



**OOSİT GELİŞİM KAPASİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE İNSAN
KÜMÜLÜS HÜCRELERİNDEKİ GEN İFADE PROFİLLERİNİN
BİYOBELİRTEÇ OLARAK İNCELENMESİ**

Derya Deniz ERCAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2021

ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları 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 kabullendiğimi beyan ederim.

Derya Deniz ERCAN

30/06/2021

OOSİT GELİŞİM KAPASİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE İNSAN KÜMÜLÜS HÜCRELERİNDEKİ GEN İFADE PROFİLLERİNİN BİYOBELİRTEÇ OLARAK

İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Derya Deniz ERCAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2021

ÖZET

Bu çalışmada, tüp bebek tedavisi sonucunda iyi/ zayıf morfolojiye sahip embriyo geliştiren oositlerin kümülüs hücrelerinde, versikan (VCAN), prostaglandin-endoperoksit sentetaz 2 (PTGS2), inositol-trifosfat 3-kinaz A (ITPKA) genlerinin ifade seviyeleri incelenmiştir. Artmış ya da azalmış gen ifadesinin, embriyo morfolojisi ve tedavi sonuçları ile karşılaştırılarak, potansiyel gebelik olasılığını değerlendirebilecek bir biyobelirteç araştırılması hedeflendi. Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tüp bebek Merkezine gebelik istemi ile başvuran 20 açıklanamayan infertil hasta dâhil edildi. Tüp bebek tedavisi ile kontrollü ovaryen hipersitümülasyon yapılarak elde edilen oositlerin kümülüs hücreleri toplanarak donduruldu. Tedavi boyunca gelişen en kaliteli embriyolar hastaya transfer edildi. Transfer sonrası 12. günde serumda β -hcg seviyesi ölçülerek gebelik sonucu değerlendirildi. Hastaların geliştirdiği en kaliteli/zayıf morfolojiye sahip embriyoların gelişimini sağlayan oositin kümülüs hücreleri çözülerek RNA izolasyonu yapıldı ve qPCR ile ilgili genlerin ifade seviyeleri değerlendirildi. Tedavi sonucunda hastaların geliştirdikleri en iyi kaliteli embriyo ile en zayıf kaliteli embriyoların kümülüs hücrelerindeki ITPKA (p-value = 0.11), VCAN (p-value = 0.78), PTGS2 (p-value = 0.19) gen ifade seviyelerinde anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir (p değeri < 0,005 anlamlılık düzeyi). Transfer edilen iyi kaliteli embriyoların kümülüs hücrelerinde ilgili genlerin ifadesi ile gebelik sonuçları karşılaştırıldığında, ITPKA geninin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Kümülüs hücrelerinde VCAN geninin ifade seviyesi ise daha yüksek bulundu, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p= 0.10). PTGS2 geninin ekspresyon seviyesi, gebe olmayan gruba göre gebe olan grupta önemli ölçüde artmıştı (p= 0.01; anlamlılık düzeyi p> 0.05). Gebe olanlar hastaların iyi kaliteli embriyolarının kümülüs hücrelerinde PTGS2 geninin ifadelenmesi, gebe olmayanlara göre 3,18 kat arttı. Bulgulara göre gen ekspresyonundaki 3,18 kat artış, gebelik tahmininde biyobelirteç olarak kullanılabilir. Bu sayede tüp bebek tedavisindeki başarı oranının artırılabilceği düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 20326
Anahtar Kelimeler : Kümülüs hücreleri, gen ifadesi, embriyo seçimi, gebelik, biyobelirteç
Sayfa Adedi : 116
Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

INVESTIGATION OF GENE EXPRESSION PROFILES OF HUMAN CUMULUS
CELLS TO EVALUATION OF OOCYTE DEVELOPMENT CAPACITY AS A
BIOMARKER

(Ph. D. Thesis)

Derya Deniz ERCAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2021

ABSTRACT

In this study, the relationship between the expression level of versican (*VCAN*), prostaglandin-endoperoxide synthetase 2 (*PTGS2*), inositol-triphosphate 3-kinase A (*ITPKA*) genes in cumulus cells and embryo morphology, pregnancy outcomes were evaluated by using qPCR. 20 unexplained infertile patients who applied to Gazi University IVF Center were included in the study. Cumulus cells of oocytes obtained by controlled ovarian hypersitulation in IVF treatment were collected and then frozen. The best quality embryos were chosen for transfer. The β -hcg level in the serum was measured 12 days after the transfer, and the pregnancy outcome was assessed. Dissolving the cumulus cells of the oocyte, which provided the production of the good and poor embryos of the patients, was used to isolate RNA. Then expression levels of genes were evaluated by qPCR. According to embryo morphology, there was no significant difference in the expression levels of *ITPKA* (p-value = 0.11), *VCAN* (p-value = 0.78), *PTGS2* (p-value = 0.19) genes in the cumulus cells. (p-value <0.005 significance level). When the relationship between the expression of genes in the cumulus cells of the transferred good quality embryos was compared to pregnancy outcomes, no significant difference was observed in the expression of the *ITPKA* gene. When the expression level of the *VCAN* gene in cumulus cells was found to be higher, but not statistically significant. (p = 0.10). The expression level of the *PTGS2* gene increased significantly in the pregnant group relative to the non-pregnant group. (p = 0.01; significance level p > 0.05). When pregnant women compared to non-pregnant women, gene expression in high quality embryos increased 3.18 times. The 3.18-fold increase in gene expression may be used as a biomarker in pregnancy prediction, according to the findings. We believe that the success rate in IVF treatment can be increased by this means.

Science Code : 20326

Key Words : Cumulus cells, gene expression, embryo selection, pregnancy, biomarker

Page Number : 116

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, desteğini ve güvenini her zaman yanımda hissettiğim, bilgisi, tecrübesi ve önerileri ile beni her zaman doğru yönlendiren, çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK'a;

Tez izleme komitesinde bulunarak bilgi ve deneyimlerini aktararak tezin değerlendirilmesinde önemli katkıları olan Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN ve Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na;

Çalışmalarım boyunca her türlü bilimsel desteğini benimle paylaşan, öngörülerini ile beni doğru yönlendiren Prof. Dr. Nuray BOZKURT'a;

Çalışmamın istatistiksel değerlendirmesinde değerli görüşlerinden faydalandığım Prof. Dr. Onur KARABACAK'a;

Laboratuvar çalışmalarım boyunca verdikleri desteklerden ötürü Öğr. Gör. Sezen GÜNTEKİN ERGÜN, Arş. Gör. Dr. Betül AYDIN'a ve tüm laboratuvar ekibine;

Doktora çalışmaları boyunca iş yerimde bana anlayış ve destek gösteren başta çalışma arkadaşlarım Öğr. Gör. Seyhan GÜMÜŞLÜ, Öğr. Gör. Esra KARABAY ve tüm Gazi Üniversitesi Tıp Bebek Ünitesi çalışanlarına;

Uzun soluklu doktora yolculuğumda benimle birlikte sürecin tüm aşamalarını birlikte yürüten canım eşim Gökhan ERCAN, kızlarım Zeynep ERCAN ve Duru ERCAN'a;

Son olarak manevi desteğini hayatımın her anında hissettiğim, canım annem Seher KULAK ve babam merhum Mehmet KULAK'a

Tez, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 05/2016-24 kodu ile desteklenmiştir. Çalışmamın maddi desteğini sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. İnfertilite	5
2.2. İnfertil Çiftlerin Değerlendirilmesi	5
2.2.1. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesi	5
2.2.2. Kadın infertilitesinin değerlendirilmesi	12
2.3. Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT).....	13
2.4. Üreme Fizyolojisi.....	21
2.4.1. Folikülogenez	22
2.4.2. Oogenez	25
2.4.3. Overlerin hormonal kontrolü.....	28
2.4.4. Oosit olgunlaşması	30
2.4.5. Oosit ve foliküler hücrelerin iletişimi.....	32
2.5. Moleküler Belirteçlerin Araştırıldığı Yeni Teknolojiler ve Teknikler	37
2.5.1. RNA izolasyonu	38
2.5.2. cDNA sentezi	40

	Sayfa
2.5.3. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Kantitatif PCR-qPCR-).....	41
2.6. Çalışmada Araştırılan Genler.....	47
2.7. qPCR Sonuçları ile Embriyo Değerlendirme Çalışmaları	51
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	55
3.1. Materyal	55
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	55
3.1.2. Kullanılan çözelti ve besi yerleri.....	55
3.1.3. Kullanılan kit ve kimyasallar	56
3.1.4. Kullanılan malzemeler	57
3.2. Yöntem	58
3.2.1. Çalışmaya dâhil edilme kriterleri	58
3.2.2. Ovulasyon indüksiyon protokolü	58
3.2.3. Hazırlık işlemleri.....	59
3.2.4. Oosit toplama işlemi (OPU).....	60
3.2.5. İnseminasyon için sperm örneğinin hazırlanması	62
3.2.6. ICSI öncesi oositlerin temizlenmesi ve kümülüs hücrelerinin toplanması	62
3.2.7. ICSI uygulaması.....	63
3.2.8. Embriyo transferi.....	64
3.2.9. RNA izolasyonu	64
3.2.10. RNAnın konsantrasyonu ve saflığının ölçülmesi	65
3.2.11. cDNA sentezi.....	66
3.2.12. qPCR ile genlerin amplifikasyonu.....	67
3.2.13. qPCR ile gen ifadelerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplanması	68
3.2.14. İstatistiksel analiz.....	69
4. BULGULAR.....	71

	Sayfa
4.1. Ovaryan Stimölasyon Protokolü	71
4.2. Embriyololojik Çalışmalar	73
4.3. Gebelik Sonuçlarının Değerlendirilmesi	76
4.4. Kümölüs Hücrelerinin Toplanması	77
4.5. RNA İzolasyonu, Saflık ve Konsantrasyon Ölçümleri.....	78
4.6. qPCR Uygulaması	80
5. TARTIŞMA.....	89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	99
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ.....	115

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Semen analizi için DSÖ'nün belirlediği en düşük referans değerler	6
Çizelge 2.2. Erkek infertilitesinin etyolojisi ve dağılımı (%).....	11
Çizelge 2.3. Kadın infertilitesinin etyolojisi dağılımı (%)	12
Çizelge 2.4. Embriyoların değerlendirilme kriterleri	20
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi	55
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan çözelti/ besi yerleri	56
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan tek kullanımlık sarf malzemeler.....	57
Çizelge 3.4. Rever Transkripsiyon bileşenlerinin içerikleri ve hazırlanması.....	66
Çizelge 3.5. cDNA sentezi için PCR programı	66
Çizelge 3.6. PCR karışımının hazırlanması.....	67
Çizelge 3.7. qPCR programı.....	68
Çizelge 4.1. Gönüllülere ait tedavi parametreleri	72
Çizelge 4.2. Gönüllülere ait embriyoloji parametreleri.....	74
Çizelge 4.3. Gönüllülere ait tedavi parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	75
Çizelge 4.4. Gönüllülerin tedavi sonuçlarına göre parametrelerin değerlendirilmesi ...	77
Çizelge 4.5. İzole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri	79
Çizelge 4.6. <i>ITPKA</i> geninin <i>UBC</i> referans genine göre ifade seviyesinin hesaplaması	81
Çizelge 4.7. <i>VCAN</i> geninin <i>UBC</i> referans genine göre ifade seviyesinin hesaplaması .	82
Çizelge 4.8. <i>PTGS2</i> geninin <i>UBC</i> referans genine göre ifade seviyesinin hesaplaması	83
Çizelge 4.9. Gönüllülere ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri.....	84
Çizelge 4.10. Gönüllülerin iyi kaliteli ve zayıf kaliteli embriyolarının kümülüs hücrelerindeki <i>ITPKA</i> , <i>VCAN</i> , <i>PTGS2</i> gen ifade seviyelerinin değerlendirilmesi.....	85
Çizelge 4.11. Gönüllülerin iyi kaliteli ve zayıf kaliteli embriyolarının kümülüs hücrelerindeki <i>ITPKA</i> , <i>VCAN</i> , <i>PTGS2</i> gen ifade seviyelerinin tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi	86

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.12. Gönüllülerin transfer yapılan embriyolarının kümülüs hücrelerindeki <i>ITPKA</i> , <i>VCAN</i> , <i>PTGS2</i> gen ifade seviyelerinin tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi	87



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Sperm hücresinin kısımlarının gösterimi	9
Şekil 2.2. Normal ve anormal sperm yapılarının gösterimi.....	10
Şekil 2.3. Embriyo derecelendirmesinde blastomer büyüklükleri ve fragmantasyon dağılımının şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.4. Kadın üreme organlarının şematik görünümü.....	22
Şekil 2.5. Ovaryumdaki foliküllerin gelişim aşamalarına göre şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.6. Primordial germ hücrelerinden primer oosit evresine kadar oogenez aşamaları	25
Şekil 2.7. Prenatal dönemdeki oogenezin gebelik döneminde ve doğum esnasındaki aşamalarının şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.8. Birbiriyle eş zamanlı gerçekleşen oogenez ve folikülogenezin şematik olarak gösterimi.....	27
Şekil 2.9. Primer oositin olgun oosit aşamasına kadar geçirdiği genetik değişimlerin şematik gösterimi	28
Şekil 2.10. Hipotalmus, hipofiz bezi, over ve endometrium iletişimin şematik gösterimi	30
Şekil 2.11. Folikül ile oosit olgunlaşmasının eş zamanlı gelişiminin şematik gösterimi	31
Şekil 2.12. Oosit ve kümülüs hücreleri arasındaki iletişimin şematik gösterimi.....	33
Şekil 2.13. Biyomoleküllerin kümülüs hücrelerinde üretilip oosite aktarılmasının şematik gösterimi.....	35
Şekil 2.14. Oosit-kümülüs hücreleri iletişimleri ve kümülüs genişlemesinin şematik gösterimi	36
Şekil 2.15. Oosit ve embriyo değerlendirmesi için direkt/dolaylı yaklaşımlar	37
Şekil 2.16. Biyolojik materyalden DNA/ RNA analizinin şematik gösterimi.....	38
Şekil 2.17. NanoDrop spektrofotometre cihazı	40
Şekil 2.18. qPCR amplifikasyon görseli	42
Şekil 2.19. qPCR’da kullanılan prob çeşitleri	43

Şekil	Sayfa
Şekil 2.20. SYBR Green problemlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi	44
Şekil 2.21. Taqman problemlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi	45
Şekil 2.22. FRET problemlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi	45
Şekil 2.23. Hairpin problemlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi	46
Şekil 2.24. VCAN geninin haritası	47
Şekil 2.25. PTGS2 geninin haritası	49
Şekil 2.26. ITPKA geninin haritası	50
Şekil 2.27. UBC geninin haritası	51

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Sperm sayma kamerası (Makler kamara)	6
Resim 2.2. IVF laboratuvarında mikromanipulasyon için hazırlanan petri kapları.....	17
Resim 2.3. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)	19
Resim 2.4. Oositin döllenmeden sonraki gelişim aşamaları.....	21
Resim 3.1. Embriyo kültür inkübatörü.....	59
Resim 3.2. OPU (aspirasyon) iğnesi	60
Resim 3.3. OPU odası ve ultrason	60
Resim 3.4. İndüksiyon sonrası overlerde gelişen foliküllerin ultrason görüntüsü.....	61
Resim 3.5. Mikrobiyolojik güvenlik kabini ve stero mikroskoplar	61
Resim 3.6. Denudasyon pipeti	62
Resim 3.7. İnverted Mikroskop ve Mikromanipülatör.....	64
Resim 3.8. qPCR cihazı.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram

Kısaltmalar

Açıklamalar

cDNA	Tamamlayıcı DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FSH	Folikül stimulan hormon
GnRHa	Gonadotropin releasing hormon agonisti
GnRHant	Gonadotropin releasing hormon antagonisti
hCG	İnsan koryonik gonadotropin
HMG	İnsan menopozal gonadotropinini
ICSI	İntra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu
IUI	İntra uterin inseminasyon
IVF	In-vitro fertilizasyon
LH	Luteinizan hormon
OPU	Oosit toplama
qPCR	Eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
YÜT	Yardımla üreme teknikleri

1. GİRİŞ

İnfertilite, herhangi bir korunma yöntemi uygulamaksızın, bir yıl süreyle, düzenli cinsel ilişki olmasına rağmen gebe kalamama veya gebeliği sürdürememe durumudur [1]. Normal bir çiftin gebelik geliştirebilme şansı bir ayda %20-25, altı ayda %72 ve bir yıl içerisinde ise %85'dir. İnfertilite üreme çağındaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Düzenli ve doğum kontrolü uygulamaksızın cinsel ilişki ile geçen 12 aylık süre sonunda çiftlerin %80'i ilk 6 ay içinde gebe kalabilirken, geri kalan çiftlerin ancak %10'u takip eden 6 ay içinde gebe kalabilmektedir [2]. İnterfil çiftlerin %30-40'ı erkek, %30-50'si kadın ve %20-25'inde ise hem erkek hem de kadın ile ilgili faktörler nedeniyle tanı almaktadır. Çiftlerin %15'inde ise tüm değerlendirmeler sonucunda herhangi bir infertilite nedeni bulunamamaktadır [3]. Bu hastalar açıklanamayan infertilite grubunu oluşturmaktadır.

