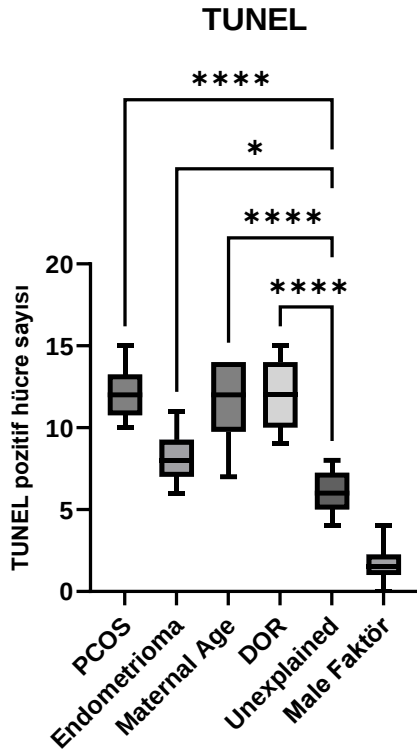
Şekil 4.17. GDF-9 seviyelerinin unexplained grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.18. BMP-15 seviyelerinin unexplained grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.19. EGF seviyelerinin unexplained grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır



Şekil 4.20. Apoptoz seviyelerinin unexplained grubuna göre olan seviyeleri. Veri çubukları 5 ve 95'nci persentil seviyelerini temsil eder. Veri çubuklarının içerisindeki çizgiler median belirteçidir. Gruplar arası istatistiki fark (*) ile ifade edilmiştir. Gruplar arası farklar ANOVA Bonferroni Post-Hoc testi ile karşılaştırılmıştır

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının amacı farklı infertilite etiyolojilerine sahip infertil kadınlardan elde edilen kumulus hücrelerinde EGF, GDF-9, BMP-15 ve TUNNEL verileri ile klinik sonuçları ile analiz etmektir. Bu amaçla 10 PCOS, 10 endometrioma, 10 advanced maternal age, 10 DOR, 10 unexplained ve 10 erkek faktör infertilite tanısı almış çiftten kumulus örnekleri alındı ve EGF, GDF-9, BMP-15 faktörleri açısından immünohistokimyasal metotlar kullanılarak analiz edildi. Buna ek olarak kumulus hücrelerindeki apoptoz seviyeleri TUNNEL testi ile incelendi. Elde edilen immünohistokimyasal veriler ve apoptoz seviyeleri klinik parametreler ile korelasyon saptanabilmesi açısından analiz edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik verileri ve siklus parametreleri incelendiğinde gruplar arasında çeşitli farkların olduğu gösterilmiştir (bakınız bölüm 4.1). Bu farklar, farklı infertilite tanıları nedenleriyle alakalı olup tezin hipotezinin temelini oluşturan farklardır. Örnek vermek gerekirse, advanced maternal age grubuyla PCOS grubu arasında kadın yaşı arasından istatistiki olarak anlamlı bir farkın bulunması tez çalışmasının tasarlanışına bağlı olarak doğal bir farktır. Bu sebeple demografik veriler incelendiğinde gözlemlediğimiz istatistiki farklar iki farklı grup üzerindeki etkilerin incelenmesinden ziyade iki farklı infertilite tanısının taşıdığı farkların follikülogenez sürecine ne denli etki ettiğinin incelenmesine olanak sağlamaktadır. Hasta gruplarının demografik ve KOH sürecine ilişkin bulguları klinik embriyoloji bulgularıyla birlikte literatürde yayımlanan bulgular ile uyumludur. Tez çalışmasının hazırlanıldığı aşamalarda Etik kurul izni alınması noktasında bürokratik engellerden dolayı oldukça fazla zaman kaybedilmiştir. Bu sebeple hedeflenen birincil çıktı noktalarından olan siklus gebelik sonuçları (klinik gebelik oranları, implantasyon oranları, abortus oranları ve canlı doğum oranları) tezin teslim aşamasına yetişememiştir. Bu verilerin tamamlanması ile tez çalışması bilimsel dergilerde yayın için hazırlanacaktır.

Hastaların infertilite tanılarının konulmasında klinisyenler literatür ile uyumlu metotlar izlemiştir. Özellikle endometriosis olguların tanısı zor bir grup olduğundan tartışma bölümünde tanı kriterleri ek olarak irdelenmelidir. Endometriosis tanısı konulabilmesi için altın standart laparoskopik girişimdir. Fakat, endometrial dokunun ektopik olarak overlerde lokalize olduğu endometrioma durumları için tranvajinal yol ile yüksek hassasiyette tanı konulabilmektedir. Bu sebeple, tez kapsamında olan tek endometriosis grubu olan endometrioma tanısı için abdominal/transvajinal ultrasonografi yolu tercih edildi. Bu

teknikle hastalığın tanısında %93 sensitivite ve %97 spesifite olduğu bilinmektedir [182-184].

Özellikle GDF-9 ve BMP-15 seviyelerinin kumulus hücrelerinde incelendiği araştırmalarda önemli bir metodolojik farklılık bulunmaktadır. Kumulus hücrelerinin elde edilme noktasında araştırmacılar COC yapılarının hyaluronidaz enzimi ile işlem görmesinden sonraki adımlarda, özellikle santrifüj aşamasından sonra kumulus hücrelerini elde etmektedirler. Bu durum kumulus hücrelerinde gerek mekanik gerekse fizyolojik strese maruz bırakabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında ise OPU işlemi sonrasında COC hücreleri redükte edilmiş ve böylece kumulus hücreleri doğal şartlarına daha yakın bir şekilde santrifüj işlemine maruz bırakılmadan ve daha da önemlisi ekstraselüler matriks komponenti ile elde edilmiştir. Bu sebeple, literatür çalışmalarına kıyasla daha optimal bir örnekleme yapılmış ve daha doğru sonuçlar elde edildiğine inanılmaktadır.

Folikülogenez sürecinde oosit kaynaklı ilk büyüme faktörü olarak tespit edilen GDF-9 molekülüdür [182]. GDF-9 molekülünün pek çok görevi bulunduğu gibi granüloza hücrelerinde FSH ile indüklenen farklılaşmayı baskıladığı bilinmektedir. Bu sebeple, GDF-9 seviyelerinin kumulus hücrelerinde sağlıklı gruplara göre göreceli azaldığı durumlarda over fonksiyonları ve oosit kalitesi üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği bilinmektedir. Oosit kalitesi ve matürasyonu üzerine etkilerinin bilindiği GDF-9 molekülünün kumulus hücrelerindeki seviyesi düştüğü durumlarda oosit hücresi ile kumulus hücreleri arasındaki moleküler iletişim kabiliyetinin zayıfladığı öngörülebilir. Sonuç olarak, moleküler iletişim yollarındaki bu zayıflama ise oosit kalitesinde düşüklüklere sebep açabilmektedir. GDF-9 kaynaklı iletişim yoluyla bu iletişim bozukluklarının sebep açtığı oosit kalitesindeki azalma ise bahsi geçen oositlerin fertilizasyon yollarında anomalilere ve sub-optimal oosit aktivasyonuna neden olabilir. Buna bağlı olarak kötü kalitede embriyogenez süreci ile başlayan ve kötü klinik performans sergilenen YÜT tedavisi süreçleri gözlemlenebilir. Oldukça güncel çalışmalara göre kötü prognozlu hastaların gerek follikül sıvısındaki gerekse kumulus hücrelerindeki azalmış GDF-9 seviyeleri dikkat çekmektedir [183]. Özellikle POSEIDON grup 3 sınıflamasındaki kötü prognozlu hastalar incelendiğinde GDF-9 ve BMP-15 seviyelerinin hem follikül sıvısında hem de kumulus hücrelerindeki seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir [183]. Bu bulgular bu tez çalışmasındaki DOR grubuyla uyumludur. Çalışmamızda, DOR grubu POSEIDON grup 3 sınıflamasıyla uyumlu olup literatürde belirtildiği gibi kontrol grubuna göreceli bir şekilde bu iki sinyal molekülünün

seviyeleri düşük bulunmuştur. Bu düşüklüğe bağlı olarak sonuçlandığı düşünülen apoptoz seviyeleri ise kontrol grubuna kıyasla daha fazla olarak gözlemlenmiştir.