Yaşadığımız çağda birçok faktörün etkisiyle toplum doğurganlığını hızla kaybetmektedir. Kadınların eğitim ve kariyerlerine yönelik çalışma isteğinin artması ve buna bağlı olarak evlenme ve çocuk doğurma yaşının yükselmesi söz konusudur. Değişen ve kötüleşen beslenme ve yaşam alışkanlıklarının ortaya çıkması, infertilitenin bir halk sağlığı olarak karşımıza çıkmasına neden olmaktadır. İnfertilitenin dünyada görülme sıklığı (prevalans) yaklaşık %8-12 olarak bildirilmiştir [4].

Yardımla üreme teknikleri (YÜT); infertil çiftlerin çeşitli tanı ve tedavi yöntemlerini uygulayarak sağlıklı çocuk elde edebilmelerine yardımcı olan tüm işlemleri içermektedir. Tedavi için uygulanan yöntemde overlerin kontrollü bir şekilde uyarılması sonrasında ovulasyonun tetiklenmesiyle tek bir döngüde birden fazla sayıda oosit elde edilir. Erkek eşten alınan sperm örneği yıkama sonrasında döllenme kabiliyeti kazanır. Her iki gametin bir araya getirilmesi ile elde edilen embriyoların gelişimi takip edilir ve bu embriyolar içinden morfolojik olarak en kaliteli olan embriyo anneye transfer edilir.

In-vitro fertilizasyon (IVF) tedavilerinde embriyo değerlendirmesi morfolojik özelliklere göre yapılır. Embriyonun gelişim seviyesine göre sahip olduğu hücre sayısı, hücrelerin büyüklüklerinin eşit olması ve fragmentasyon taşıyıp taşımadıklarına bakılarak değerlendirilir. Ancak, embriyonun ya da oositin morfolojisi her zaman onun sağlıklı olduğunu göstermez. Morfolojik olarak anormal gözüken embriyoların %70-80'i anormal

kromozom dizilimine sahipken, normal görünümlü olan embriyoların % 40'ı anormal kromozom dizilimine sahip olabilmektedir [6].

Yardımla üreme tekniklerinde uygulanan tedavilerin tüm amacı, infertil çiftlerin sağlıklı çocuk sahibi olmasına yardımcı olmaktır. 1978 yılında İngiltere'de doğan ilk IVF bebeğinin ardından, yardımla üreme tekniklerinde yaşanan gelişmelerle 5 milyonun üzerinde bebek dünyaya gelmiştir [5]. Fakat tüm gelişmelere rağmen gebelik hızında beklenen anlamlı artış yakalanamamıştır. IVF tedavisi alan çiftler ilk denemelerinde ~ %30 oranında eve bebek götürebiliyorken ikinci denemede bu oran kümülatif olarak daha da artmaktadır [6]. Gebelik oluşma ihtimali başta anne yaşı olmak üzere birçok etkene bağlıdır. Gebelik hızını arttırmak adına transfer edilen embriyo sayısı arttırılmakta bu da çoğul gebeliklerin sayısını dramatik olarak yükseltmektedir. Bu durum hem anne ve bebeğin sağlığını riske atmakta hem de artan medikal harcamaları da beraberinde getirmektedir [7].

Üreme tıbbının en büyük araştırma sorusu yardımla üreme tekniklerinde gebelik oranının nasıl arttırılacağıdır. Bu çalışma ile girişimsel olmayan bir yöntemle en kaliteli embriyoyu oluşturacak olan oositin seçilmesi hedeflenmektedir. Bu sayede en kaliteli oositin geliştirdiği embriyonun transfer edilmesiyle implantasyon olasılığının arttırabileceği düşünülmektedir.

Folikül, gamet ve embriyo hücrelerinde ifade edilen genlerin seviyelerinin değerlendirilmesi ile embriyo canlılığı arasındaki ilişki önemli araştırma alanlarıdır. Bir örnekte bulunan RNAların eş zamanlı incelenmesine transkriptomik denir. Bu sayede seçilen belli bir grup genin veya genlerin tümünün ifade düzeyi ölçülebilir [8]. Oosite en yakın hücreler olan kümülüs hücrelerinin transkriptomik analizi ile oosit olgunlaşması, döllenmesi, embriyo yeterliliği ve gebelik sonucu ile ilişkilendirilebilir. Geleneksel değerlendirme kriterlerine eklenecek bir takım yeni tanısal biyobelirteçler tanımlanabilir. Bu sayede gebelik oranında artış yakalanabilir.

Yapılan çalışmalarda kümülüs hücrelerinin gelişiminde rol oynayan sinyal yollarında görev alan genlerin ifade profilleri oosit ve embriyo kalitesini belirlemede biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [7, 9-11]. Kümülüs hücrelerindeki metabolik aktivitelerde, hücre sinyal mekanizmasında, hücre dışı matriks bileşenlerinde görev alan birçok gen ifadesi değerlendirilmiştir [7, 10-19]

Bu çalışmada, tüp bebek tedavisi sonucunda iyi/ zayıf morfolojiye sahip embriyo geliştiren oositlerin kümülüs hücrelerinde, Versikan (*VCAN*), Prostaglandin-endoperoksit sentetaz 2 (*PTGS2*), İnositol-trifosfat 3-kinaz A (*ITPKA*) genlerinin ifade seviyeleri araştırılmıştır. Bu genlerden *VCAN* proteoglikan süperaillesinin bir üyesi olan hücre dışı matrik bileşenlerinden bir protein kodlar. Kodladığı protein hücre adezyonu, çoğalması, göçü, anjiyogenez, doku gelişim ve onarımında rol oynar. *PTGS2* geni prostoglandin biyosentezindeki anahtar enzimi kodlar. *ITPKA* geni ise sinyal mekanizmalarından inositol fosfat metabolizmasında rol oynayan ikincil haberci molekül kodlar. Çalışmamızda artmış ya da azalmış gen ifadesi ile tedavi sonuçları karşılaştırılarak, potansiyel gebelik olasılığını değerlendirecek bir biyobelirteç araştırılmıştır. Bu sayede tüp bebek tedavisindeki başarı oranının yükseltilmesi hedeflenmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. İnfertilite

Doğurganlık, insan gelişiminin önemli bir parçasıdır. İnsanın temel içgüdülerinden olan üreme ile neslin devamlılığını sağlamaktadır. Bu ihtiyacın karşılanamaması insan hayatını tehdit eden bir rahatsızlık olmasa da, bireyi, aileyi sonuç olarak toplumu etkileyen sosyal bir problemdir. İnfertilitenin psikolojik, duygusal, finansal, fiziksel ve sosyal birçok etkisi vardır [20].

İnfertilite görülme sıklığı, gelişmiş ülkelerde %8-10 iken gelişmekte olan ülkelerde %15-20 olduğu düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü dünyada 60-80 milyon infertil çift olduğunu tahmin etmektedir [21]. Türkiye’deki infertilite görülme sıklığı net olarak bilinmese de %15 olarak tahmin edilmektedir [22].

İnfertil çiftlerin tedavilerine öncelikle infertilite nedenlerinin araştırılmasıyla başlanır. Çiftler eş zamanlı ve birlikte değerlendirilir.

2.2. İnfertil Çiftlerin Değerlendirilmesi

2.2.1. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesi

Ürolojik değerlendirme fiziki muayene sonrasında detaylı hasta öyküsü alınarak yapılır. Öncelikle hastaya spermiyogram testi yapılır. Bu test ile semen örneğinin rengi, kokusu, akışkanlığı, likefaksiyon (sıvılaşma süresi), sperm sayısı ve hareketliliği değerlendirilir. Sperm sayımı Resim 2.1’de gösterilen bu iş için özel tasarlanmış makler sayım kamerasında yapılır. Mikroskopik inceleme ile semende lökosit, eritrosit gibi farklı hücrelerin ve mikroorganizmaların varlığı değerlendirilir. Semen steril bir pipetle homojen hale getirilir. 10 µl sayım kamerasına konularak faz kontrast mikroskopta 20X büyütmede inceleme yapılır.



Resim 2.1. Sperm sayma kamarası (Makler kamara)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından en son 2010 yılında yenilenen semen değerlendirme kriterlerine göre spermiyogramlar değerlendirilir [23]. Değerlendirme kriterleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Semen analizi için DSÖ’nün belirlediği en düşük referans değerler [24]

Parametreler	En düşük referans değerler
Semen hacmi (ml)	1,5 (1,4-1,7)
pH	>7,2
Total sperm sayısı (10^6)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10^6 / ml)	15 (12-16)
Toplam motilite (A+B derece %)	40 (38-42)
İleri hızlı motilite (ileri hızlı, %)	32 (31-34)
Canlı sperm (%)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal şekil, %)	4 (3-4)

DSÖ değerlendirme kriterlerine göre, verilen semen örneğinin hacmi en az 1,5 ml olmalıdır. Semen az olması meni kanallarında bir tıkanıklığa işaret ediyor olabilir [25]. Hacim dereceli plastik ya da cam pastör pipet ile ölçülür. Normalde semen opak ve grimsi bir renktedir. Opaklığın az olması sperm sayısının az olduğunun göstergesidir. Uzun süreli cinsel perhiz sonrası verilen örnek sarı görünümlü olabilir. Kahverengi/ kırmızı görünümlü örneklerde eritrosit varlığı söz konusudur [26]. Semen pH değeri 7,2-8 arasında olmalıdır. 7,0 altındaki değerler seminal plazmayı oluşturan kanallarda tıkanıklık olabileceği, idrarın semene karışmış olabileceğini düşündürür [25]. Semen değerlendirmeden önce likefiye olması beklenir. Likefaksiyon süresi semen ilk alındığı anda gözlenen kıvamlı yapısının sıvılaşması için beklenen süredir. Ortalama 30-60 dk arasında değişmektedir. Bu sürenin uzaması istenmeyen bir durum olup, prostat bezinin fonksiyonlarındaki değişiklikten veya enfeksiyondan kaynaklanabilir [27]. Normalde semen hafif visköz yapıdadır. Kronik enfeksiyonlarda viskozite artışı gözlenebilir [27].

Mikroskopik incelemede sperm motilitesi, sayısı ve morfolojisi değerlendirilir. Ayrıca lökosit ya da eritrosit gibi hücrelerin varlığı araştırılır. Lökosit ya da eritrosit hücrelerinin semende 1 milyondan az olması beklenir. Semen likefasyonundan sonra sperm konsantrasyonu faz kontrast mikroskopta 20X büyütmede makler kamarada yapılır. Sperm konsantrasyonu her bir ünite sperm hacmine düşen sperm sayısını ifade eder. Makler kamarasının sayım alanında 10x10 kareden oluşan 100 kare bulunur. Kamaraya 10 µl semen örneği konulur. Kareli alandaki birbirinden farklı 10 kare sayılarak ortalama sperm konsantrasyonu belirlenir. Sperm konsantrasyonu için en düşük referans değer 15 milyon/ml'dir. Doğru bir değerlendirme için 15 gün ara ile üç farklı spermiyogram testi yapılmalıdır. Sperm motilitesi faz kontrast mikroskopta 20X büyütmede değerlendirilir. Motilite değerlendirilmesi dört derece üzerinden yapılır [28].

A derece (+4): İleri doğrusal hareket eden sperm

B derece (+3): İleri doğrusal olmayan hareket eden sperm

C derece (+2): Yerde hareket eden sperm

D derece (+1): Hareketsiz sperm

İdeal bir değerlendirme için makler kamarasında 100 adet sperm sayılır. Her sperm hareket kategorisine göre sınıflandırılıp yüzde hesaplama yapılır. Buna göre toplam motilite (A+ B derece %) için en düşük referans değer %40 iken, ileri hızlı motilite %32'dir [24].

Sperm canlılığını değerlendirmek için sperm hücresinin membran bütünlüğüne bakılır. Bu test hipoozmatik bir çözelti ya da boya kullanılarak yapılır. İdeal olarak 100 adet sperm değerlendirip yüzde hesaplaması yapılır. Hareketsiz spermilerin canlı olup olmadığını değerlendirmek önemlidir. Hareketsiz ama canlı olan spermier kuyruk anomalisinin olduğunu gösterir. Hem hareketsiz hem cansız spermilerin varlığı ise epididimal bir patolojiye işaret edebilir [29]. Sperm canlılığı için en düşük referans değeri %58'dir [24].

Sperm morfolojisini değerlendirmek için 20 µl semen örneği lam üzerine yayılarak preparat hazırlanır. Spermac veya Diff-Quik Boyama yöntemleri kullanılarak preparat boyanır. Baş, boyun, akrozom ve kuyruk görünümlerine göre faz kontrast mikroskopta 100X büyütmede değerlendirilir. İdeal bir değerlendirme için 100 adet sperm sayılır. Değerlendirme esnasında spermi normal ya da anormal olarak değerlendirme kriterlerini ortaya koymak için pek çok girişim yapılmıştır. Bunun için DSÖ tarafından pek çok sınıflandırma yapılmıştır.

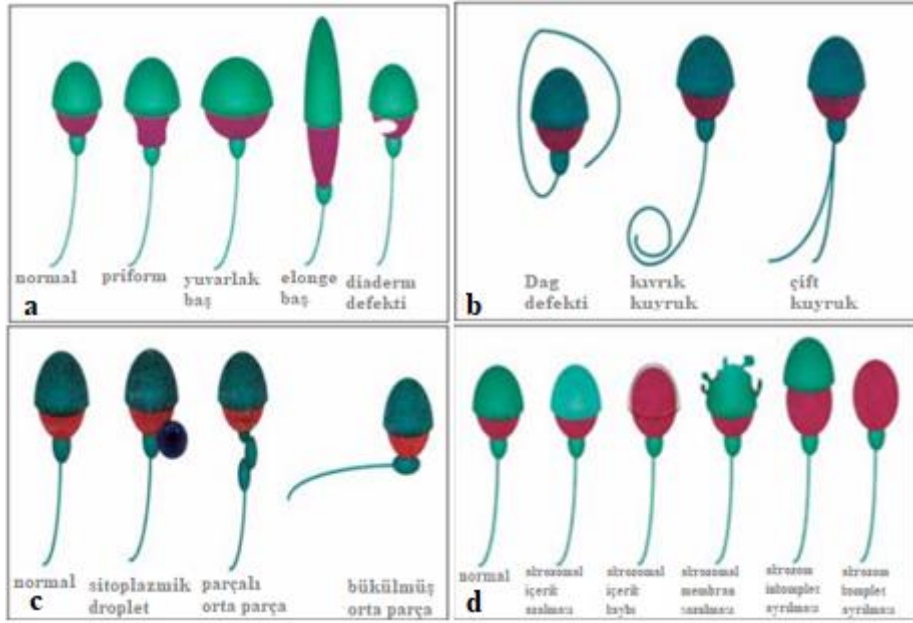
Spermin morfolojisini değerlendirmede yaygın olarak Kruger ve arkadaşlarının yayınladığı Kruger kriterleri baz alınır [30]. Spermdeki şekil bozukluklarına odaklanan Kruger kriterleri DSÖ şekil değerlendirmesine oranla çok daha sıkıdır. Buna göre normal sperm hücresi 60 µm uzunluğunda olup baş, boyun, orta parça ve kuyruktan oluşmaktadır. Şekil. 2.1'de normal sperm hücresinin kısımları gösterilmiştir. Baş kısmı döllenme sürecindeki en önemli kısım olup genetik materyali taşır. Ayrıca bu yapıları saran akrozom bulunur. Akrozom başın % 40- 70'ini kaplayan ve hidrolitik enzimler içeren oval kısımdır. Boyun bölgesi başın kuyruğa bağlandığı kısımdır. Orta parça ise karşılıklı dizilmiş mitokondrilerin bulunduğu ve hareket için gerekli olan enerjinin üretildiği yerdir. Kuyruk kısmı aksonem ve mikrotübüllerden oluşan ve hareketi sağlayan kısımdır [31].



Şekil 2.1. Sperm hücresinin kısımlarının gösterimi [32]

Kruger kriterlerine göre % 4-14 arası normal form içeren sperm örneği iyi prognozlu, % 4'ten az normal form içeren sperm örneği ise kötü prognozlu grup olarak değerlendirilir [30]. Normal formu tanımlanan spermin morfolojisinde meydana gelen değişikliğe bağlı olarak baş, akrozom, boyun, orta kısım ve kuyruk anomalileri belirlenmiştir. Bu anomalilerin şematik gösterimi Şekil 2.3'te verilmiştir. Buna göre baş defektleri; büyük, küçük, priform, yuvarlak, elongate, çift baş, amorf baş olarak sayılabilir. Akrozom anomalileri; akrozomun tam olarak kaybolması, akrozomal içeriğin azalması, akrozomun normalden büyük veya küçük olması olarak sayılabilir. Boyun ve orta kısım anomalileri; başın asimetrik olarak kuyruğa bağlanması, kalın ve düzensiz olması sayılabilir. Kuyruk anomalileri ise; çift kuyruk, kıvrık kuyruk, keskin açılı veya kırık kuyruk şeklinde görülebilir [33].

Semen örneğinde hiç sperm olmaması durumuna azospermi, normalden az sperm bulunmasına ise oligozoospermi (<15 milyon spermatozoa/mL) denir. Sperm motilitesindeki azlığa ise asthenozoospermi (<%50 motil spermatozoa) denir. Sperm morfolojisinin bozuk olmasına ise teratozoospermi (<%4 normal morfoloji) denir. Bir örnekte tüm anomalilerin birlikte bulunma durumuna oligo-asteno-teratozoospermi sendromu (OAT Sendromu) adı verilir. Şiddetli olarak ortaya çıkan OAT sendromunda (<1 milyon spermatozoa/mL) erkek hastanın genital sisteminde tıkanıklık ve/veya genetik bozukluklar görülmektedir [34].



Şekil 2.2. Normal ve anormal sperm yapılarının gösterimi [32] a: Baş anomalilerinin şematik gösterimi, b: Kuyruk anomalilerinin şematik gösterimi, c: Boyun anomalilerinin şematik gösterimi, d: Akrozom anomalilerinin şematik gösterimi

Sperm analizi sonrasında değerlerin normal sınırlar içinde bulunması kesin gebelik oluşturabileceği anlamına gelmez. Sperm sayısı normal değerin altında olan bir erkeğin eşinde gebelik gerçekleşebilirken, sperm sayısı normal sınırlar içerisinde olan bir erkeğin eşi gebe kalamayabilir.

Erkek infertilitesinin etyolojisi ve dağılımı Çizelge 2.2’de gösterilmiştir. Erkeklerde en sık görülen infertilite sebebi idiyopatik semen bozukluklarıdır (OAT Sendromu). Sperm sayı, hareketlilik ve morfolojisindeki bozuklukların anatomik, fizyolojik ve endokrinolojik nedenleri olabilmektedir. Erkek hastaların %75,1’inde idiyopatik semen bozuklukları görülmektedir [35].

Çizelge 2.2. Erkek infertilitesinin etyolojisi ve dağılımı (%) [35]

Erkek infertilitesi etyolojisi	Dağılım (%)
Cinsel Faktörler	1,7
Ürogenital enfeksiyonlar	6,6
Doğumsal anomaliler	2,1
Varikozel	12,3
Endokrin bozukluklar	0,6
İmmünolojik faktörler	3,1
Diğer hastalıklar	3,0
İdiyopatik semen bozuklukları	75,1

DSÖ tarafından üretrit, prostatit, orşit ve epididimit ürogenital enfeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Cinsel yolla bulaşan patojenler nedeniyle üreme organlarında inflamasyon gelişir. Bunun sonucunda spermatogenez aşamalarında duraksama, sperm üretimi ve fonksiyon bozukluğu meydana gelmektedir [36].

Varikozel testisteki toplardamarların aşırı genişlemesiyle ortaya çıkan bir damar hastalığıdır. Testis gelişiminde gerilemeye ve sperm üretimini bozarak infertiliteye sebep olmaktadır. Erkek hastaların %12,3'ünde varikozele rastlanmaktadır. Ereksiyon, boşalma, libido problemleri gibi cinsel faktörler tanı konulduktan sonra uygun tedavi ile çiftler çocuk sahibi olabilirler. Erkek hastaların %1,7'sinde cinsel faktörler görülmektedir. İmmünolojik faktörler nedeniyle ortaya çıkan infertilite %3,1 oranında gözlenirken, doğumsal anomaliler nedeniyle ortaya çıkan infertilite % 2,1 oranındadır. Erkek hastaların %6,6'sında ürogenital enfeksiyonlar görülmektedir. Endokrin bozukluklar ise % 0,6 oranında görülmektedir. Enfeksiyonlar ve hormonal bozukluklar ilaç verilerek tedavi edilebilmektedir. Semen parametreleri ışığında değerlendirmeler; endokrinolojik, genetik ve ultrasonografik tetkiklerle yapılır. Bu sayede erkek hastanın infertilite değerlendirilmesi tamamlanır [35].

Erkeğe bağlı infertilite tüm infertilite olgularının % 30-40'ını oluşturmaktadır. Genellikle; sperm sayısındaki azlık, sperm morfolojisindeki bozukluklar, sperm hareketliliğindeki yetersizlik ya da bunların çeşitli kombinasyonu şeklinde ortaya çıkmaktadır. Semen parametreleri tıbbi veya cerrahi yollarla düzeltilebilir. Tedavisi mümkün olmayan vakalarda epididimden ya da testisten sperm elde etme sonrasında mikroenjeksiyon yöntemi ile tedavi planlanabilir.

2.2.2. Kadın infertilitesinin değerlendirilmesi

Sağlıklı bir gebelik ve doğum kadın anatomisi ve fizyolojisine bağlı olduğu için infertilite tedavisinde kadın hastanın değerlendirilmesi en kritik aşamadır [34]. Değerlendirme öncelikle fiziki muayene ve detaylı öykü alınarak yapılır. Hem anatomik hem de ultrasonografik değerlendirme yapılır. Yumurta hücreleri overlerdeki foliküller içerisine yerleşmişlerdir. Ultrason ile foliküller değerlendirilir. Hastanın tubal ve pelvik patolojilerini değerlendirmek için histerosalpingografi yapılır. Bunun için rahim içine verilen kontrast madde ile rahmin içi ve tüplerin açıklığı çekilen grafi ile değerlendirilir.

Kadınlarda ilerleyen yaşla beraber over fonksiyonlarında gerileme ve buna bağlı olarak dölleme kapasitesi olan oosit üretebilme (over rezervi) hızı özellikle 35 yaş üzerinde azalmaya başlar. Hastanın ovaryen rezervini ölçmek için erken foliküler fazdaki (döngünün 3. günü) serum folikül stimülan hormon (FSH) konsantrasyonu en basit ve en sık uygulanan ovaryen rezerv ölçüm yöntemidir [37]. FSH üreme sisteminin önemli hormonlarından olup foliküllerin büyümesinden sorumludur. Kadın infertilitesinin etyolojisi ve dağılımı Çizelge 2.3' de gösterilmiştir.

İnfertil kadınlarda yumurtlama ile ilgili yaşanan problemler (ovulatuvar disfonksiyon) %40 oranında gözlenir. Genelde yumurtlama düzensizliği sonucunda adet düzensizliği şeklinde kendini gösterir. İnfertil kadınlarda ovulasyon varlığı mutlaka tespit edilmelidir. Ovulasyon hipotalamus, hipofiz ve over aksının hormonal ve fizyolojik olarak uyumlu çalışmasıyla oluşur. Bu uyum herhangi bir aşamada bozulursa anovulasyon ile sonuçlanır. Anovulatuvar kadınlarda endometrium kalınlaşmadığı için implantasyona uygun mikroçevre de sağlanamaz. Polikistik over sendromu, hipogonadotropik hipogonadizm, ovaryen yetmezlik hastaları bu grubun içinde yer alır [34].

Çizelge 2.3. Kadın infertilitesinin etyolojisi dağılımı (%) [34]

Kadın İnfertilitesi etyolojisi	Dağılım (%)
Ovulatuvar disfonksiyon	~ %40
Tubal ve pelvik patolojiler	~ %40
Uterin/ servikal patolojiler	~ %10
Açıklanamayan infertilite	~ %10

İnfertil kadınların % 40'ında tubal/ pelvik faktörler tespit edilmiştir. Tubalar overlerde olgunlaşan oositlerin döllendiği ve sonrasında rahme taşındığı organlardır. Proksimal ve distal tubal tıkanıklıklar, hidrosalpinks, pelvik adezyonlar, endometriozis, geçirilen tubal cerrahiler, geçirilen pelvik inflamatuvar hastalıklar nedeniyle oluşmaktadır. Tüm bu faktörler rahim filmi ve laparoskopi ile değerlendirilir. Tüplerde görülen hasarlı bölümlerin veya tıkanıklıkların ameliyatla düzeltilmesi çok kabul görmemekte ve oluşacak yeni yapışıklıklar nedeniyle doğrudan tüp bebek tedavisine geçilmesi önerilir [34].

İnfertil kadınların % 10'unda uterin/ servikal faktörler tespit edilmiştir. Müllerian anomaliler, servikal polip, endometrial polip, intramural ve submüköz miyomlar bu gruba örnek verilebilir. Uterusta yer alan polip ve miyomlar kavite yüzeyini bozarak, kanlanmayı bozarak, tubal ostiumları tıkayarak infertiliteye sebep olmaktadır [38].

Değerlendirmeler sonucunda kullanılan tanısal testler normal çıkmasına rağmen çocuk sahibi olamayan çiftler ise açıklanamayan infertilite ile tanımlanır. Açıklanamayan infertilite tanısı için normal sperm parametreleri, ovulasyon, uterin kavite ve tubalardan en az birinin açık olduğunun gösterilmesi gerekir. Bu hastaların üreme hızı alt sınırdadır. Bu hastalarda aylık gebe kalma olasılığı %2-4'dür ve normal çiftlerin (% 20) oldukça altındadır [39]. Bu gruptaki hastaların oosit ve sperm gelişiminde, döllenme, implantasyon ve erken embriyonik dönemde gelişimsel bozukluklar olduğu düşünülmektedir. Açıklanamayan İnfertil hastalarda kadının yaşı ve infertilite süresi arttıkça, gebelik şansı da azalmaktadır.

İnfertil çiftlerin %85-90'nın tıbbi ve cerrahi tedavilerle infertiliteye neden olan sorunun giderilmesiyle çocuk sahibi olma yolu açılmaktadır. Geriye kalan % 10-15'i ise yardımla üreme tekniklerinden destek almaktadırlar [40]. Yardımcı üreme teknikleri sayesinde kadın vücudunda üretilen birden fazla yumurta hücresinin vücut dışına alınarak erkeğin spermi ile laboratuvar ortamında IVF teknikleri ile döllenmesi, embriyo geliştirilmesi ve elde edilen embriyonun kadın rahmi içine konulması ile gebelik oluşturulması amaçlanır.

2.3. Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT)

Doğal yollardan gebe kalamayan çiftlerde uygulanan tıbbi yöntem ve tedavilerin tamamı yardımla üreme teknikleri olarak adlandırılır. Bu sayede infertil çiftlerin sağlıklı çocuk sahibi olması amaçlanır.

Yardımla üreme teknikleri ile yapılan tedaviler birçok aşamadan oluşur. Kontrollü yapılan overyan stimülasyon ile overler uyarılır ve sonrasında oositler toplanır. Erkek hastadan semen alınarak fertilizasyon için yıkama yapılır. Her iki gamet laboratuvar ortamında bir araya getirilerek embriyolar oluşturulur. Embriyoların inkübatörde gelişimleri takip edilir. Elde edilen embriyolardan en kaliteli olanı anne adayına transfer edilir.

Louise Brown adında sağlıklı ilk tüp bebek Dr. Edwards ve Dr. Steptoe'nun yaptığı *in-vitro* fertilizasyon yöntemiyle 1978 yılında Cambridge'de dünyaya gelmiştir [41]. Üzerinden geçen zaman içinde yapılan yatırımlar ve geliştirilen teknolojiler sayesinde bugün yardımla üreme tedavileri infertil hastalara umut ışığı olmaktadır. İnfertil bir çift değerlendirildiğinde, infertilitenin altında yatan nedenler iyice belirlenmeli, ona uygun bir tedavi uygulanmalıdır.