PCOS hastalarında GDF-9 ve BMP-15 seviyelerini hem oosit hücrelerinde hem de kumulus hücrelerinde analiz eden nadir çalışmalardan bir tanesine göre, KOH veya spontan siklulardan elde edilmiş oosit hücrelerinde hem GDF-9 hem de BMP-15 seviyelerinin kontrol grubuyla aynı olduğu gösterilmiştir [130]. Fakat, aynı çalışmaya göre oosit hücrelerindeki seviyeler aynı olsa bile kumulus hücrelerindeki GDF-9 seviyelerinde azalma olduğu gösterilmiştir. Kumulus hücrelerindeki BMP-15 seviyesi ise bahsi geçen çalışma sonuçlarına göre kontrol grubuyla benzer şekilde gözlemlenmiştir. Literatürle kıyaslandığında tez çalışmasının BMP-15 verilerine ters düşen bulgular saptanmıştır. Tez çalışmasının PCOS grubunda hem GDF-9 hem de BMP-15 seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla azalma gözlemlenmiştir. Fakat bu azalma en azından incelenen klinik parametrelerden BMP-15 ile daha alakalı olduğunu düşündüğümüz matürasyon oranlarına etki etmemiştir. Matürasyon oranları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. GDF-9 ve BMP-15 seviyelerinin PCOS hasta grubunda incelendiği bir diğer çalışmada ise her iki faktörün de PCOS grubunda azalma eğiliminde olduğu raporlanmıştır [184]. Bu çalışma tarafından sunulan bulgular ise tez konusu PCOS bulguları ile hem fikir şekildedir.

GDF-9 molekülünü in vitro olarak kültür sıvılarına eklenmesiyle insan over korteks dokusundan sekonder follikül gözlemlene oranı %31 seviyesinden %53 seviyesine yükseldiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [185]. Dolayısı ile oosit kalitesiyle direkt alakalı olan GDF-9 molekülünün kumulus hücrelerindeki seviyesinin azalması in vitro çalışmaların da desteklediği gibi follikülogenez sürecinin sub-optimal olabileceğini işaret etmektedir. Sonuç olarak KOH ile elde edilmiş COC'lerden de buna bağlı olarak klinik anlamda daha düşük performans beklemek çalışmaların mantığına uymaktadır.

BMP-15 molekülü oosit matürasyonu için önemlidir. Azalmış kumulus hücresi BMP-15 içeriği ile oosit matürasyonu arasında bir ilişki bulunmuştur [176, 186]. Buna ek olarak, yine oosit matürasyonu ile ilişkilendirilmiş kumulus hücrelerindeki BMP-15 seviyesinin kumulus kütlesi ekspansiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir [183]. Bu sebeple, herhangi bir nedenle kumulus hücrelerinde düşük BMP-15 ekspresyonuna sebep olan herhangi bir girişim ve faktör oosit kohortunda azalmış metafaz II seviyesindeki oosit miktarını

azaltacaktır. Matür oosit sayısındaki bu azalma ise en önemli klinik KPI'lar arasında olup doğrudan YÜT başarısı açısından oldukça önemlidir.

EGF sinyal molekülü ise mural granüloza hücreleri ile kumulus hücreleri arasındaki LH sinyal yolağını tamamlayan moleküllerdir. Mural granüloza hücrelerinde bol LH reseptörü bulunurken kumulus hücrelerinde bu sayı oldukça azdır. Dolayısı ile mural granüloza hücreleri LH sinyal yolağını EGF molekülleri ile kumulus hücrelerine iletirler. Amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG), BTC ve PTGE2 moleküllerinin hepsi EGF ailesinden olup bahsi geçen LH sinyal yolağı ile tetiklenen süreci kumulus hücrelerine iletmekle sorumludurlar [187, 188]. Bu moleküllerin kumulus hücresinde artmasıyla kumulus kütle ekspansiyonu tetiklenir ve oosit hücresinin final matürasyonu için gerekli olayların gerçekleşmesi sağlanır. Bu sebeple, herhangi bir nedenden dolayı EGF moleküllerinin seviyesinin azalması oosit matürasyonunda bazı defektlere sebep açabilmektedir. Özellikle PCOS hasta grupları bu tarz anomaliliklere yatkınlığıyla öne çıkabilmektedir. Çalışma gruplarındaki gruplardaki EGF immünohistokimyasal sonuçlar bu çerçeveden incelendiğinde araştırılan klinik bulgular ile ilişkili bir farklılık bulunamamıştır.

Gruplar arası EGF, GDF-9, BMP-15 ve apoptoz seviyeleri incelendiğinde infertilite sebebinden bağımsız olarak GDF-9 ve BMP-15 seviyelerinin azaldığı ve bununla ilişkilendirilmiş şekilde apoptoz seviyelerinin arttığı gözlemlenmektedir. YÜT prognozu incelendiğinde nispeten kötü senaryo çizilen hastalıklar incelenmesi sebebiyle bu benzerliğin anlaşılabilir olduğu düşünülmektedir. Özellikle ileri kadın yaşı ve DOR tanılarında bu kötü prognoz senaryosunun daha da ön plan çıktığı görülmektedir. YÜT başarısı olarak sıklıkla başarısız tedavi sonuçlarıyla sonuçlanan bu hastalıklarda GDF-9 ve BMP-15 seviyelerindeki azalmanın katkısının olduğu düşünülmektedir.

Yukarıdaki bilgiler göz önüne alındığında GDF-9, BMP-15, EGF ve apoptoz seviyelerinin YÜT tedavi başarısı ile doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olduğu anlaşılabilir. Fakat, YÜT kapsamında uygulanan ve tedavi başarısını temelden etkileyen bir diğer faktör de kullanılan ilaç protokolü ve kullanılan ilaçların çeşitliliği olabilmektedir. Yapılan çalışmalara göre YÜT performansı uygulanan KOH protokolü ile ilişkilidir ve aynı hasta gruplarının randomize kontrollü olarak incelendiği çalışmaya göre klinik çıktılar istatistiki olarak anlamlı bir şekilde değişiklik gösterebilmektedir [189]. Buna ek olarak, uygulanan KOH protokolünden bağımsız olacak şekilde kullanılan gonadotropin kaynağı da kumulus hücreleri gen

ekspresyonu üzerinde farklılıklar yaratabileceği gösterilmiştir [190]. Bu tez çalışmasında sadece tek tip KOH protokolü uygulanmış ve tüm gönüllüler için rekombinant teknoloji ile elde edilmiş saflaştırılmış gonatropin ilaçları uygulanmıştır. Bu sebeple, farklı protokollerle elde edilmiş kumulus hücrelerindeki EGF, GDF-9, BMP-15 ve apoptoz seviyelerinin incelenmesi mantıklı olacaktır. Buna ek olarak tez çalışmasındaki örneklem sayısının azlığı nedeni ile daha geniş gönüllü sayılı kohort çalışmalar ile bu bulguların incelenmesi, tez çalışmasının bulgularını daha güçlü kılacaktır. Buna ek olarak, gebelik elde edilmiş ve canlı doğumla sonuçlanmış oositlerden elde edilen kumulus hücreleri, gebelik elde edilememiş kumulus hücreleri ve abortus ile sonuçlanmış kumulus hücrelerinin bu faktörler açısından karşılaştırılması kişiselleştirilmiş hasta servisine katkıda bulunabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, farklı infertilite etiyolojilerine sahip kadınlardan elde edilen kumulus hücrelerinde EGF, GDF-9, BMP-15 ve apoptoz seviyelerinin immünohistolojik metodlar ile incelenip, bu hücrelerin fonksiyonel durumlarının ve klinik sonuçlar üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına katkı sağlamıştır. Elde edilen bulgular, çeşitli infertilite tanılarının kumulus hücrelerinin moleküler profilleri üzerinde farklı etkiler yarattığını göstermektedir. DOR ve ileri anne yaşı gruplarında GDF-9 ve BMP-15 seviyelerinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Bu azalma, oosit kalitesinin düşmesi ve dolayısıyla klinik gebelik oranlarının düşük olması ile ilişkilendirilebilir. Apoptoz seviyelerinin artması da bu bulguyu desteklemektedir. PCOS grubunda GDF-9 seviyelerinde azalma görülmüş, ancak BMP-15 seviyelerinde literatüre göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum, PCOS'un moleküler patogenezinde heterojenlik olduğunu düşündürmektedir. Alternatif olarak ise, literatürde kullanılan KOH protokollerinde bu farkların oluşabileceği ihtimaller arasındadır. GDF-9 ve BMP-15 seviyelerindeki azalma, oosit kalitesinin düşmesine ve oosit ile kumulus hücreleri arasındaki moleküler iletişimin zayıflamasına yol açabilir. Bu durum, fertilizasyon sürecinde anomalilere ve sub-optimal oosit aktivasyonuna neden olabilir. Kumulus hücrelerinde artan apoptoz seviyeleri, folikülogenez sürecindeki stres ve hasarın bir göstergesi olabilir. Bu durum, özellikle kötü prognozlu infertilite gruplarında daha belirgin olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın bulgularını desteklemek ve genel geçerliliğini artırmak amacıyla, daha geniş gönüllü sayısına sahip kohort çalışmalar yapılmalıdır. Böylece elde edilen verilerin istatistiksel gücü artacak ve sonuçlar daha güvenilir olacaktır. Kumulus hücrelerinin moleküler profilleri üzerinde farklı KOH protokollerinin etkileri araştırılmalıdır. Bu, tedaviye verilen yanıtın kişiselleştirilmesi açısından önemlidir. Gelecekteki çalışmalar, gebelik ve canlı doğumla sonuçlanmış oositlerden elde edilen kumulus hücreleri ile başarısız gebelik ve abortus ile sonuçlanmış oositlerin karşılaştırılmasını içermelidir. Bu, YÜT tedavi başarısının öngörülmesine katkı sağlayabilir. Kumulus hücrelerindeki GDF-9, BMP-15 ve apoptoz seviyelerinin ölçümü, infertilite tedavisi alan hastaların tedavi planlamasında bir biyomarker olarak kullanılabilir. Bu analizler, oosit kalitesi ve tedavi başarısının öngörülmesinde yardımcı olabilir. Hastalarda düşük GDF-9 ve BMP-15 seviyeleri dikkate alınarak, tedavi stratejileri bu moleküllerin seviyelerini artırmayı hedefleyebilir. Bu, oosit kalitesinin iyileştirilmesine yardımcı olabilir. PCOS hastalarının tedavi yönetiminde, GDF-9 ve BMP-15 seviyelerinin izlenmesi, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yardımcı olabilir. Bu hastalarda oosit kalitesinin değerlendirilmesi ve

tedaviye verilen yanıtın optimize edilmesi önemlidir. Bu çalışma, farklı infertilite etiyolojilerine sahip kadınlarda kumulus hücrelerindeki GDF-9, BMP-15, EGF ve apoptoz seviyelerinin analiz edilmesinin, klinik embriyoloji ve infertilite tedavisi alanında önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Bu moleküler belirteçlerin incelenmesi, tedavi planlamasında daha hassas ve kişiselleştirilmiş yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Gelecekte yapılacak daha geniş ve detaylı çalışmalar, bu alandaki bilgi birikimini artırarak, infertilite tedavisinin etkinliğini ve başarısını artırmaya yönelik önemli adımlar atılmasına olanak tanıyacaktır.

KAYNAKLAR

1. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Vanderpoel, S., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive, T., and World Health, O. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1520-1524.
2. Boivin, J., Bunting, L., Collins, J.A., and Nygren, K.G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, 22(6), 1506-1512.
3. Mascarenhas, M.N., Flaxman, S.R., Boerma, T., Vanderpoel, S., and Stevens, G.A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Medicine*, 9(12), e1001356.
4. Cox, C.M., Thoma, M.E., Tchangalova, N., Mburu, G., Bornstein, M.J., Johnson, C.L., and Kiarie, J. (2022). Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Open*, (4), 51.
5. Taşçı Duran, E., Bolsoy, N., Kavlak, O., and Yücesoy, F. (2008). İnfertil kadınlarda evlilik uyumu. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, 5(2), 105-110.
6. Araştırması, T.N.S. (2019). *2018 Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması*. Ankara: Elma Teknik Basım Matbaacılık, 125-128.
7. European, I.V.F.M.C.f.t.E.S.o.H.R., Embryology, Smeenk, J., Wyns, C., De Geyter, C., Kupka, M., Bergh, C., Cuevas Saiz, I., De Neubourg, D., Rezabek, K., Tandler-Schneider, A., Rugescu, I., and Goossens, V. (2023). ART in Europe, 2019: results generated from European registries by ESHREdagger. *Human Reproduction*, 38(12), 2321-2338.
8. Domar, A., Gordon, K., Garcia-Velasco, J., La Marca, A., Barriere, P., and Beligotti, F. (2012). Understanding the perceptions of and emotional barriers to infertility treatment: a survey in four European countries. *Human Reproduction*, 27(4), 1073-9.
9. Rouchou, B. (2013). Consequences of infertility in developing countries. *Perspect Public Health*, 133(3), 174-9.
10. Njagi, P., Groot, W., Arsenijevic, J., Dyer, S., Mburu, G., and Kiarie, J. (2023). Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low- and middle-income countries: a systematic review. *Human Reproduction Open*, (2), 7.
11. El Hayek, S., Bitar, L., Hamdar, L.H., Mirza, F.G., and Daoud, G. (2016). Poly cystic ovarian syndrome: an updated overview. *Frontiers in Physiology*, 7, 124.
12. Motlagh Asghari, K., Nejadghaderi, S.A., Alizadeh, M., Sanaie, S., Sullman, M.J., Kolahi, A.-A., Avery, J., and Safiri, S. (2022). Burden of polycystic ovary syndrome in the Middle East and North Africa region, 1990–2019. *Scientific Reports*, 12(1), 7039.

13. Balen, A.H., Tan, S.-L., MacDougall, J., and Jacobs, H.S. (1993). Miscarriage rates following in-vitro fertilization are increased in women with polycystic ovaries and reduced by pituitary desensitization with buserelin. *Human Reproduction*, 8(6), 959-964.
14. Azziz, R., Woods, K.S., Reyna, R., Key, T.J., Knochenhauer, E.S., and Yildiz, B.O. (2004). The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2745-2749.
15. Bharathi, R.V., Swetha, S., Neerajaa, J., Madhavica, J.V., Janani, D.M., Rekha, S., Ramya, S., and Usha, B. (2017). An epidemiological survey: Effect of predisposing factors for PCOS in Indian urban and rural population. *Middle East Fertility Society Journal*, 22(4), 313-316.
16. Bremer, A.A. (2010). Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 8(5), 375-394.
17. Hashemipour, M., Amini, M., Iranpour, R., Sadri, G.H., Javaheri, N., Haghighi, S., Hovsepian, S., Javadi, A.A., Nematbakhsh, M., and Sattari, G. (2004). Prevalence of congenital hypothyroidism in Isfahan, Iran: results of a survey on 20,000 neonates. *Hormone Research*, 62(2), 79-83.
18. Lujan, M.E., Chizen, D.R., and Pierson, R.A. (2008). Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: pitfalls and controversies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 30(8), 671-679.
19. Merkin, S.S., Phy, J.L., Sites, C.K., and Yang, D. (2016). Environmental determinants of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 106(1), 16-24.
20. Catteau-Jonard, S. and Dewailly, D. (2009). Pathophysiology of disturbed folliculogenesis in PCOS. *Médecine de la Reproduction*, 11(3), 191-197.
21. Qiao, J. and Feng, H.L. (2011). Extra-and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Human Reproduction Update*, 17(1), 17-33.
22. Li, Q., McKenzie, L.J., and Matzuk, M.M. (2008). Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Molecular Human Reproduction*, 14(12), 673-678.
23. Butts, S., Riethman, H., Ratcliffe, S., Shaunik, A., Coutifaris, C., and Barnhart, K. (2009). Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(12), 4835-4843.
24. Toner, J.P., Philput, C.B., Jones, G.S., and Muasher, S.J. (1991). Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertility and Sterility*, 55(4), 784-791.
25. Szafarowska, M. and Jerzak, M. (2013). Ovarian aging and infertility. *Ginekologia Polska*, 84(4), 298-304.