İlk IVF bebeği doğal döngü sonrası dünyaya gelmiştir. Bu başarının ardından ABD'de başlatılan bir programın sonunda 41 laparoskopik oosit toplama (OPU) denemesinin hiçbirinin gebelikle sonuçlanmaması sonrasında hastaların overlerini hiperstimüle etmek için insan menopozal gonadotropinini (HMG) uygulamaya karar verilmiştir. Hastaya 4 gün içinde toplam 7 ampul HMG uygulanmıştır. Sonuçta ABD'de ilk IVF bebeği dünyaya gelmiştir [42]. Atılan bu başarılı adımla IVF tedavilerinde over stimülasyon dönemi başlamıştır. Zaman içinde artan üreme biyolojisi bilgisi, farmakolojik ilerlemeler ve teknolojik gelişmeler sayesinde insan menopozal gonadotropinini (HMG) uygulamaları IVF tedavilerinin etkinliğini arttırmıştır. Yardımla üreme tekniklerinin tamamında ilk basamak tedavidir.

Yardımla üreme tekniklerinde en yaygın olarak kullanılan tedaviler günümüzde üç başlık altında toplanabilir. Bunlar intra uterin inseminasyon (IUI), *In-vitro* fertilizasyon (IVF) ve intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)' dur.

Tüm hastalar için geçerli sabit bir gonadotropin dozu, kullanım süresi, uygulama şekli yoktur. Başlangıç dozuna karar vermek için yaş, vücut kitle endeksi (VKİ), antral folikül sayısı, bazal FSH ve östrodiol (E2) seviyesini birlikte değerlendirmek gerekir. Tedavi protokollerinde folikül ve oosit gelişimini sağlamak için gonadotropinler, hormonal kontrol için gonadotropin releasing hormon agonisti (GnRHa) ve antagonisti (GnRHant), oosit olgunlaşması için insan koryonik gonadotropin (hCG) ve luteal destek için progesteron kullanılır. KOH uygulamasında temel hedef dışarıdan verilen gonadotropin uyarısıyla ideal

sayı ve kalitede oosit elde etmektir. Bu nedenle FSH, luteinizan hormon (LH) ve HMG preparatları tek başına veya birlikte kullanılabilir [43].

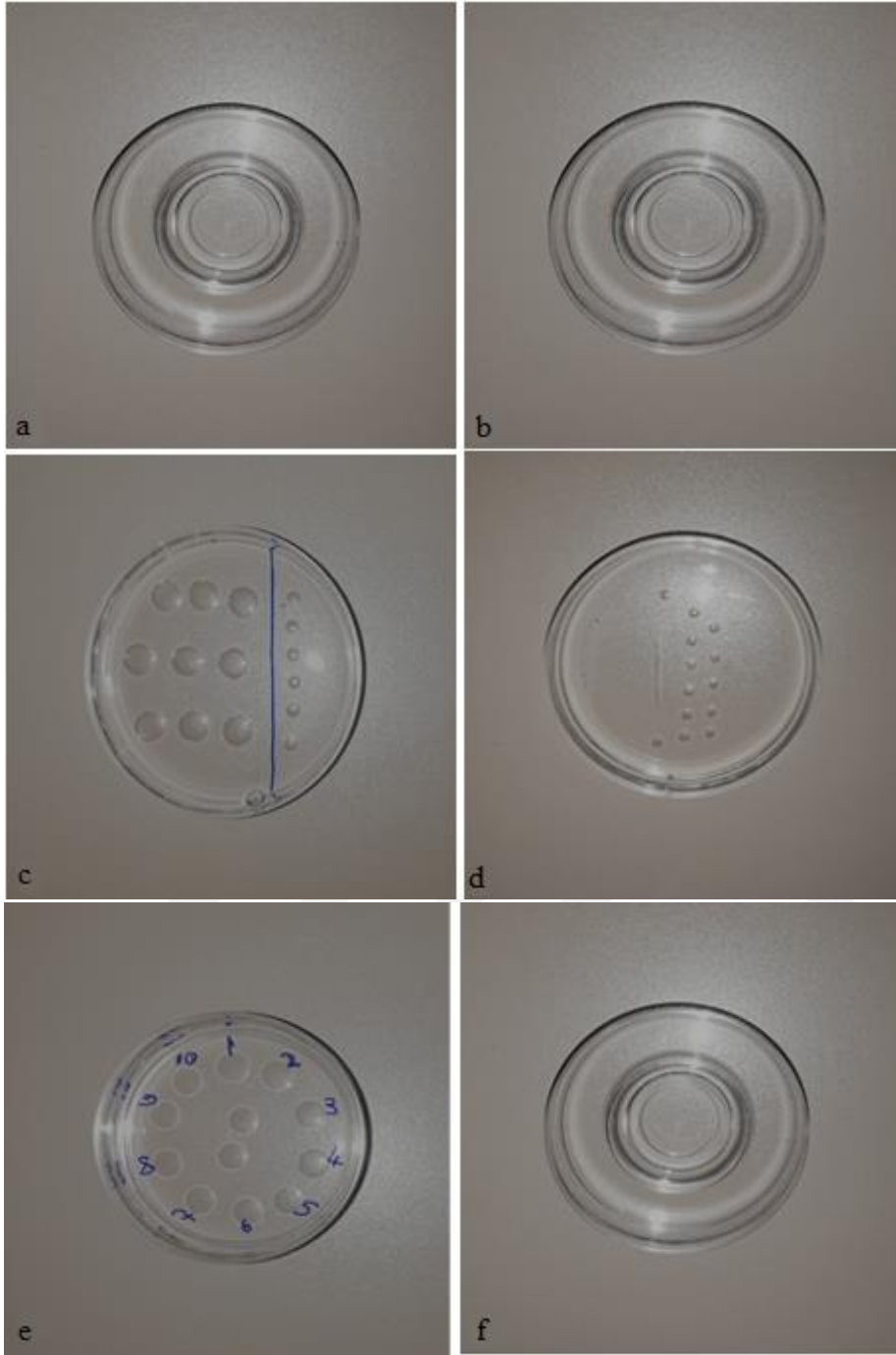
IUI tedavisinde kadının overleri kontrollü yapılan stimülasyon ile uyarılır. Foliküllerin büyüklükleri ultrasonografik ölçüm ve eş zamanlı yapılan serum östrojen (E2) seviyesi takibi ile devam eder. Foliküllerin en az biri 18 mm büyüklüğe ulaştığında ovulasyonu tetiklemek için insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulaması yapılır. hCG uygulamasından 36 saat sonra IUI işlemi planlanır. İşlem günü erkek hastadan alınan semen örneği çeşitli yıkama aşamalarından geçirilerek seminal plazmadan ayrıştırılır ve spermelerin dölleme kabiliyeti kazanması sağlanır. Hazırlanan sperm örneği kadın hastanın uterin kavitesine bir katater yardımıyla verilerek gametlerin doğal ortamlarında karşılaşma olasılığı artırılır. Bu sayede fertilizasyon kadın hastanın vücudunda gerçekleşmiş olur. IUI tedavisinin gebelik olasılığı % 10-15 arasındadır [40].

IVF tedavisinde önce kontrollü ovaryan hiperstimülasyon yapılır. Gelişen foliküllerden en az 3 tanesinin 18 mm olması ve her bir folikül için E2 değerinin 800- 1000 pmol/ L olması halinde ovulasyonu tetiklemek için insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulaması yapılır. hCG uygulamasından 36 saat sonra OPU işlemi planlanır. Bu planlamaya göre embriyoloji laboratuvarında OPU' dan bir gün önce hazırlık yapılır. Günümüzde oosit, sperm ve embriyo için her birinin ihtiyaçlarına yönelik olarak tasarlanmış ve ticari olarak satılan besiyerleri geliştirilmiştir. Hücreler için yapılacak mikromanipülasyonlar için gerekli olan besiyerleri tek kullanımlık steril plastik petri kaplarına hazırlanarak bir gece öncesinden 37 °C'de %6 CO₂ ve %5 O₂ kontrollü inkübatöre konulur. Bu sayede besiyerlerinin sıcaklık ve pH'sı dengelenir. IVF tedavisi boyunca yapılan tüm mikromanipülasyonlar için kullanılan petri kapları Resim 2.4'te gösterilmiştir.

Erkek hastada alınan semen örneği yıkanarak seminal plazmadan ayrıştırılır. Bu sayede dölleme yeteneği kazanan sperm IVF için hazırlanmış olur. Kararlaştırılan saatte oositler, transvaginal ultrason eşliğinde iğne yardımıyla toplanır. Aspirasyon iğnesi ile aspire edilen folikül sıvıları IVF laboratuvarına iletilir. Folikül sıvıları 10 cm steril plastik petri kaplarına dökülür. Stero mikroskop altında kümülüs- oosit kompleksleri araştırılır ve cam pastör pipet yardımıyla oosit toplama petri kabına (Resim 2.2) konulur.

Toplanan kümülüs-oosit kompleksleri 2-4 saatliğine oosit inkübasyon petri kabına (Resim 2.2) aktarılıp inkübatöre kaldırılır. Fertilizasyon işlemi için, her bir kümülüs-oosit kompleksi başına 100 000 sperm gelecek şekilde hazırlanmış sperm örneğinden eklenir. Bu sayede hastaların gametleri *in-vitro* ortamada döllenmesi için aynı petri kabında bir araya getirilmiş olur. Ertesi gün oositlerin etrafındaki kümülüs hücreleri denüstasyon pipeti ile pipetaj yapılarak temizlenir. Kümülüs hücrelerinden ve spermlerden temizlenen oositler kültür petri kabına (Resim 2.2) alınır ve inverted mikroskopta fertilizasyon kontrolü yapılır. Oositin sitoplazmasında erkek ve dişi pronükleus gözlemlenir. Döllenmiş oositlerin devam eden kültür günlerinde önce ikiye sonra sırasıyla dörde ve sekize bölünmesi takip edilir.



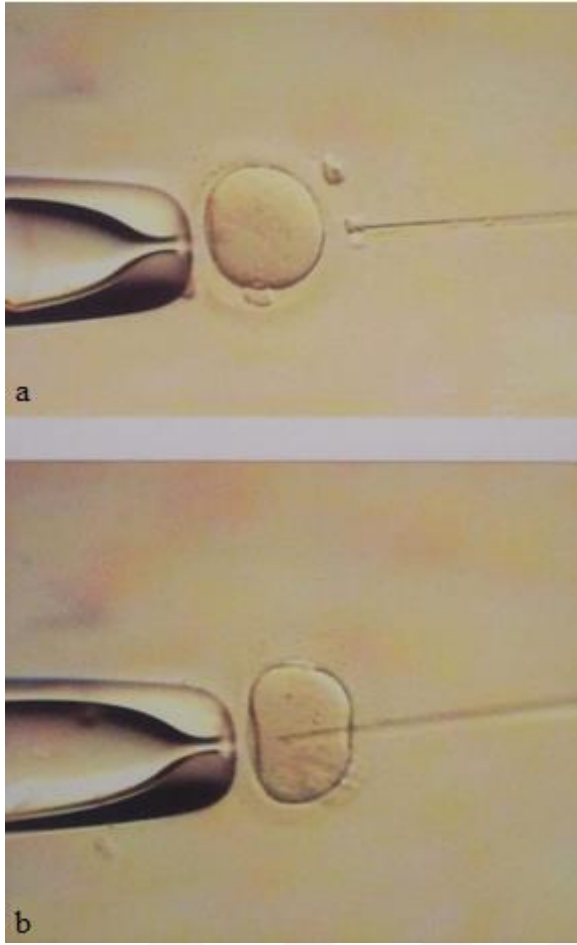


Resim 2.2. IVF laboratuvarında mikromanipulasyon için hazırlanan petri kapları a) Oosit toplama petri kabı, b) Oosit inkübasyon petri kabı, c) Oosit temizleme petri kabı, d) ICSI petri kabı, e) Embriyo kültür petri kabı, f) Embriyo transfer petri kabı

Gelişen en kaliteli embriyonun uterusu bir katater yardımıyla transferinin yapılmasıyla tedavi son bulur. IVF tedavisinde döllenme laboratuvar ortamında olmasına rağmen sperm kendi marifeti ile oositi döller.

İntra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) IVF tedavilerinin özel bir şeklidir. İlk kez 1992 yılında Brüksel’de Palermo tarafından geliştirilmiş bir tekniktir [44]. Şiddetli erkek infertilitesinin tedavisi için çok büyük bir başarı sağlamıştır [45]. Çok düşük sperm sayısı ve motilitesi olan erkek hastaların ancak sperm donasyonu ya da evlat edinme ile çocuk sahibi olma olasılığı varken, ICSI sayesinde bu olasılık artmıştır. IVF tekniğinden farklı olarak döllenme mikroyenjeksiyon ile sperm hücresinin oositin sitoplazması içerisine bırakılmasıyla yapılır. Dolayısıyla kadın hastadan toplanan oosit kadar sperm hücresi olması tedavi için yeterli olur. ICSI işleminin öncesi ve sonrasındaki işlemler IVF tekniğinin aynısıdır. Güvenirliği kanıtlanan ICSI tekniği IVF tedavilerinde oldukça yaygınlaşmış, zamanla tüm infertil hastalara uygulanır hale gelmiştir [45].

Mikromanipulasyon için öncelikle oositin etrafındaki kümülüs hücrelerinin temizlenmesi gerekir. Bunun için hazırlanan oosit temizleme petri kabında (Resim 2.4) kümülüs-oosit kompleksleri önce hyalorinidaz enzimiyle muamele edilerek kimyasal temizlik, sonrasında denudasyon pipetiyle pipetaj yapılarak fiziksel temizlik yapılır. Bu sayede oositin etrafındaki kümülüs hücreleri uzaklaştırılır ve oositin olgunluk seviyesi tayin edilir. Çünkü sadece Metefaz-II aşamasında olan oositlere mikroyenjeksiyon yapılır. Hazırlanan oositler ve spermeler mikroyenjeksiyon petri kabına (Resim 2.2) yerleştirilir. Mikromanipulatörün tutucu pipeti oositi sabitlerken, enjeksiyon pipeti spermi önce hareketsiz hale getirir, sonrasında da sitoplazmanın içerisine bırakır. Mikroyenjeksiyon esnasında mikropipetlerin konumu ve enjeksiyon Resim 2.3’te gösterilmiştir. Döllenme sonrası oositler kültür petri kabına (Resim 2.2) konularak inkübatöre kaldırılır. ICSI sonrası 18-22. saatte fertilizasyon kontrolü yapılır. Fertilizasyon dişi ve erkeğe ait iki pronükleusun görülmesi ile tespit edilir. ICSI işleminden yaklaşık 24 saat sonra embriyo ilk bölünmesini gerçekleştirir ve iki blastomerli embriyo oluşur. Kültürün ikinci günü 4 blastomerli, üçüncü gün 8 blastomerli embriyo haline gelir. Dördüncü gün blastomerlerin hücre sınırları kaybolur ve morula aşamasına geçer. Beşinci gün de ise blastosist evresine ulaşır. Oositin döllenmeden beşinci gün embriyo aşamasına kadar geçirdiği süreçler Resim 2.4’ de gösterilmiştir.



Resim 2.3. İnterasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) a) Oosit tutucu pipetle sabitlenir, tek sperm hücrecini taşıyan mikropipetin ICSI öncesi pozisyonu, b) Mikroenjeksiyon yapılışı

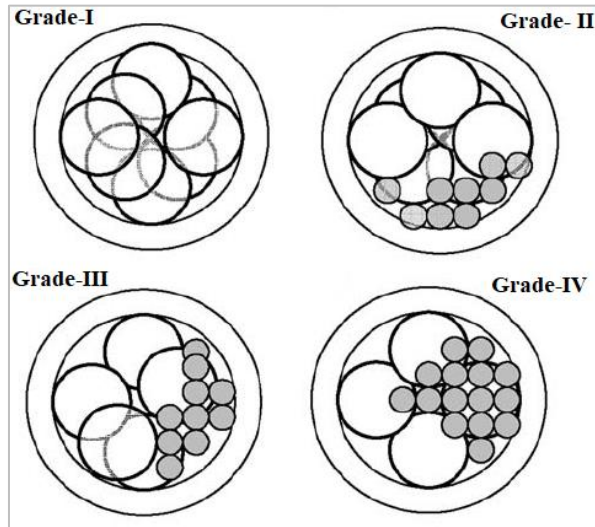
In-vitro ortamda gelişen embriyoların blastomer sayısı, bölünme hızı, blastomerlerin sitoplazmik özellikleriyle şekil ve büyüklüğü, fragmantasyonun varlığı ve dağılımı gibi kriterlere bakılarak bir derecelendirme yapılarak embriyo kalitesi değerlendirilir. Embriyoların değerlendirilme kriterleri Çizelge 2.4’de gösterilmiştir.

Grade-I embriyolar ikinci günde 4, üçüncü günde 8 blastomerlidir. Blastomerler eşit büyüklükte, yuvarlak ve parlak sitoplazmalıdır. Fragman içermezler. Grade-II embriyolar blastomer sayısı ve büyüklüğü eşit olabileceği gibi bir miktar farklılıkta gösterebilirler. Fragmantasyon oranı %5-10 arasındadır. Grade-III embriyolarda şekil ve büyüklük farkı artmıştır. Fragmantasyon oranı %10-20 arasındadır. Grade-IV embriyolar ise blastomerlerin sayı, şekil ve büyüklükleri birbirinden farklıdır. Blastomer sayıları net olarak tespit edilemez. Fragmantasyon embriyonun % 50’sından fazlasını kaplamıştır [46].

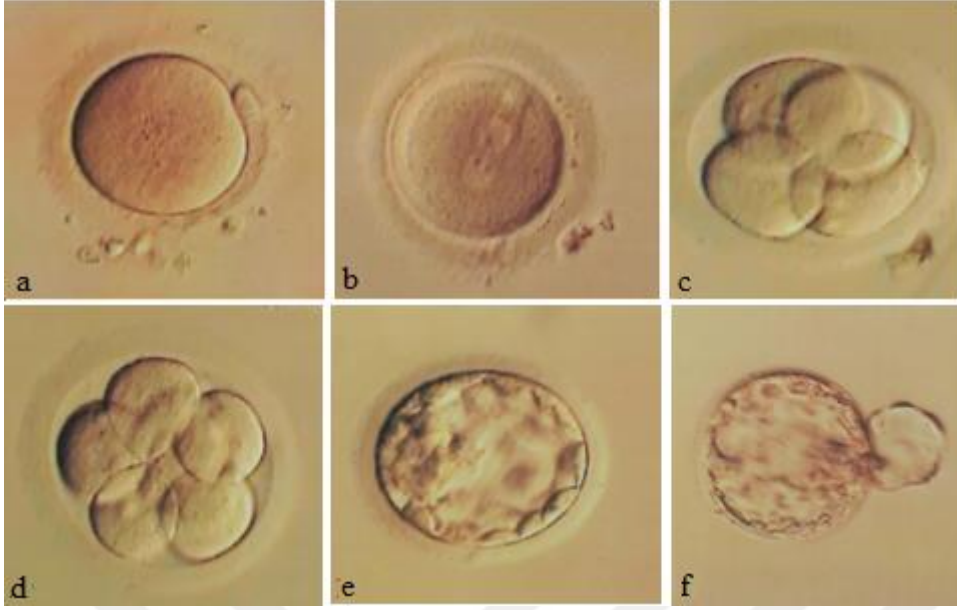
Çizelge 2.4. Embriyoların değerlendirilme kriterleri [46]

Kalite	Görünüm
Grade I	Eşit büyüklükte blastomere sahip, fragmentasyon görülmeyen embriyo
Grade II	Eşit blastomere sahip, < %5-10 oranında fragmentasyon gösteren embriyo
Grade III	Eşit olmayan blastomere sahip, < %10-20 oranında fragmentasyon gösteren embriyo
Grade IV	Blastomerleri birbirinden tamamen farklı, blastomer sayısı tam olarak tespit edilemeyen, ileri derecede fragmentasyona sahip embriyo

Embriyo derecelendirmede blastomer büyüklükleri ve fragmentasyon dağılımının şematik gösterimi Şekil 2.3’ de gösterilmiştir. Kültür süresince embriyoların morfolojik karakterleri yapılan günlük kontrollerde kayıt altına alınır. Hastanın geliştirdiği embriyolardan morfolojik olarak en kaliteli olan katatere yüklenerek ultrason eşliğinde hastaya transfer edilir. Transfer gününden 12 gün sonra hastanın kanında β hCG seviyesine bakılarak gebelik araştırılır. Mikroenjeksiyonun gebelik olasılığı infertilite sebebine bağlı olmakla beraber % 30-40 arasındadır [40].



Şekil 2.3. Embriyo derecelendirmesinde blastomer büyüklükleri ve fragmentasyon dağılımının şematik gösterimi [47]

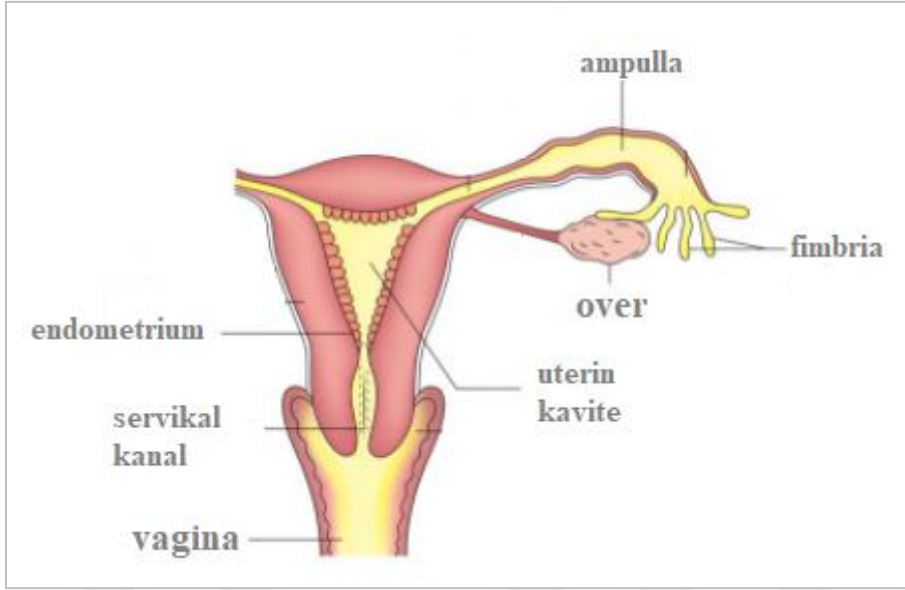


Resim 2.4. Oositin döllemeden sonraki gelişim aşamaları a) İnsan oositi, b) Döllenmiş oositte dişi ve erkek pronükleusun oluşumu, c) İkinci gün insan embriyosu, d) Üçüncü gün insan embriyosu, e) Beşinci gün embriyosu (blastosist), f) Hatching blastosist

Yardımla üreme tedavilerinin tüm amacı, infertil çiftlerin sağlıklı çocuk sahibi olmasına yardımcı olmaktır. Gelişen teknolojiler sayesinde eve bebek götürme hızı %30'lara kadar çıkarılmıştır. Yapılan çoğu tedavide gebelik hızını arttırmak adına transfer edilen embriyo sayısı arttırılmakta bu da çoğul gebeliklerin sayısını dramatik olarak yükseltmektedir. İnfertilite tedavisi sonucu oluşan doğumlar tüm canlı tekiz doğumların % 1-3'ünü, ikiz doğumların % 30-50' sini ve daha fazla sayıdaki çoğul doğumların % 75' ten fazlasını oluşturmaktadır [48]. Bu durum hem anne ve bebeğin sağlığını riske atmakta hem de artan medikal harcamaları da beraberinde getirmektedir [49]. Yardımla üreme tedavi uygulamalarında gebelik oranını arttırmak için en kaliteli oosite gebelik şansı tanıyacak, girişimsel olmayan bir seçim metoduna ihtiyaç vardır.

2.4. Üreme Fizyolojisi

Kadın üreme organları bir çift ovaryum (yumurtalık), bir çift tuba uterina (yumurta kanalları), uterus (rahim), vajina ve dış genital organlardan (vulva) meydana gelir. Kadın üreme organlarının şematik görünümü Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Kadın üreme organlarının şematik görünümü [50]

Overlerin üreme fizyolojisinde iki önemli görevi üreme hücrelerini (gamet) üretmek ve steroid hormonlarını salgılamaktır [51]. Overlerden östrojen ve progesteron adı verilen iki esas hormon salgılanır.

Overlerden olgunlaşmış bir oositin atılması (ovulasyon), puberte ile başlar ve menopoza kadar devam eder. Ovulasyon menstrasyon başlangıcından itibaren ortalama 13-14. günde gerçekleşir ve her 28 günde tekrar edilir. Bu döngüye ovaryan döngü denir. Genellikle her ay 7-14 folikülünden biri seçilerek ovule olurken kalan foliküller bozularak korpus luteumu oluşturur [52].

2.4.1. Folikülogenez

Tüm memeli hayvanların overlerinde, oositler kendi yapısal ve gelişimsel nişleri olan folikül içinde bulunurlar. Folikül, overlerin temel yapı taşıdır. Primordial folikülün seçimiyle başlayıp, olgun oosit gelişmesi ve en nihayetinde ovulasyon ile sonuçlanan sürece folikülogenez adı verilir. Folikülün yapısı oosit ve onu çevreleyen granüloza ve teka hücrelerinden oluşur. İnsan granüloza hücreleri folikülogenez süresince oositlerin büyüme ve gelişmesi için büyük öneme sahip oldukları gibi endometrial gelişim ve ovulasyon için gerekli hormonların salgılanmasında da etkin rollere sahiptir [53]. En dıştaki teka hücreleri ise ovulasyon esnasında steroid hormonu sentezler. Şekil 2.5’de ovaryumdaki foliküllerin gelişim aşamaları gösterilmiştir. Ovaryumda foliküller gelişim aşamasına göre üçe ayrılır.

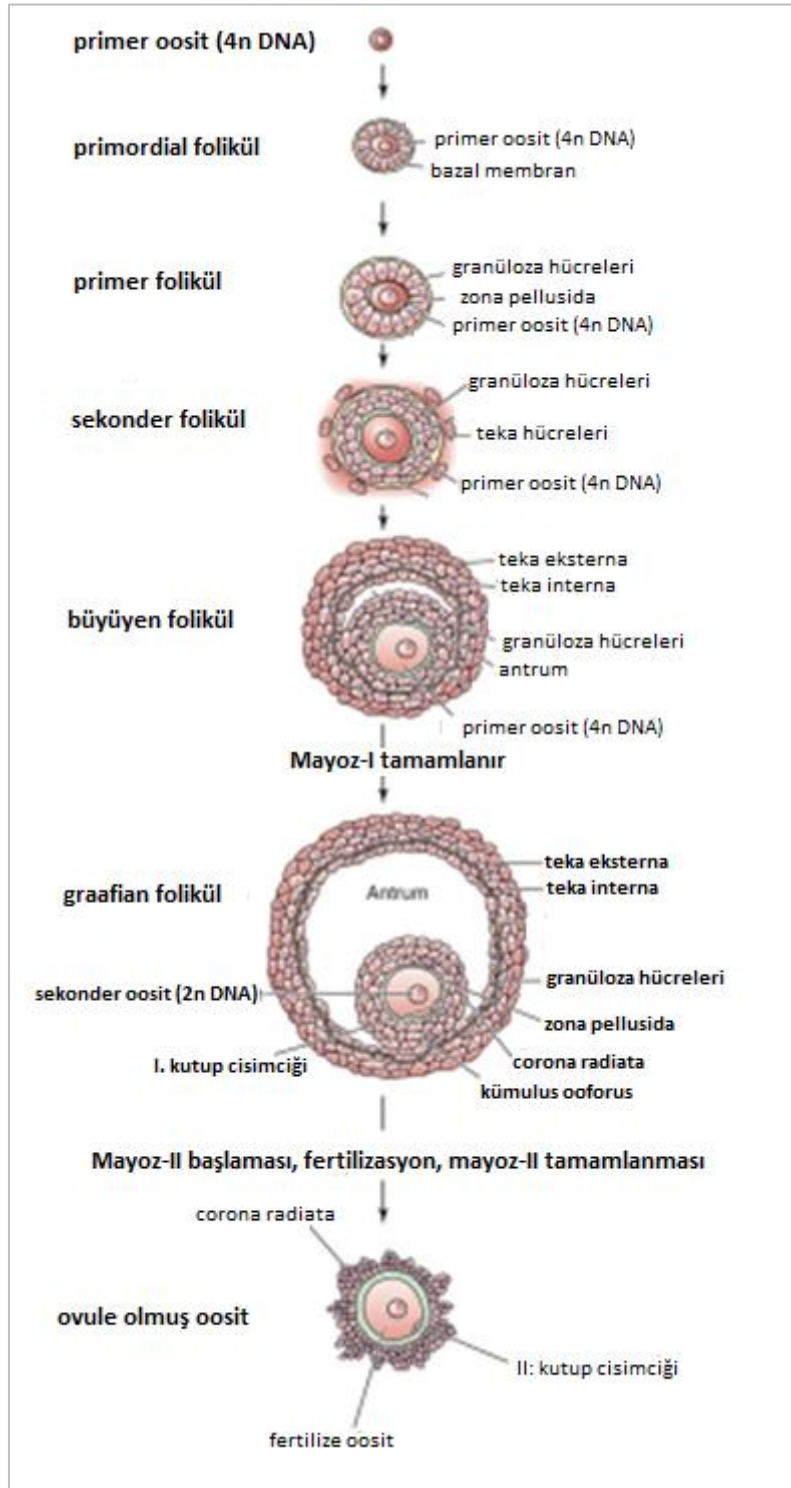
1. Primordiyal foliküller
2. Büyüyen foliküller
3. Olgun folikül (graffian folikül)

Primordiyal foliküller doğumdan önce ovaryumda bulunan foliküllerdir. İçindeki primer oosit tek katlı yassı hücrelerle çevrilidir. Primordiyal foliküllerin gelişmesiyle büyüyen foliküller oluşur. Bu foliküller gelişim evrelerine bağlı olarak primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Primer foliküllerde oositi çevreleyen yassı epitel kübik epitele değişir. Bu aşamada oositin etrafında hücre içermeyen glikoproteinlerden oluşan bir yapı gelişir. Bu yapıya *zona pellusida* adı verilir. *Zona pellusida* içerisinde transzonal kanallar vardır. Bu dönemde folikülü çevreleyen stromada hücreler farklılaşarak teka tabakasını oluşturur. Stromada yer alan fibroblastlar *teka interna* ve *teka eksterna* olarak farklılaşır. *Teka interna* sekonder folikülü dıştan kuşatan ve östrojen hormonu sentezleyen damarca zengin tabakadır. *Teka eksterna* ise kollajen fiberlerden oluşmuş bir bağ dokusudur ve hormon salgılayamazlar [54, 55]. Folikülogenez ve oosit olgunlaşması eşzamanlı gerçekleşir. Oosit insanın en büyük hücresi olup, geniş veziküler nükleusa sahip bir hücredir. Oositin büyümesi granüloza hücrelerinin kontrolü altındadır. *Zona pellusida* içerisindeki transzonal uzantılar sayesinde aminoasitler, nükleotidler ve tüm metabolitlerin geçişi sağlanır.