26. Yun, B.H., Kim, G., Park, S.H., Noe, E.B., Seo, S.K., Cho, S., Choi, Y.S., and Lee, B.S. (2017). In vitro fertilization outcome in women with diminished ovarian reserve. *Obstetrics & Gynecology Science*, 60(1), 46.
27. Cooper, A.R., Baker, V.L., Sterling, E.W., Ryan, M.E., Woodruff, T.K., and Nelson, L.M. (2011). The time is now for a new approach to primary ovarian insufficiency. *Fertility and Sterility*, 95(6), 1890-1897.
28. Kesharwani, D.K., Mohammad, S., Acharya, N., and Joshi, K.S. (2022). Fertility With Early Reduction of Ovarian Reserve. *Cureus*, 14(10), e30326.
29. Younis, J.S., Ben-Ami, M., and Ben-Shlomo, I. (2015). The Bologna criteria for poor ovarian response: a contemporary critical appraisal. *Journal of Ovarian Research*, 8, 76.
30. Brown, J. and Farquhar, C. (2014). Endometriosis: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), 1-9.
31. Parazzini, F., Esposito, G., Tozzi, L., Noli, S., and Bianchi, S. (2017). Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 209, 3-7.
32. Giudice, L.C. (2010). Clinical practice: endometriosis. *The New England Journal of Medicine*, 362(25), 2389.
33. Gylfason, J.T., Kristjansson, K.A., Sverrisdottir, G., Jonsdottir, K., Rafnsson, V., and Geirsson, R.T. (2010). Pelvic endometriosis diagnosed in an entire nation over 20 years. *American Journal of Epidemiology*, 172(3), 237-243.
34. Simoens, S., Dunselman, G., Dirksen, C., Hummelshoj, L., Bokor, A., Brandes, I., Brodsky, V., Canis, M., Colombo, G.L., and DeLeire, T. (2012). The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Human Reproduction*, 27(5), 1292-1299.
35. De Ziegler, D., Borghese, B., and Chapron, C. (2010). Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *The Lancet*, 376(9742), 730-738.
36. Macer, M.L. and Taylor, H.S. (2012). Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 39(4), 535-549.
37. Dunselman, G., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A., Kiesel, L., and Nap, A. (2014). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human Reproduction*, 29(3), 400-412.
38. Olive, D.L. and Pritts, E.A. (2001). Treatment of endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 345(4), 266-275.
39. Medicine, P.C.o.t.A.S.f.R. (2012). Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 98(3), 591-598.
40. Opøien, H.K., Fedorcsak, P., Omland, A.K., Åbyholm, T., Bjercke, S., Ertzeid, G., Oldereid, N., Mellembakken, J.R., and Tanbo, T. (2012). In vitro fertilization is a

- successful treatment in endometriosis-associated infertility. *Fertility and sterility*, 97(4), 912-918.
41. Filip, L., Duică, F., Prădatu, A., Crețoiu, D., Suci, N., Crețoiu, S.M., Predescu, D.V., Varlas, V.N., and Voinea, S.C. (2020). Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches. *Medicina*, 56(9).
 42. Mills, M., Rindfuss, R.R., McDonald, P., Te Velde, E., Reproduction, E., and Force, S.T. (2011). Why do people postpone parenthood? Reasons and social policy incentives. *Human Reproduction Update*, 17(6), 848-860.
 43. Schmidt, L., Sobotka, T., Bentzen, J.G., Nyboe Andersen, A., Reproduction, E., and Force, S.T. (2012). Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Human Reproduction Update*, 18(1), 29-43.
 44. Goossens, V., Harton, G., Moutou, C., Traeger-Synodinos, J., Van Rij, M., and Harper, J.C. (2009). ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Human Reproduction*, 24(8), 1786-1810.
 45. Capalbo, A., Hoffmann, E.R., Cimadomo, D., Maria Ubaldi, F., and Rienzi, L. (2017). Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. *Human Reproduction Update*, 23(6), 706-722.
 46. Ubaldi, F.M., Cimadomo, D., Capalbo, A., Vaiarelli, A., Buffo, L., Trabucco, E., Ferrero, S., Albani, E., Rienzi, L., and Levi Setti, P.E. (2017). Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy testing in women older than 44 years: a multicenter experience. *Fertility and Sterility*, 107(5), 1173-1180.
 47. Vaiarelli, A., Cimadomo, D., Ubaldi, N., Rienzi, L., and Ubaldi, F.M. (2018). What is new in the management of poor ovarian response in IVF? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 30(3), 155-162.
 48. Miao, Y.-L., Kikuchi, K., Sun, Q.-Y., and Schatten, H. (2009). Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*, 15(5), 573-585.
 49. Keefe, D., Kumar, M., and Kalmbach, K. (2015). Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertility and Sterility*, 103(2), 317-322.
 50. Cimadomo, D., Fabozzi, G., Vaiarelli, A., Ubaldi, N., Ubaldi, F.M., and Rienzi, L. (2018). Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 327.
 51. Cheng, J.-M. and Liu, Y.-X. (2017). Age-Related Loss of Cohesion: Causes and Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1578.
 52. Steuerwald, N., Cohen, J., Herrera, R.J., Sandalinas, M., and Brenner, C.A. (2001). Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 7(1), 49-55.

53. Kolano, A., Brunet, S., Silk, A.D., Cleveland, D.W., and Verlhac, M.-H. (2012). Error-prone mammalian female meiosis from silencing the spindle assembly checkpoint without normal interkinetochore tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), E1858-E1867.
54. Keefe, D.L. (2016). Telomeres, Reproductive Aging, and Genomic Instability During Early Development. *Reproductive Sciences*, 23(12), 1612-1615.
55. de Lange, T. (2009). How Telomeres Solve the End-Protection Problem. *Science*, 326(5955), 948-952.
56. Van Blerkom, J. (2011). Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, 11(5), 797-813.
57. National Library of Medicine (2019). Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781. *Obstetrics & Gynecology*, 133(6), e377-e384.
58. (2020). Evidence-based treatments for couples with unexplained infertility: a guideline. *Fertility and Sterility*, 113(2), 305-322.
59. Sadler, T. W. (2015). *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins, 128-132.
60. Moore, K.L., Persaud, T.V.N., and Torchia, M.G. (2011). *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects*. London: Elsevier Health Sciences, 146-148.
61. Knobil, E., Neill, J. D., Challis, J. R. G., Pfaff, D. W., Plant, T. M., de Kretser, D. M., and Wassarman, P. M. (2006). Rat ovarian cycle. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2, 2364.
62. Jones, R.E. and Lopez, K.H. (2013). *Human Reproductive Biology*. London: Elsevier Science, 188-190.
63. Gilbert, S.F. (2014). *Developmental biology / Scott F. Gilbert* (10th ed.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 203-208.
64. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2011). *Histology: A Text and Atlas : With Correlated Cell and Molecular Biology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Health, 300-302.
65. Pawlina, W., (2023). *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 318-320.
66. Paulsen, F. and Waschke, J. (2013). *Sobotta Atlas of Human Anatomy, English: General Anatomy and Musculoskeletal System*. Berlin: Elsevier Health Sciences, 211-213.
67. Sobotta, J., Paulsen, F., Waschke, J., Elhan, A., and Karahan, S. T. (2011). *İnsan anatomisi atlası: İç organlar / Çev.: H. İ. Açar*. Ankara: Beta, 2.
68. Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischau, A.-M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene

- from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240-244.
69. Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346(6281), 245-250.
 70. Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., and McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397(6718), 405-9.
 71. Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., and Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nature Genetics*, 38(11), 1304-1309.
 72. Boulanger, L., Pannetier, M., Gall, L., Allais-Bonnet, A., Elzaiat, M., Le Bourhis, D., Daniel, N., Richard, C., Cotinot, C., Ghyselinck-Norbert, B., and Pailhoux, E. (2014). FOXL2 Is a Female Sex-Determining Gene in the Goat. *Current Biology*, 24(4), 404-408.
 73. Biason-Lauber, A. and Chaboissier, M. C. (2015). Ovarian development and disease: The known and the unexpected. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 45, 59-67.
 74. Satoh, M. (1991). Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *Journal of Anatomy*, 177, 85-107.
 75. Hu, Y.C., Okumura, L.M., and Page, D.C. (2013). Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS Genetics*, 9(7), e1003629.
 76. Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I., and Aizawa, S. (1997). Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development*, 124(9), 1653-64.
 77. Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74(4), 679-91.
 78. Birk, O.S., Casiano, D.E., Wassif, C.A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S., Kreidberg, J.A., Parker, K.L., Porter, F.D., and Westphal, H. (2000). The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature*, 403(6772), 909-913.
 79. Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77(4), 481-490.
 80. Fujimoto, Y., Tanaka, S. S., Yamaguchi, Y. L., Kobayashi, H., Kuroki, S., Tachibana, M., and Nishinakamura, R. (2013). Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Developmental Cell*, 26(4), 416-430.
 81. Jameson, S.A., Natarajan, A., Cool, J., DeFalco, T., Maatouk, D.M., Mork, L., Munger, S.C., and Capel, B. (2012). Temporal transcriptional profiling of somatic and germ cells reveals biased lineage priming of sexual fate in the fetal mouse gonad. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002575.

82. Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., Marzi, L., Cohen-Solal, A., Georg, I., Klattig, J., Englert, C., Kim, Y., Capel, B., Eguchi, N., Urade, Y., Boizet-Bonhoure, B., and Poulat, F. (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development*, 136(11), 1813-21.
83. Maatouk, D.M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K.L., Taketo, M.M., and Capel, B. (2008). Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Human Molecular Genetics*, 17(19), 2949-55.
84. Clevers, H. and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192-205.
85. Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., and Behrens, J. (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), 1184-93.
86. Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., and Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/ β -catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Developmental Cell*. 7(4), 525-34.
87. Ohkawara, B., Glinka, A., and Niehrs, C. (2011). Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. *Developmental Cell*, 20(3), 303-14.
88. Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C.M., and Niehrs, C. (2011). LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Reports*, 12(10), 1055-61.
89. Lavery, R., Chassot, A.A., Pauper, E., Gregoire, E.P., Klopfenstein, M., de Rooij, D.G., Mark, M., Schedl, A., Ghyselinck, N.B., and Chaboissier, M.C. (2012). Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. *PLoS Genetics*, 8(12), e1003170.
90. Nicol, B. and Yao, H.H. (2015). Gonadal Identity in the Absence of Pro-Testis Factor SOX9 and Pro-Ovary Factor Beta-Catenin in Mice. *Biology of Reproduction*, 93(2), 35-41
91. Mills, S. E. (2012). *Histology for Pathologists*. Baltimore: Wolters Kluwer Health.
92. Hassold, T. and Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*, 2(4), 280-291.
93. Li, L., Shi, X., Shi, Y., and Wang, Z. (2021). The signaling pathways involved in ovarian follicle development. *Frontiers in Physiology*, 12, 730196.
94. Xie, J., Xu, X., and Liu, S. (2023). Intercellular communication in the cumulus–oocyte complex during folliculogenesis: A review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1087612.

95. Monné, M., and Jovine, L. (2011). A structural view of egg coat architecture and function in fertilization. *Biology of Reproduction*, 85(4), 661-669.
96. Moros-Nicolás, C., Chevret, P., Jiménez-Movilla, M., Algarra, B., Cots-Rodríguez, P., González-Brusi, L., Avilés, M., and Izquierdo-Rico, M.J. (2021). New Insights into the Mammalian Egg Zona Pellucida. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3276.
97. Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis, L. K., Plancha, C. E., and Albertini, D. F. (2008). Oogenesis: prospects and challenges for the future. *Journal of Cellular Physiology*, 216(2), 355-365.
98. Falck, B. (1959). Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiologica Scandinavica*, 47(4), 1-101.
99. El-Fouly, M. A., Cook, B., Nekola, M., and Nalbandov, A. V. (1970). Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology*, 87(2), 288-293.
100. Nekola, M. V., and Nalbandov, A. V. (1971). Morphological changes of rat follicular cells as influenced by oocytes. *Biology of Reproduction*, 4(2), 154-160.
101. Gilchrist, R. B., Lane, M., and Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, 14(2), 159-177.
102. Eppig, J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829-838.
103. Su, Y. Q., Sugiura, K., and Eppig, J. J. (2009, January). Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(1), 32-42.
104. Vanderhyden, B.C., Macdonald, E.A., Nagyova, E., and Dhawan, A. (2003). Evaluation of members of the TGFbeta superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. *Reprod Suppl.* 61, 55-70.
105. Vanderhyden, B.C. and Tonary, A.M. (1995). Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the oocyte. *Biology of Reproduction*, 53(6), 1243-50.
106. Hussein, T. S., Froiland, D. A., Amato, F., Thompson, J. G., and Gilchrist, R. B. (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*, 118(22), 5257-5268.
107. Knight, P.G. and Glistner, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132(2), 191-206.
108. Otsuka, F., McTavish, K. J., and Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*, 78(1), 9-21.

109. Shimasaki, S., Zachow, R. J., Li, D., Kim, H., Iemura, S. I., Ueno, N., and Erickson, G. F. (1999). A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), 7282-7287.
110. Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W., and Einspanier, R. (2000). Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, 167(3), 371-382.
111. Shimasaki, S., Moore, R. K., Otsuka, F., and Erickson, G. F. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews*, 25(1), 72-101.
112. McPherron, A. C., and Lee, S. J. (1993). GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, 268(5), 3444-3449.
113. McGrath, S. A., Esquela, A. F., and Lee, S. J. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology*, 9(1), 131-136.
114. Laitinen, M., Vuojolainen, K., Jaatinen, R., Ketola, I., Aaltonen, J., Lehtonen, E., and Ritvos, O. (1998). A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mechanisms of Development*, 78(1-2), 135-140.
115. Dube, J.L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K.M., Celeste, A.J., and Matzuk, M.M. (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology*, 12(12), 1809-17.
116. Incerti, B., Dong, J., Borsani, G., and Matzuk, M. M. (1994). Structure of the mouse growth/differentiation factor 9 gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1222(1), 125-128.
117. Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R. T., and Matzuk, M. M. (2013). Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), E776-E785.
118. Mottershead, D. G., Sugimura, S., Al-Musawi, S. L., Li, J. J., Richani, D., White, M. A., and Gilchrist, R. B. (2015). Cumulin, an oocyte-secreted heterodimer of the transforming growth factor- β family, is a potent activator of granulosa cells and improves oocyte quality. *Journal of Biological Chemistry*, 290(39), 24007-24020.
119. Hennet, M. L., and Combelles, C. M. (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 56(10-12), 819-831.
120. Hutt, K. J., and Albertini, D. F. (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, 14(6), 758-764.

121. Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., and Eppig, J. J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, 296(5576), 2178-2180.
122. Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., and Prasad, S. V. (2001). 657 SS Skinner, BS Dunbar, JL Dube, AJ Celeste, MM Matzuk, Synergistic 658 roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in 659 ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 15(6), 854-866.
123. Guéripel, X., Brun, V., and Gougeon, A. (2006). Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biology of Reproduction*, 75(6), 836-843.
124. Sanfins, A., Rodrigues, P., and Albertini, D. F. (2018). GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(10), 1741-1750.
125. Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Matzuk, M.M., Shimasaki, S., and Eppig, J.J. (2007). Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, 134(14), 2593-603.
126. Chang, H. M., Qiao, J., and Leung, P. C. (2017). Oocyte–somatic cell interactions in the human ovary—novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Human Reproduction Update*, 23(1), 1-18.
127. Gode, F., Gulekli, B., Dogan, E., Korhan, P., Dogan, S., Bige, O., and Atabey, N. (2011). Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. *Fertility and Sterility*, 95(7), 2274-2278.
128. Belli, M., and Shimasaki, S. (2018). Molecular aspects and clinical relevance of GDF9 and BMP15 in ovarian function. *Vitamins and Hormones*, 107, 317-348.
129. Tong, S., Caddy, D., and Short, R.V. (1997). Use of dizygotic to monozygotic twinning ratio as a measure of fertility. *Lancet*, 349(9055), 843-5.
130. Zhao, S.Y., Qiao, J., Chen, Y.J., Liu, P., Li, J., and Yan, J. (2010). Expression of growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein-15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 94(1), 261-7.
131. Eppig, J. J., Pendola, F. L., and Wigglesworth, K. (1998). Mouse oocytes suppress cAMP-induced expression of LH receptor mRNA by granulosa cells in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 49(3), 327-332.
132. Eppig, J. J., Chesnel, F., Hirao, Y., O'brien, M. J., Pendola, F. L., Watanabe, S., and Wigglesworth, K. (1997). Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Human Reproduction*, 12(11), 127-132.

133. Park, J. Y., Su, Y.-Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L.C., and Conti, M. (2004). EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. *Science*, 303(5658), 682-684.
134. Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S. Y., Horner, K., and Tsafiri, A. (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), 153-159.
135. Richani, D., and Gilchrist, R. B. (2018). The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human Reproduction Update*, 24(1), 1-14.
136. Richani, D. and Gilchrist, R.B. (2017). The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human Reproduction Update*, 24(1), 1-14.
137. Albertini, D. F., and Carabatsos, M. J. (1998). Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. *Journal of Molecular Medicine*, 76(12), 795-799.
138. Ge, Z.J., Schatten, H., Zhang, C.L., and Sun, Q.Y. (2015). Oocyte ageing and epigenetics. *Reproduction*, 149(3), R103-14.
139. May-Panloup, P., Chretien, M. F., Jacques, C., Vasseur, C., Malthiery, Y., and Reynier, P. (2005). Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, 20(3), 593-597.
140. Wai, T., Ao, A., Zhang, X., Cyr, D., Dufort, D., and Shoubridge, E. A. (2010). The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biology of Reproduction*, 83(1), 52-62.
141. Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., and Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-36.
142. Conti, M. and Franciosi, F. (2018). Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Human Reproduction Update*, 24(3), 245-266.
143. McNatty, K.P., Reader, K., Smith, P., Heath, D.A., and Juengel, J.L. (2007). Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: A 2006 perspective. *Society of Reproduction and Fertility*, 64, 55-68.
144. Vašková, J., Klepcová, Z., Špaková, I., Urdzík, P., Štofilová, J., Bertková, I., Kl'oc, M., and Rabajdová, M. (2023). The Importance of Natural Antioxidants in Female Reproduction. *Antioxidants*, 12(4), 907.
145. Silva, P.F.N. and Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978.
146. Ozturk, S. (2020). Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies. *Molecular Reproduction and Development*, 87(10), 1021-1036.

147. Lemseffer, Y., Terret, M.E., Campillo, C., and Labrune, E. (2022). Methods for Assessing Oocyte Quality: A Review of Literature. *Biomedicines*, 10(9), 2184.
148. Balaban, B., Brison, D., Calderon, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., and Van den Abbeel, E. (2011). Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reproductive Biomedicine Online*, 22(6), 632-646.
149. Van Blerkom, J., and Henry, G. (1992). Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Human Reproduction*, 7(3), 379-390.
150. Otsuki, J., Nagai, Y., and Chiba, K. (2007). Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(7), 263-270.
151. Balaban, B. and Urman, B. (2006). Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive Biomedicine Online*, 12(5), 608-615.
152. Ebner, T., Moser, M., and Tews, G. (2006). Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), 507-12.
153. Otsuki, J., Okada, A., Morimoto, K., Nagai, Y., and Kubo, H. (2004). The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Human Reproduction*, 19(7), 1591-1597.
154. Xu, J., Yang, L., Chen, Z. H., Yin, M. N., Chen, J., and Sun, L. (2021). Oocytes with smooth endoplasmic reticulum aggregates are not associated with impaired reproductive outcomes: a matched retrospective cohort study. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 688967.
155. Mateizel, I., Van Landuyt, L., Tournaye, H., and Verheyen, G. (2013). Deliveries of normal healthy babies from embryos originating from oocytes showing the presence of smooth endoplasmic reticulum aggregates. *Human Reproduction*, 28(8), 2111-2117.
156. Rosenbusch, B., Schneider, M., Gläser, B., and Brucker, C. (2002). Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Human Reproduction*, 17(9), 2388-2393.
157. Wang, Q. and Sun, Q.-Y. (2006). Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1), 1-12.
158. Hoshino, Y. (2018). Updating the markers for oocyte quality evaluation: intracellular temperature as a new index. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(4), 434-441.
159. Lasienė, K., Vitkus, A., Valanėiūtė, A., and Lasys, V. (2009). Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina*, 45(7), 509.
160. Patrizio, P., Fragouli, E., Bianchi, V., Borini, A., and Wells, D. (2007). Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(3), 346-353.

161. Borini, A., Lagalla, C., Cattoli, M., Sereni, E., Sciajno, R., Flamigni, C., and Coticchio, G. (2005). Predictive factors for embryo implantation potential. *Reproductive BioMedicine Online*, 10(5), 653-68.
162. Petersen, C.G., Oliveira, J.B., Mauri, A.L., Massaro, F.C., Baruffi, R.L., Pontes, A., and Franco, J.G., Jr. (2009). Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 18(2), 235-43.
163. Rienzi, L., Ubaldi, F., Martinez, F., Iacobelli, M., Minasi, M.G., Ferrero, S., Tesarik, J., and Greco, E. (2003). Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Human Reproduction*, 18(6), 1289-1293.
164. Moon, J.H., Hyun, C.S., Lee, S.W., Son, W.Y., Yoon, S.H., and Lim, J.H. (2003). Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Human Reproduction*, 18(4), 817-820.
165. Montag, M., Schimming, T., and van der Ven, H. (2006). Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), 442-6.
166. Xia, P. (1997). Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Human Reproduction*, 12(8), 1750-1755.
167. Rienzi, L., Ubaldi, F.M., Iacobelli, M., Minasi, M.G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza, F., Baroni, E., Litwicka, K., and Greco, E. (2008). Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1692-1700.
168. Mikkelsen, A.L. and Lindenberg, S. (2001). Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. *Human Reproduction*, 16(8), 1714-1718.
169. Miao, Y.L., Kikuchi, K., Sun, Q.Y., and Schatten, H. (2009). Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*, 15(5), 573-85.
170. Jones, C.A., Acharya, K.S., Acharya, C.R., Raburn, D., and Muasher, S.J. (2019). Patient and in vitro fertilization (IVF) cycle characteristics associated with variable blastulation rates: a retrospective study from the Duke Fertility Center (2013–2017). *Middle East Fertility Society Journal*, 24(1), 4-6.
171. Massoud, G., Spann, M., Vaught, K. C., Das, S., Dow, M., Cochran, R., and Singh, B. (2024). Biomarkers Assessing the Role of Cumulus Cells on IVF Outcomes: A Systematic Review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 41(2), 253-275.
172. Bartolucci, A.F., Uliasz, T., and Peluso, J.J. (2020). MicroRNA-21 as a regulator of human cumulus cell viability and its potential influence on the developmental potential of the oocyte. *Biology of Reproduction*, 103(1), 94-103.

173. Daei-Farshbaf, N., Aflatoonian, R., Amjadi, F. S., Taleahmad, S., Ashrafi, M., and Bakhtiyari, M. (2020). Expression pattern of olfactory receptor genes in human cumulus cells as an indicator for competent oocyte selection. *Turkish Journal of Biology*, 44(6), 371-380.
174. Ekart, J., McNatty, K., Hutton, J., and Pitman, J. (2013). Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. *Human Reproduction*, 28(11), 2930-2942.
175. Ito, M., Muraki, M., Takahashi, Y., Imai, M., Tsukui, T., Yamakawa, N., Nakagawa, K., Ohgi, S., Horikawa, T., Iwasaki, W., Iida, A., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H., Miyado, K., Kono, T., Hosoi, Y., and Saito, H. (2008).. Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1026-1035.
176. Li, Y., Li, R. Q., Ou, S. B., Zhang, N. F., Ren, L., Wei, L. N., Zhang, Q. X., and Yang, D.-Z. (2014). Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 81-90.
177. Li, S. H., Lin, M. H., Hwu, Y. M., Lu, C. H., Yeh, L. Y., Chen, Y. J., and Lee, R.K. K. (2015). Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 93-101.
178. Montazeri, F., Kalantar, S.M., Fesahat, F., Sheikhha, M.H., Omid, M., Shafienia, H., and Hoseini, S.M. (2022). Association between cumulus cells-mRNA levels of AMHR2 and FSHR with oocyte maturity. *Middle East Fertility Society Journal*, 27(1), 26.
179. Scarica, C., Cimadomo, D., Dovere, L., Giancani, A., Stoppa, M., Capalbo, A., Ubaldi, F.M., Rienzi, L., and Canipari, R. (2019). An integrated investigation of oocyte developmental competence: expression of key genes in human cumulus cells, morphokinetics of early divisions, blastulation, and euploidy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(5), 875-887.
180. Shen, Q., Chen, M., Zhao, X., Liu, Y., Ren, X., and Zhang, L. (2020). Versican expression level in cumulus cells is associated with human oocyte developmental competence. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 66(3), 176-184.
181. Adriaenssens, T., Van Vaerenbergh, I., Coucke, W., Segers, I., Verheyen, G., Anckaert, E., De Vos, M., and Smitz, J. (2019). Cumulus-corona gene expression analysis combined with morphological embryo scoring in single embryo transfer cycles increases live birth after fresh transfer and decreases time to pregnancy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(3), 433-443.
182. Teixeira Filho, F.L., Baracat, E.C., Lee, T.H., Suh, C.S., Matsui, M., Chang, R.J., Shimasaki, S., and Erickson, G.F. (2002). Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(3), 1337-44.

183. Huang, T. H., Chen, F. R., Zhang, Y. N., Chen, S. Q., Long, F. Y., Wei, J. J., Zhang, K., Zeng, J. Z., Zhu, Q. Y., Li-Ling, J., and Gong, Y. (2023). Decreased GDF9 and BMP15 in follicle fluid and granulosa cells and outcomes of IVF-ET among young patients with low prognosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 40(3), 567-576.
184. Karagül, M. İ., Aktaş, S., Yılmaz, B. C., Yılmaz, M., and Temel, G. Ö. (2018). GDF9 and BMP15 expressions and fine structure changes during folliculogenesis in polycystic ovary syndrome. *Balkan Medical Journal*, 35(1), 43-54.
185. Hreinsson, J. G., Scott, J. E., Rasmussen, C., Swahn, M. L., Hsueh, A. J., and Hovatta, O. (2002). Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(1), 316-321.
186. Gong, Y., Li-Ling, J., Xiong, D., Wei, J., Zhong, T., and Tan, H. (2021). Age-related decline in the expression of GDF9 and BMP15 genes in follicle fluid and granulosa cells derived from poor ovarian responders. *Journal of Ovarian Research*, 14(1), 1-10.
187. Turathum, B., Gao, E.-M., and Chian, R.-C. (2021). The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*, 10(9), 2292.
188. Koch, J., Portela, V.M., Dos Santos, E.C., Missio, D., de Andrade, L.G., da Silva, Z., Gasperin, B.G., Antoniazzi, A.Q., Gonçalves, P.B.D., and Zamberlam, G. (2022). The Hippo pathway effectors YAP and TAZ interact with EGF-like signaling to regulate expansion-related events in bovine cumulus cells in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(2), 481-492.
189. Demirel, A., and Gurgan, T. (2009). Comparison of microdose flare-up and antagonist multiple-dose protocols for poor-responder patients: a randomized study. *Fertility and Sterility*, 92(2), 481-485.
190. Gurgan, T., Montjean, D., Demirel, A., and Menezo, Y. J. (2014). Sequential (hFSH+ recFSH) vs homogenous (hFSH or recFSH alone) stimulation: clinical and biochemical (cumulus cell gene expression) aspects. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(6), 657-665.

EKLER

EK-1. Etik Komisyon İzni

ANKARA ETİK ŞEHİR HASTANESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME VE ETİK KURULU

Araştırmanın Açık Adı	Farklı İnfertilite Tanılarına Sahip Kadınlardan Elde Edilmiş Kümültüs Hücrelerinde EGF, BMP-15, GDF-9 Seviyelerinin Tespiti
Çalışmaya Etik Kurul Tarafından Verilen Numara/Kod	AEŞH-BADEK-2024-595

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Etik Şehir Hastanesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme ve Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Etik Kurul Sekreterliği Varlık Mh. Halil Sezai Erkut Cc. No:5 Etik/ANKARA
	TELEFON	0312 797 00 00/ 123098
	E-POSTA	etiksh.etikkurul@saglik.gov.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Prof. Dr. Çiğdem ELMAS		
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Embriyoloji		
	Sorumlu Araştırmacının Bulunduğu Merkez/Klinik	Ankara Etik Şehir Hastanesi		
	Araştırmanın Amacı	Tez ☒ Akademik ☐		
	Tez Sahibi	Dr. Halil RUSO		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	PROSPEKTİF	☒	
		Analitik	☐	
		Kesitsel	☐	
		Vaka-Kontrol	☐	
		Kohort	☒	
		Metodolojik	☐	
		Anket/Ölçek	☐	
		Tanımlayıcı	☐	
		RETROSPEKTİF	☐	
Diğer ise belirtiniz :				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:AEŞH-BADEK-2024-595	Tarih: 12/06/2024
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacının/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinin etik ve bilimsel açıdan uygun olduğuna toplantıya katılan kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

Kurul Başkanı
 Prof. Dr. Hüseyin Levent KESKİN
 İmza:

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

EK-1. (devam) Etik Komisyon İzni

ANKARA ETLİK ŞEHİR HASTANESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME VE ETİK KURULU

Araştırmanın Açık Adı	Farklı İnfertilite Tanılarına Sahip Kadınlardan Elde Edilmiş Kümülsüz Hücrelerinde EGF, BMP-15, GDF-9 Seviyelerinin Tespiti
Çalışmaya Etik Kurul Tarafından Verilen Numara/Kod	AEŞH-BADEK-2024-595