Oositin büyümesiyle eş zamanlı olarak granüloza hücreleri de çoğalır ve hücreler arasında sıvı birikir. Folikül içinde hücrelerden gelen sıvılarla dolu olan düzensiz boşluklar oluşur ve folikül sekonder folikül (antral folikül) adını alır. Foliküldeki boşluk giderek genişler, oosit ve etrafındaki granüloza hücreleri folikülün bir ucuna doğru itilir. Bu yapı *kumulus ooforus* olarak tanımlanır. Oositin çevresindeki sıkı paketlenen granüloza hücreleri ise *corona radiata* adını alır. Bu aşamadaki folikül olgun folikül (graffian folikül) adını alır. Oositi çevreleyen bu granüloza hücreleri ovulasyon ile overlerden ayrılırken oosite eşlik eder. *Corona radiata* hücreleri ovumun hücre membranı ile temas halindedir [55].

Her adet döneminde bir folikül seçilerek diğerlerinden daha fazla büyüyerek ortalama 14 gün sonunda graafian folikül adını alır. Son derece genişlemiş olan folikül ovaryum yüzeyinden bir yırtılma yaparak döllenme kapasitesine sahip olan oositi ve etrafındaki granüloza hücrelerini tuba uterina'ya atar. Ovulasyonu takiben antral boşluk kanla dolar ve sonrasında bağ dokusu yapısını alır. Granüloza hücreleri kıvrımlı bir hal alır ve luteinasyon gelişerek *korpus luteum* oluşur [56].

Folikül katmanlarının her biri sağlıklı bir oositin gelişimi için çalışır. Bu sayede ovulasyon sonrasındaki fertilizasyon ve embriyo gelişimi başarılı bir şekilde gerçekleşir. Bu süreçlerde hücre grupları karşılıklı bir iletişim içindedirler [57, 58].

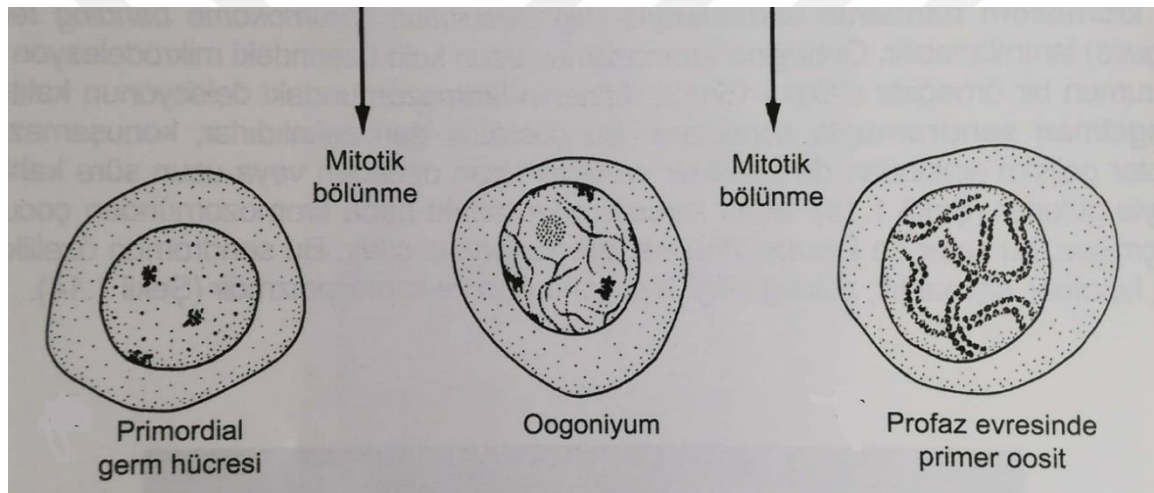


Şekil 2.5. Ovaryumdaki foliküllerin gelişim aşamalarına göre şematik gösterimi [59]

2.4.2. Oogenez

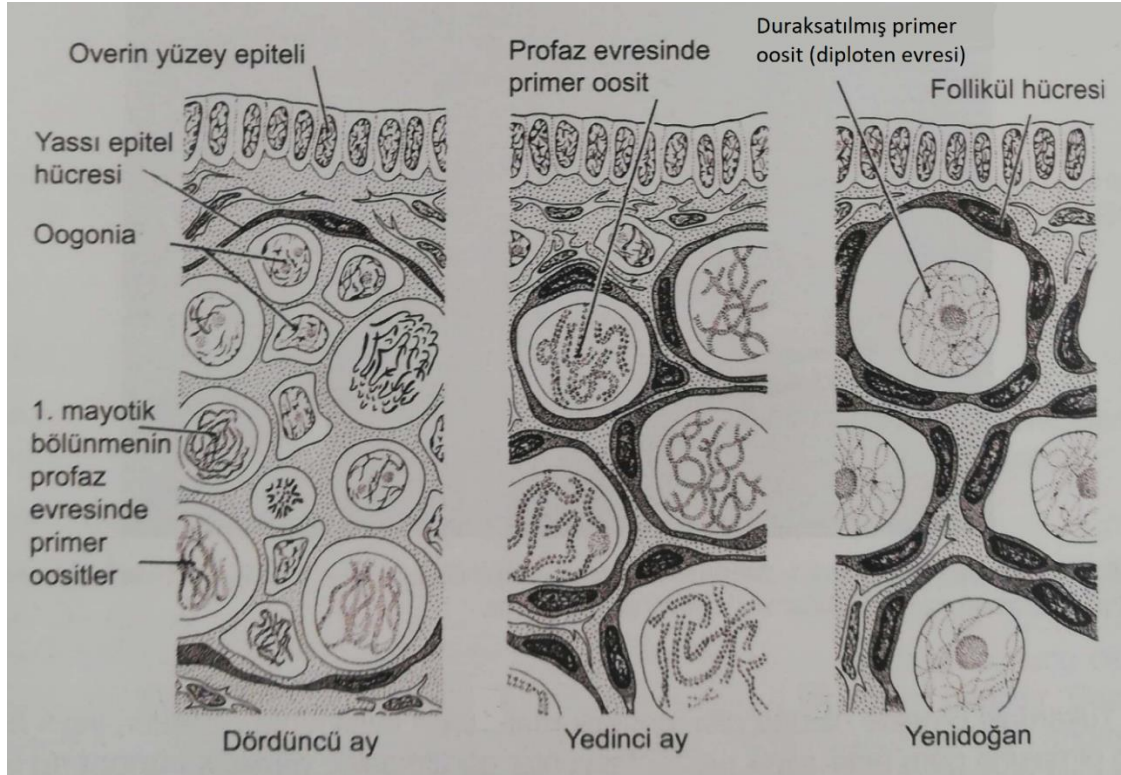
Dişi üreme hücrelerinin gelişmesi ve olgunlaşması sürecine oogenezis adı verilir ve doğum öncesi (prenatal) ve doğum sonrası (postnatal) dönem olacak şekilde iki aşamalı bir süreçtir.

Oogenezin prenatal evresinde; gebeliğin 5-6. haftalarında genital kabartıya doğru göç eden primordial germ hücreleri oogonyumlara dönüşürler. Oogonyumlar doğum öncesi dönemde 6 ile 8. haftaları arasında mitotik çoğalma geçirirler. Yassı epitel hücreleri ile çevrelenir. Bu sayede foliküller oluşur [59]. Primordial germ hücrelerinden primer oosit evresine kadar oogenez aşamaları Şekil 2.6’de gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Primordial germ hücrelerinden primer oosit evresine kadar oogenez aşamaları [59]

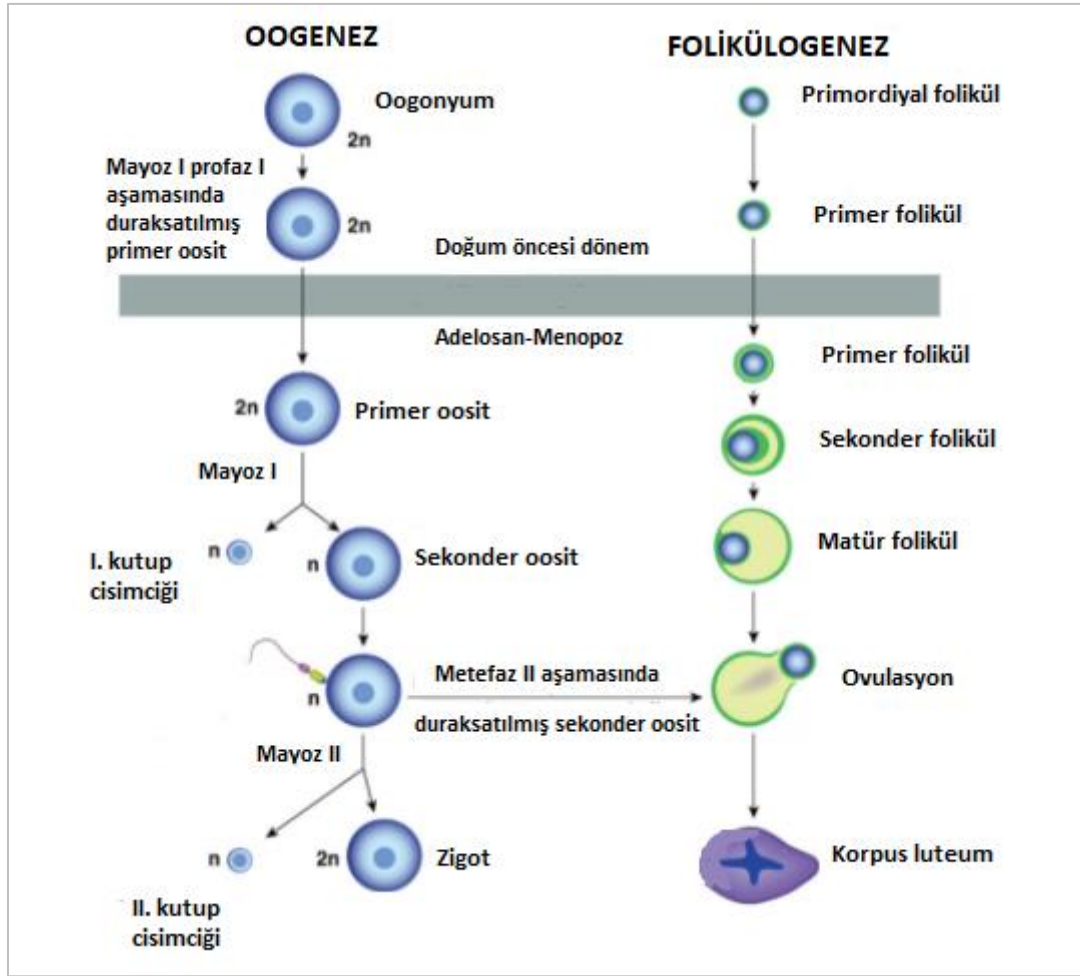
Oogonyumlar mitoz geçirirken bir kısmı da folikül hücrelerince salgılanan inhibitörler nedeniyle profaz evresinin diploten evresinde tutuklanır ve primordial folikül olarak beklemeleri sağlanır. Takip eden birkaç ay içinde oogonyumların sayısı hızla artar ve beşinci ayın sonunda en fazla (7 milyon) seviyesine ulaşır [59]. Bu sırada hücre ölümleri başlar ve birçok oogonyum ve primer oosit bozularak işlevini kaybeder. Yedinci ayda oogonyumların over korteksine yerleşmiş olanlarının dışındakiler dejenere olur. Geriye kalan primer oositlerin tümü mayoz-I’in profazına girer ve diploten evresinde tutuklanır. Primer oosit etrafındaki tek katlı yassı epitel ile birlikte primordiyal folikül adını alır [59]. Şekil 2.7’ de prenatal dönemdeki oogenezin gebelik döneminde ve doğum esnasındaki aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Prenatal dönemdeki oogenezin gebelik döneminde ve doğum esnasındaki aşamalarının şematik gösterimi [59]

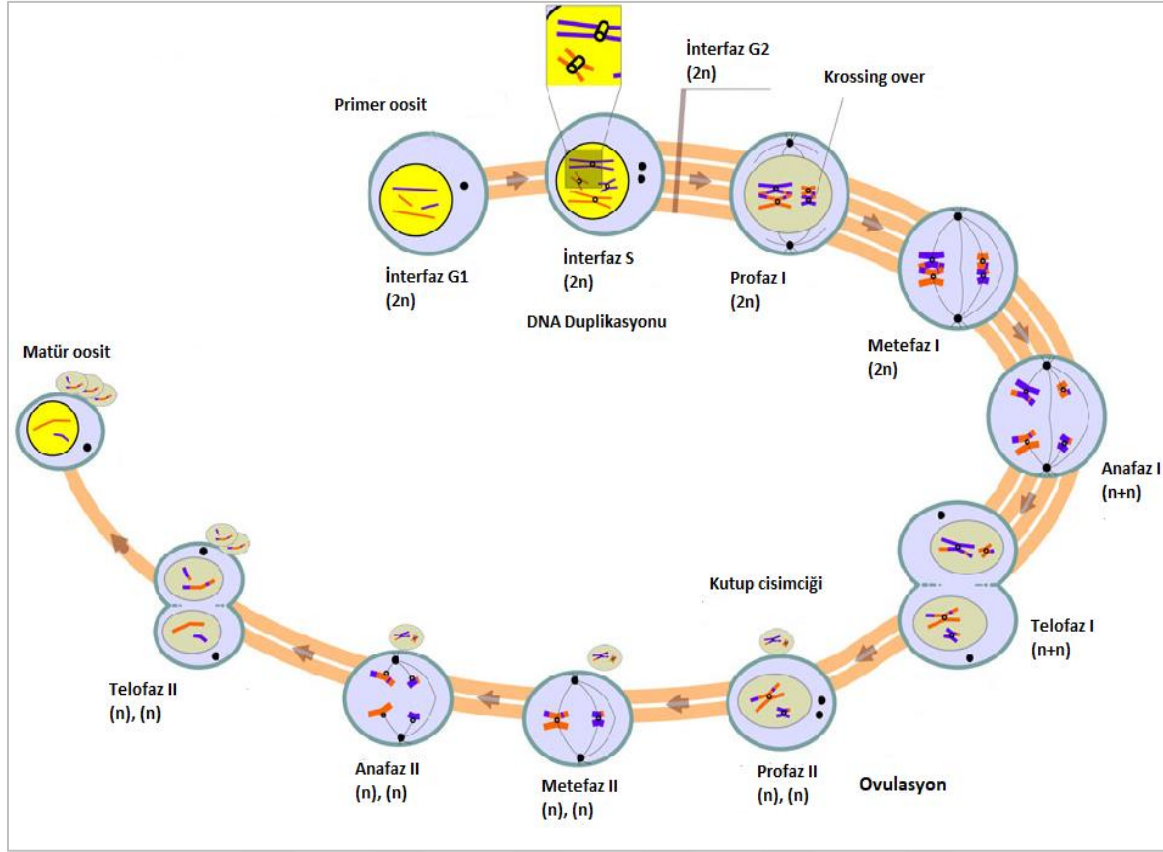
Postnatal dönemde yeni doğan kız çocuğunun over korteksinde 2 milyona yakın primordial folikül bulunmaktadır. Meydana gelen işlev kayıpları nedeniyle bu sayı puberteye kadar yaklaşık 400 000'e kadar geriler [54, 56]. Bu durum erkeklerin günlük ürettikleri milyonlarca sperm hücresinin yanında oldukça sönük kalır. Bunun sebebi dişilerdeki germ kök hücrelerinin yeniden tetiklenerek tekrar tekrar germ hücresi oluşturmamasıdır. Sonuç olarak oosit; sperme oranla nadir ama değerli bir üreme hücresidir [58].