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişki		İmza
Prof. Dr. Hüseyin Levent KESKİN (Kurul Başkanı)	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Ahmet Burak ERDEM (Kurul Başkan Yardımcısı)	Acil Tıp Kliniği	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Sibel ÖRSEL	Psikiyatri	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Ece ÜNLÜ AKYÜZ	Fizik Tedavi-Rehabilitasyon	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Ebru GÖK OĞUZ	Nefroloji	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Rasime Pelin KAVAK	Radyoloji	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Ayşen Sumru KAVURT	Neonatoloji	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Emin GEMCİOĞLU	Dahiliye	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Emine ARIK	Anestezi ve Reanimasyon	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Canan TOPÇUOĞLU	Tıbbi Biyokimya	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Dr. Öğ. Ü. Burcu KÜÇÜK BİÇER	Halk Sağlığı	Gazi Üni. Tıp Fak. Tıp Eğitimi ve Bilişimi AD	E ☐	H ☒	
Uzm. Dr. Hüriyet Ekmel OLCAY	Farmakoloji	Ankara Bilkent Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Müthar CANİTEZ ORHAN	Biyomedikal	Ankara Etlik Şehir Hastanesi	E ☐	H ☒	
Avukat Çiğdem GÜNERİ AYDIN	Hukukçu	S.B. Halk Sağlığı Genel Mdr.	E ☐	H ☒	
Serdar YILMAZ	Sağlık Mensubu Olmayan	Emekli Bürokrat	E ☐	H ☒	

12/06/2024

*:Toplantıda Bulunma

Kurul Başkanı

Prof. Dr. Hüseyin Levent KESKİN

İmza:

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

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : RUSO, Halil
Uyruğu : K.K.T.C, T.C.

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi niversitesi/Histoloji ve Embriyoloji	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	University of Dundee/MSc. (by reseacrh) Reproductive Medicine	2013
Lisans	University of Birmingham/ BSc. Hons. Biochemistry (Genetics)	2011

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2014-devam ediyor	Gürkan Clinic Tüp Bebek Merkezi	Kıdemli Klinik Embriyolog, Grup Embriyoloji Laboratuvarları Direktörü
2023-devam ediyor	Klinik Embriyoloji Derneği	Yönetim Kurulu Üyesi ve Başkan Yardımcısı
2021-2023	Klinik Embriyoloji Derneği	Yönetim kurulu Üyesi ve Genel Sekreter

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

1. Sarah J Martins da Silva, Sean G Brown, Keith Sutton, Louise V King, Halil Ruso, David W Gray, Paul G Wyatt, Mark C Kelly, Christopher LR Barratt, Anthony G Hope (2017) Drug discovery for male subfertility using high-throughput screening: a new approach to an unsolved problem. Hum. Reprod. 32(5): 974-984.

2. H Ruso, C Cochrane, A Hope, C Barratt, SJ da Silva (2015) Trequinsin HCl: A novel specific human sperm motility inducer identified by high-throughput screening using intracellular Ca²⁺ signalling as a surrogate physiological response. *Hum. Reprod.* 30: 163-164.
3. Antonis Makrigiannakis, Thomas Vrekoussis, Fanourios Makrygiannakis, Halil Ruso, Sophia N Kalantaridou, Timur Gurgan (2019). Intrauterine CRH-treated PBMC in repeated implantation failure. *Euro. J. of Clin. Investig.* 49(5): e13084.
4. Timur Grgan, Ziya Kalem, Mberra N Kalem, Halil Ruso, Moncef Benkhalifa, Antonis Makrigiannakis (2019). Systematic and standardized hysteroscopic endometrial injury for treatment of recurrent implantation failure. *Reprod. Biomed. Online* 39(3): 477-483.
5. Ziya Kalem, Muberra Namli Kalem, Halil Ruso, Batuhan Bakırarar, Timur Gurgan (2018). Fresh versus frozen-thawed blastocyst transfer in high responders. *Ginekologia Polska* 89(8): 407-413.
6. Ziya Kalem, Mberra Namlı Kalem, Elvan Anadol, Batuhan Bakırarar, Canan Yılmaz, Çiğdem Elmas, Perihan Yalçınkaya, Halil Ruso, Timur Grgan (2018). Maternal nutrition and reproductive functions of female and male offspring. *Reproduction* 156(4): 353-364.
7. H Ruso, D Dayanır, Z Kalem, R Tural, S Saribas, A Sepici Dincel, C Ozogul (2019). Cumulus cells and follicular fluid show alterations in bone morphogenic protein 15 (BMP-15), growth differentiation factor 9 (GDF-9), and oxidative status in patients with endometriosis. *Hum. Reprod.* 34: 241.
8. zlem Okutman, Ali Sami Grbz, Ahmet Salvarci, Umut Byk, Halil Ruso, Timur Grgan, Julien Tarabeux, Anne-Sophie Leuvrey, Elsa Nourisson, Ccile Lang, Jean Muller, Stephane Viville (2024). Evaluation of an Updated Gene Panel as a Diagnostic Tool for Both Male and Female Infertility. *Reprod. Sci.* <https://doi.org/10.1007/s43032-024-01553-4>.
9. T Grgan, Z Kalem, H Ruso (2019) Microbiota in Genitourinary System and Infertility. *J. Mol. Genet. Med.* 13(395): 1747-0862.

Ulusal Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

1. Halil Ruso (2021). İmplantasyon başarısızlıklarında oosit ve embriyo ile ilgili faktörler. *Trkiye Klinikleri*, p. 19-24
2. Dayanır, D., Ruso, H., Kalem, Z., Grgan, T., zoğl, C., (2019). Rewarding Conversation Between Oocyte and Cumulus Cells Directs The Process of Folliculogenesis. *Gazi Meidcal Journal*.

Kitap Blmleri

1. Halil Ruso, Duygu Dayanır (2022). Mikroenjeksiyon (ICSI) ve Mikromaniplasyon teknikleri, Assisted Hatching. *Hipokrat Yayıncılık*.
2. Halil Ruso (2018). Sperm Fonksiyon Testleri. *Nobel Tıp Kitabevi*.

3. Halil Ruso (2018). Morfolojisine göre seçilen Spermin İntrasitoplazmik İnjektasyonu. Nobel Tıp Kitabevi.
4. Halil Ruso (2018). Time-lapse görüntüleme ve embriyo seçimi. Nobel Tıp Kitabevi.

Bildiriler

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildiriler

1. H Ruso, C Cochrane, A Hope, C Barratt, SJ da Silva (2015) Trequinsin HCl: A novel specific human sperm motility inducer identified by high-throughput screening using intracellular Ca²⁺ signalling as a surrogate physiological response. Hum. Reprod. 30: 163-164. ESHRE 2015, Lizbon, Portekiz.
2. H Ruso, D Dayanir, Z Kalem, R Tural, S Saribas, A Sepici Dincel, C Ozogul (2019). Cumulus cells and follicular fluid show alterations in bone morphogenic protein 15 (BMP-15), growth differentiation factor 9 (GDF-9), and oxidative status in patients with endometriosis. Hum. Reprod. 34: 241. ESHRE 2017, Viyana, Avusturya.

Ulusal Katılımlı Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiri

1. Kalem, N.M., Kalem, Z., Anadol, E., Yılmaz, C., Elmas, Ç., Yalçınkaya, P., Ruso, H., Bakırarar, B. Ve Gürkan, T. (2018). Maternal beslenmenin yavruların üreme fonksiyonları üzerine etkisi. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye.

Sertifikalar

1. 2016: Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı, ÜYTE Eğitim Merkezi'nde "T.C. Sağlık Bakanlığı Embriyoloji Laboratuvar Sorumlusu Eğitimi"



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..