Primer oositler puberteye kadar mayoz-I'in profazında tutuklanır. Bu durum folikül hücrelerinden salınan oosit olgunlaşmasını inhibe edici faktör (OMI) tarafından sağlanır. Puberte ile birlikte hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle her menstruel döngü başında 5-15 folikül gelişmeye başlar. Primordiyal foliküller sırasıyla primer, sekonder, graffian folikül aşamalarından geçerek olgun folikül halini alır. LH etkisiyle ovulasyona hazır folikül haline gelirler [59]. Şekil 2.8'da gösterildiği gibi oogenez ve folikülogenez birbirine bağımlı ve eş zamanlı gelişen olaylardır.



Şekil 2.8. Birbiriyle eş zamanlı gerçekleşen oogenez ve folikülogenezin şematik olarak gösterimi [60]

Folikülün içindeki I. Mayoz'un profaz evresinde tutuklu bulunan primer oosit gelişmeye başlar. Primer oositin olgun oosit aşamasına kadar geçirdiği genetik değişimler Şekil 2.9' de gösterilmiştir. Primer oosit öncelikle mayoz-I'i tamamlar. Her biri 23 çift kromozom ($2n$) içeren 2 yavru hücre oluşur. Oluşan yavru hücreler sitoplazmayı eşit paylaşmazlar. Yavru hücrelerden biri sitoplazmanın çok büyük kısmını alarak sekonder oositi diğeri çok az sitoplazma alarak diğer hücre birinci kutup cisimciğini oluşturur. Oluşan kutup cisimciği oositin hücre zarı ile *zona pellusida* arasındaki previtellin boşlukta kalır. Mayoz-I ovulasyondan hemen önce tamamlanır ve mayoz-II'ye ilerler. Bu sefer de ovulasyon öncesinde mayoz-II'nin metefaz aşamasında tutuklanır. Eğer oosit sperm ile döllenirse mayoz tamamlanır. Döllenme olmazsa oosit 24 saat içinde dejenere olur [61].



Şekil 2.9. Primer oositin olgun oosit aşamasına kadar geçirdiği genetik değişimlerin şematik gösterimi [62]

Gelişen foliküllerden biri seçilir ve dominant folikül haline gelir. Dominant folikül dışındaki gelişmeye başlayan diğer foliküller bozunmaya uğrar. Bu şekilde folikül sayısı menapoza kadar gittikçe azalır. Over korteksinde hiç folikül kalmadığı zaman menapoz gerçekleşir. Puberteden menapoza kadar ancak 400-500 folikül ovule olabilecek şansa sahip olur [56, 63]

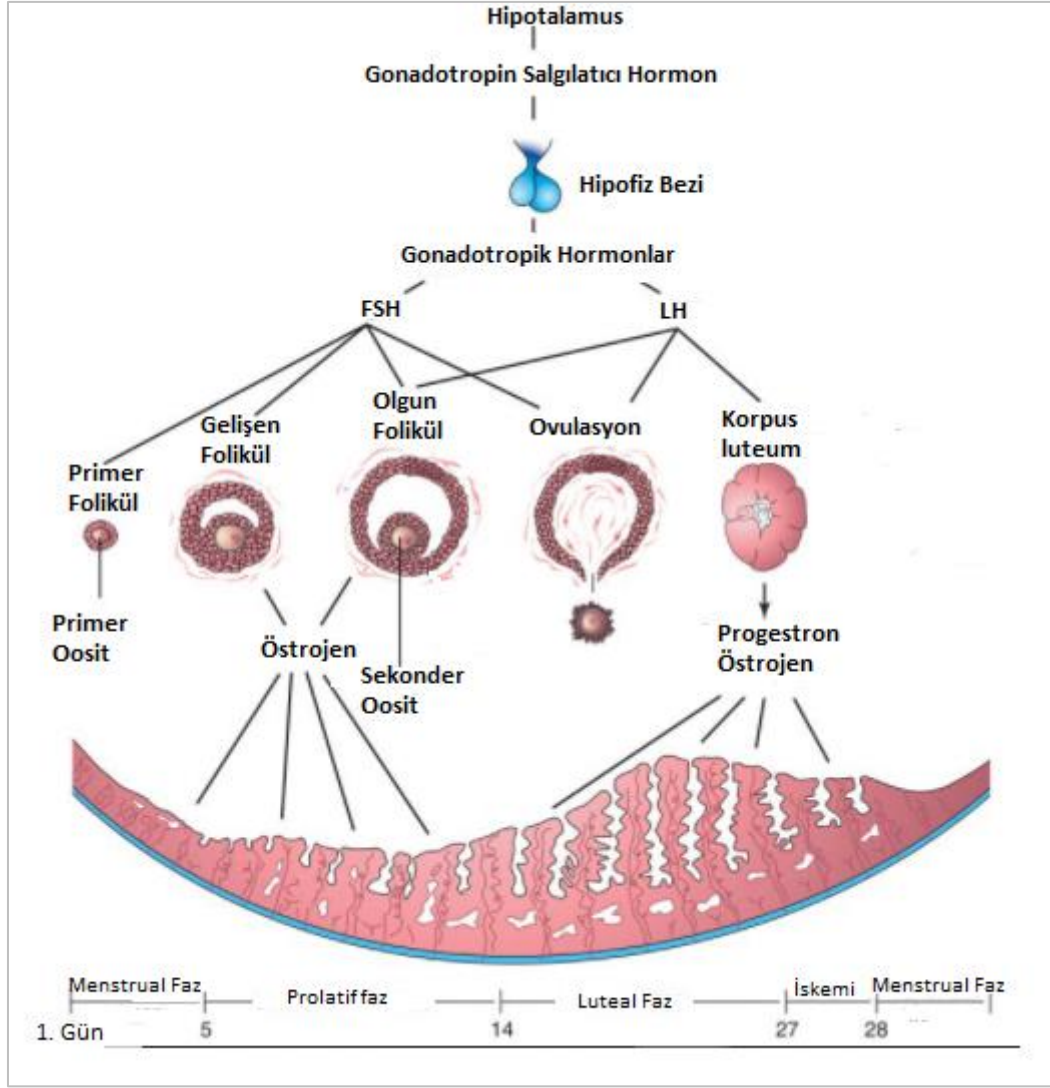
2.4.3. Overlerin hormonal kontrolü

Overlerdeki değişimlerin büyük kısmı, ön hipofizden salgılanan gonadotropik hormonlar ile kontrol edilir. Gonadotropik hormonlar tarafından uyarılmayan oositler inaktiftir. Puberte ile birlikte geribildirim mekanizmalarına sahip nöroendokrin bir yolak olan hipotalamus-hipofiz-adrenal aks (HPA aksı) aktive olur. Hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) sayesinde hipofiz bezinin ön lobundan FSH ve LH salgınır. Bu hormonlar menstrual döngünün kontrolünden sorumludur. Şekil 2.10'de hipotalmus, hipofiz bezi, over ve endometrium iletişimi şematik olarak gösterilmiştir. FSH foliküllerin gelişimini ve

sonrasında da östrojen salgılamasını sağlar. LH, mayoz bölünmede tutuklanan oositin mayozu tamamlamasını, ovulasyonu ve korpus luteumun oluşmasını tetikler [64, 65].

Folikül gelişiminde hipotalamustan salgılanan GnRH, hipofizden salgılanan FSH ve LH hormonlarının yanı sıra overlerde sentezlenen otokrin ve parakrin etkili hormon ve büyüme faktörleri rol alır. Bunlardan bazıları anti-Müllerian hormon (AMH), kemik morfogenetik protein 6 (BMP6), kemik morfogenetik protein 7 (BMP7), kemik morfogenetik protein 15 (BMP15), c-Kit, epidermal büyüme faktörü (EGF), büyüme farklılaştırma faktörü 9 (GDF9), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'dür [14, 65, 66]. Büyüme faktörlerinin bir kısmı oosit bir kısmı granüloza hücrelerinden salınır.

FSH oositin çevresindeki granüloza hücrelerinin olgunlaşmasını sağlar. Bu hücreler büyüme faktörlerinden GDF-9 etkisiyle daha da çoğalır. Olgunlaşan foliküldeki granüloza ve teka hücreleri östrojen salgılar. Bu sayede endometriumun proliferatif evreye girmesini, servikal mukusun incelmesini, LH salgılanmasını uyarır. Serum seviyesinde artmakta olan östrojen, menstrüel döngünün sonunda LH hormon salınımını uyarır. LH ovulasyonu ve korpus luteumdan progesteron salgılanmasını tetikler. Bu sayede endometrium mukozası embriyonun tutunabileceği evreye geçer. LH salınımı ile oosit olgunlaşması başlar ve serumda en üst seviyeye ulaştıktan yaklaşık 10-12 saat sonra ovulasyon gerçekleşir. LH ve progesteron, prostaglandinleri ve proteolitik enzimleri aktive ederek folikül duvarındaki kollajenin yıkılmasını, kümülüs hücre ekspansiyonunu sağlar [57, 67]. Ovulasyon ile atılan oosit metafaz-II aşamasında tutuklanır. Döllenme olursa mayoz kaldığı yerden devam eder ve tamamlanır. Döllenmez ise ovulasyondan sonraki dokuzuncu günde korpus luteum dejenere olarak korpus albicans halini alır. Bu sırada progesteron salınımı azaldığı için menstrüel kanama başlar [54, 56, 68].



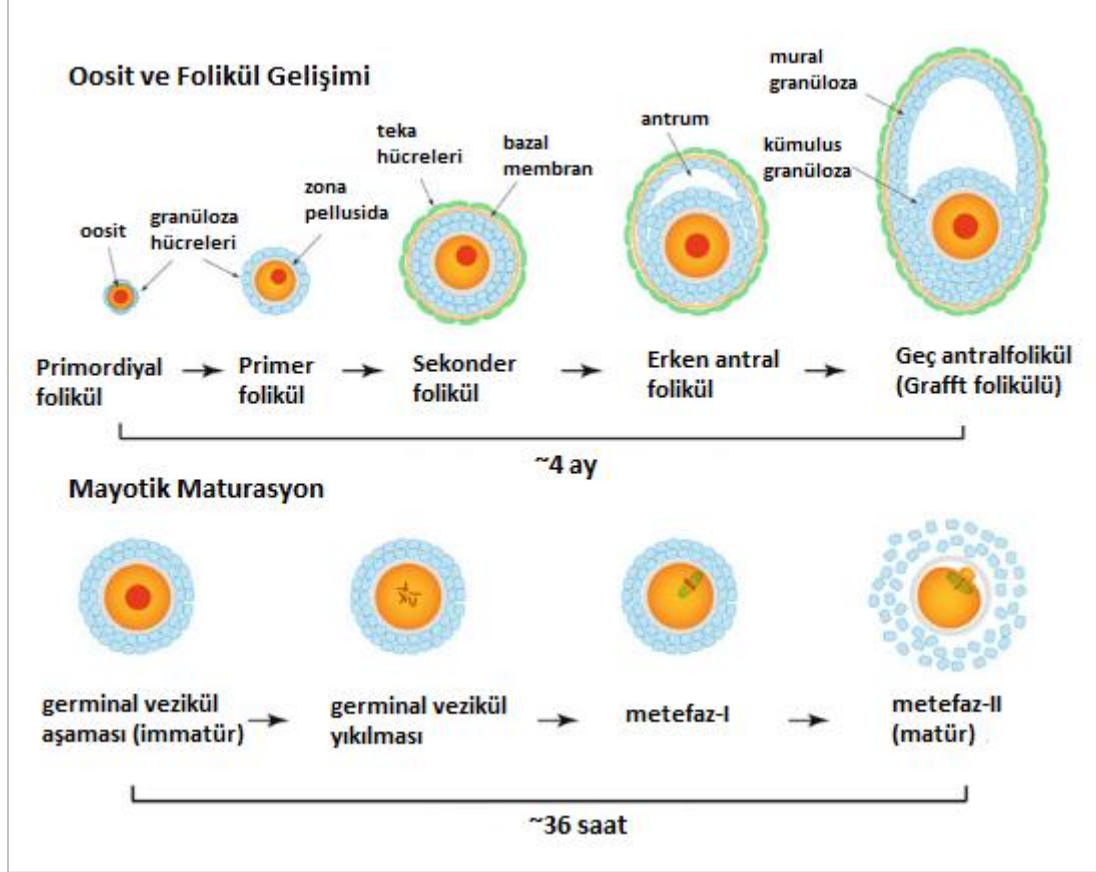
Şekil 2.10. Hipotalamus, hipofiz bezi, over ve endometrium iletişimin şematik gösterimi [69]

2.4.4. Oosit olgunlaşması

Mayoz bölünme gonad hücrelerinde görülen ve kromozom sayısının yarıya indirildiği özel bir hücre bölünmesidir. Oosit olgunlaşması mayoz bölünmenin Profaz-I aşamasıyla metefaz-II aşaması arasında tamamlanır. Olgunlaşma nüklear ve sitoplazmik olmak üzere ikiye ayrılır ancak süreçler birbirine bağımlı gerçekleşir [58]. Folikül gelişirken içerisinde büyüyen oositin olgunlaşması da eş zamanlı olarak gerçekleşir (Şekil 2.11).

Nüklear olgunlaşma; mayotik tutuklamanın kaldığı yerden devam edip ilk mayozun tamamlanması ardından kutup cisimciğinin atılması ve metefaz-II' de fertilizasyona kadar tekrar tutuklamanın oluşması süreçlerini içerir. Mayoz-I' in profazında bekleyen oositte

çekirdek zarı (germinal vezikül) henüz bozulmamıştır. Oosit olgunlaşmasında ilk olarak germinal vezikül yıkılır [58].



Şekil 2.11. Folikül ile oosit olgunlaşmasının eş zamanlı gelişiminin şematik gösterimi [58]

Gonadotropinlerin etkisiyle kümülüs hücrelerinde cAMP aktive olur. Artan cAMP, mitojen aktive edici protein kinazı (MAPK) aktive eder. Mayoz ilerlemeye başlar. cAMP seviyesindeki artış granüloza hücrelerinden steroid sentezini de artırır. Bu durum oosit olgunlaşması için gereklidir. Kümülüs hücrelerinde üretilen cAMP sıkı ara bağlantılardan oosite geçer ve bu sayede yüksek cAMP seviyesi ile mayotik tutuklanma devam ettirilir. LH seviyesindeki artış sıkı ara bağlantıları kapatarak cAMP geçişini engeller [70]. Bu sayede mayoz ilerlemeye başlar. Oositten salınan büyüme faktörleriyle tetiklenen gen yolları sayesinde mayoz tutuklandığı yerden tekrar başlar [71, 72]. Siklin B ve p34^{cdc} faktörleri aktive olur. Bu faktörlerin artması olgunlaşmayı düzenleyici faktörü (MPF) aktive ederek oositteki mayotik tutulmayı ortadan kaldırılır. MPF seviyesi germinal vezikülün yıkılması sırasında artar, metefaz-I'e kadar yüksek seviyede kalır ve sonrasında kaybolur. Metefaz-II'de tekrar yükselerek fertilizasyona kadar yüksek kalır [52].

MPF'nin yükselmesiyle çekirdek duvarı yıkılır ve iç iplikçikleri oluşmaya başlar. Kromozomlar kısalıp kalınlaşarak metafaz plağına doğru hareket ederler. Sonrasında kromozomların kutuplara çekilmesini asenkron yapılan sitoplazma bölünmesi izler. Mayoz-I' in sonunda çok az sitoplazma içeren kutup cisimciği ve neredeyse ana hücrenin tüm sitoplazmasını almış olan sekonder oosit oluşur. Hücre bölünmesi mayoz-II ile devam eder. Kısa bir interfaz aşamasından sonra kromozomlar tekrar metafaz plağına doğru ilerler ve bu aşamada tekrar tutulur. Tam bu aşamada ovulasyon meydana gelir [73].

Başarılı bir fertilizasyon için farklı hücrelerin birbirine bağımlı ve uyumlu şekilde çalışması gerekir. MPF proteini oosit olgunlaşmasında aktif rol alır. Mayozun tutulduğu yerden tekrar başlaması kinaz ve fosfatazların kontrolünde gerçekleşen fosforilasyon ve defosforilasyon olayları ile kontrol edilir. Mayoz-II'ye geçişle birlikte oositin sitoplazmasında sitozolik faktörler (CSF) birikmeye başlar. Metafaz-II geldiğinde bu artış tutuklamaya neden olur. Normal mitozda anafaz uyarıcı faktör (APF) etkisiyle metafazdan anafaza geçiş sağlanır. Fakat mayoz-II de artan progesteron seviyesi ve CFSler nedeniyle anafaza geçiş engellenir. Bu tutuklanma fertilizasyona kadar devam eder. Fertilizasyon gerçekleşirse CFS etkileri ortadan kalkar. Sitoplazmada oluşan Ca^{+2} dalgaları MPF' nin yıkılmasına ve sonunda mayoz-II' nin tamamlanmasına olanak sağlar. Ca^{+2} dalgaları oolemmının altında dizilmiş olan kortikal granüllerin parçalanmasıyla previtellin alanda oluşan tabaka sayesinde ikinci bir spermin oosit içine girmesi engellenir [74].

Sitoplazmik olgunlaşma ise sitoplazmanın içindeki organellerin sayısında ve yerleşiminde meydana gelen bir takım değişimleri, erken embriyonik dönem gelişimi için gerekli olan biyomoleküllerin sentezi, modifikasyonu ve depolanması gibi olayları içerir. Ovulasyon öncesinde oosit metabolizması aktif transkripsiyon ve translasyon aşamalarını içerir. Sitoplazmadaki mitokondrilerin sayısında dramatik bir artış söz konusu olur. Fertilizasyonda kritik görev alan kortikal granüller Golgi kompleksinde üretilerek sitoplazmanın granüllü bir yapı kazanmasına neden olur [73]. Kutup cisimciğinin atılmasıyla previtellin aralık genişler.

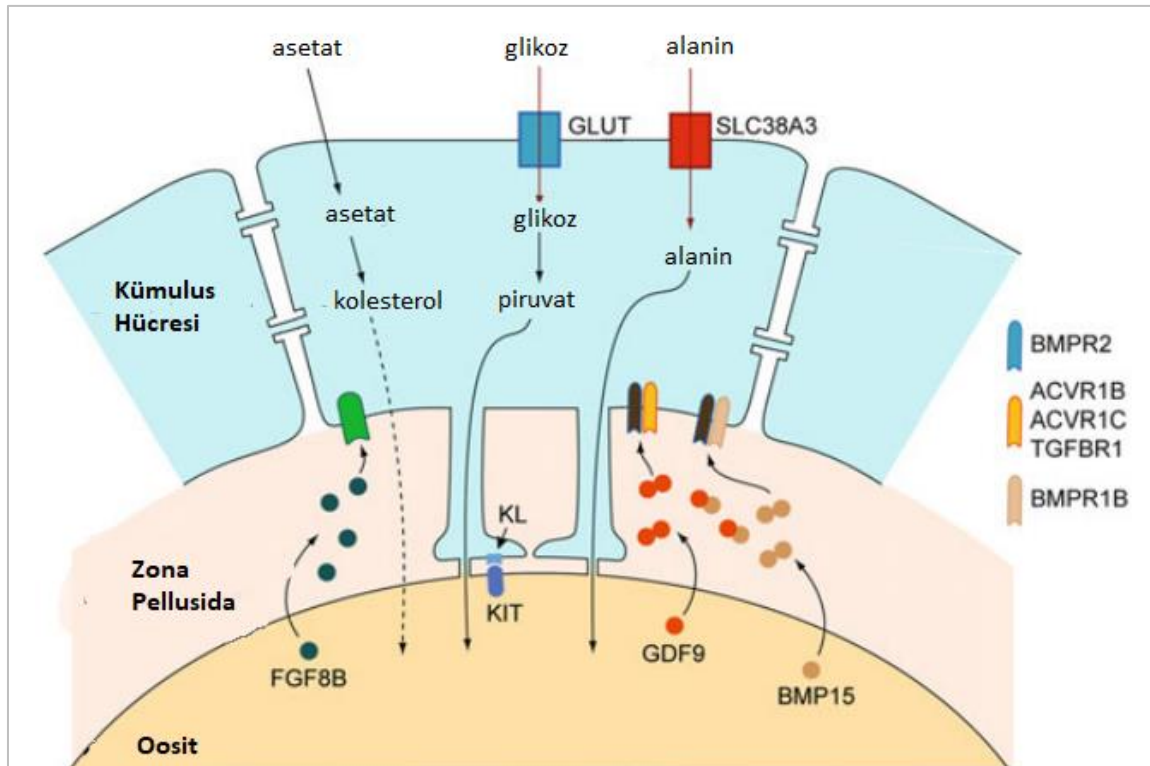
2.4.5. Oosit ve foliküler hücrelerin iletişimi

Granüloza hücreleri folikül içerisindeki yerleşim yerlerine göre iki gruba ayrılır. Folikülün dışına doğru yerleşim gösteren hücreler mural granüloza hücreleri adını alırken, oositi çevreleyenler kümülüs hücreleri adını alır. Foliküler hücreler ile oosit karşılıklı iletişim

Gelişimin erken döneminde oosit ile kümülüs hücreleri arasına *zona pellusida* girer. İki hücre grubunun fiziksel teması transzonal uzantılar adı verilen yapılarla sağlanır. Bunlar granüloza hücrelerinden oositin plazma membranına uzanan sitoplazmik çıkıntılardır. Çoğunluğu aktin omurgasından oluşurken bazılarında miktotübüllerden meydana gelmiştir. Transzonal uzantılar oositin plazma membranına temas ettiği alanda genellikle sıkı ara bağlantılar vardır. Bu hücre içi kanallar belli büyüklükteki moleküllerin geçişini sağlamaktadır [80]. Oositlerdeki sıkı ara bağlantıların ana bileşeni konneksin proteinleridir. Bu proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar oosit gelişiminin duraksamasına yol açmaktadır [81].

Diğer yandan oositin salgılanan parakrin faktörler (ODPFs) granüloza hücrelerinin birçok aktivitesini kontrol eder. Örneğin oositin salgılanan büyüme faktörü GDF-9 yokluğunda granüloza hücrelerinin çoğalarak sekonder folikülü oluşturmada başarısız olması gibi birçok anomaliler ortaya çıkar [82]. İki hücre grubu arasındaki bu iletişim primordial folikül aşamasında başlar ve oosit fertilize olana kadar devam eder.

Oosit kolesterol, pürivat, aminoasit gibi biyomolekülleri ve bu moleküllerin biyosentezinde görevli olan enzimleri kendisi sentezleyemez. Oosit bu bileşikleri sentezlemesi için kümülüs hücrelerini uyarır ve kümülüs hücrelerinin çoğalmasını tetikleyen büyüme faktörlerini sentezler. Biyomoleküllerin kümülüs hücrelerinde üretilip oosite aktarılmasının şematik gösterimi Şekil 2.13’de verilmiştir. Üretilen metabolitler transzonal uzantılar ile oosite iletilir. Oosit ATP kaynağı olarak kümülüs hücrelerine bağımlıdır. Hücre içi ATP’nin azalması mayotik iplikçiklerin oluşumunda bozuklukla ve azalmış gelişim kapasitesiyle koreledir [83]. Kolesterolün oositin sitoplazmasında birikmesi erken embriyo gelişimi için oldukça önemlidir. Çünkü gelişimin ilk safhalarında kolesterol üretimi yoktur [84]. Sitoplazmada biriken proteinler, mRNA’lar ve çeşitli organeller sayesinde döllenme ve erken embriyonik dönem gelişimi için gerekli destek sağlanmış olur. Oosit gelişimin sonunda biriken metabolitlerle en büyük insan hücresi haline gelir.



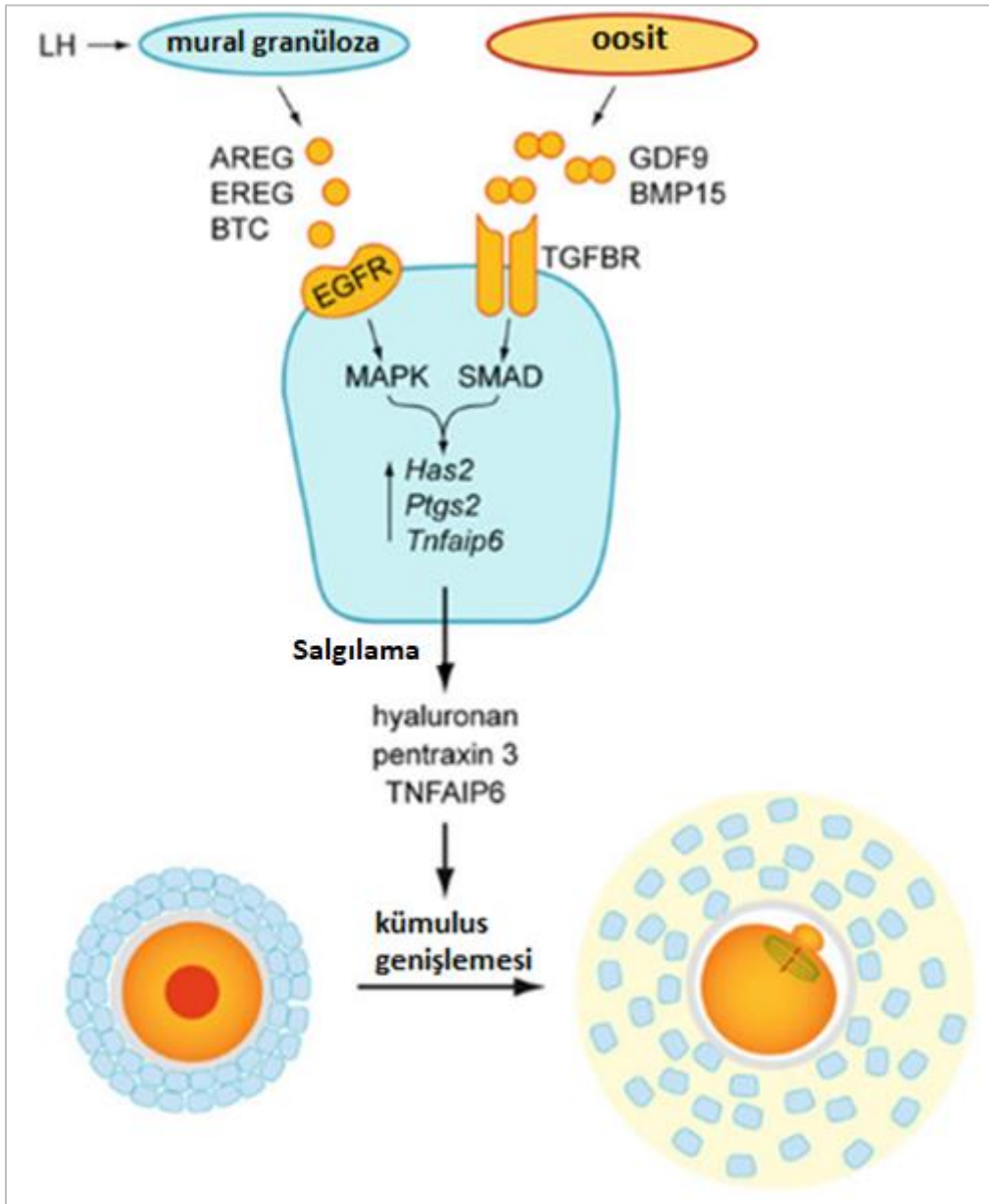
Şekil 2.13. Biyomoleküllerin kümülüs hücrelerinde üretilip oosite aktarılmasının şematik gösterimi [58]

Granüloza hücreleri östrojen sentezi yaparlar. Ayrıca granüloza hücreleri teka hücreleriyle birlikte steroid hormonların sentezini de yaparlar. Steroid hormon sentezi FSH ve LH hormonlarıyla yürütülen ve kolesterolün alınıp enzimlerle metabolize edilerek östrojene dönüştürüldüğü bir süreçtir. Östrojen hormonu folikülogenezi yönetir ve pro-apoptatik genleri baskılayarak kümülüs hücrelerinin dolayısıyla oositin canlı kalmasını sağlar [85, 86].

Mayotik tutuklama için gerekli olan sinyaller kümülüs hücrelerinden oosite geçer. Ovulasyon öncesindeki mayotik tutuklanma sürecinde kümülüs hücrelerinde üretilen cGMP sıkı ara bağlantılardan oosite geçer ve cAMPnin hidrolize olmasını engeller ve böylece yüksek cAMP seviyesi ile mayotik tutuklanma devam ettirilir [70].

Kümü lüs genişlemesi folikülogenezin kritik aşamalarından biridir. Folikü lün somatik ve germinal hücreleri, yükselen LH'a cevaben birlikte çalışarak kü mü lüs hücrelerinin genişlemesini ve mü sinleşmesini sağ larlar [58]. LH tetiklenmesiyle mü sinleşmiş kü mü lüs kompleksi içine gö mü lmüş olan oosit yumurta kanalına atılır. Bu mü sinleşme sayesinde kü mü lüs-oosit kompleksi kanalda çok daha rahat şekilde ilerler. Aynı zamanda fertilizasyon için spermin kü mü lüs katmanları arasından geçerek oosite ulaşmasını kolaylaştırır. Kü mü lüs

genişlemesi, kümülüs hücrelerinden salgılanan birtakım proteinler, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar sayesinde kümülüs hücrelerinin birbirinden uzaklaşmasıyla oluşur. Kümülüs matriksinin aktif bileşenleri, oositten salgılanan faktörler sayesinde kümülüs hücreleri tarafından üretilir (Şekil 2.14). Oositten salgılanan büyüme faktörlerinden GDF-9, BMP-15 bu yolakta görev alan birçok geni (*Has2*, *VCAN*, *Ptger2*, *PTGS2*, *Smad2/3*) aktive eder [87, 88]. Matriks bileşenleri bu sayede sentezlenir. Matriks bileşenlerinin sentezinde bir başarısızlık olduğunda üretkenlik düşmektedir [89].

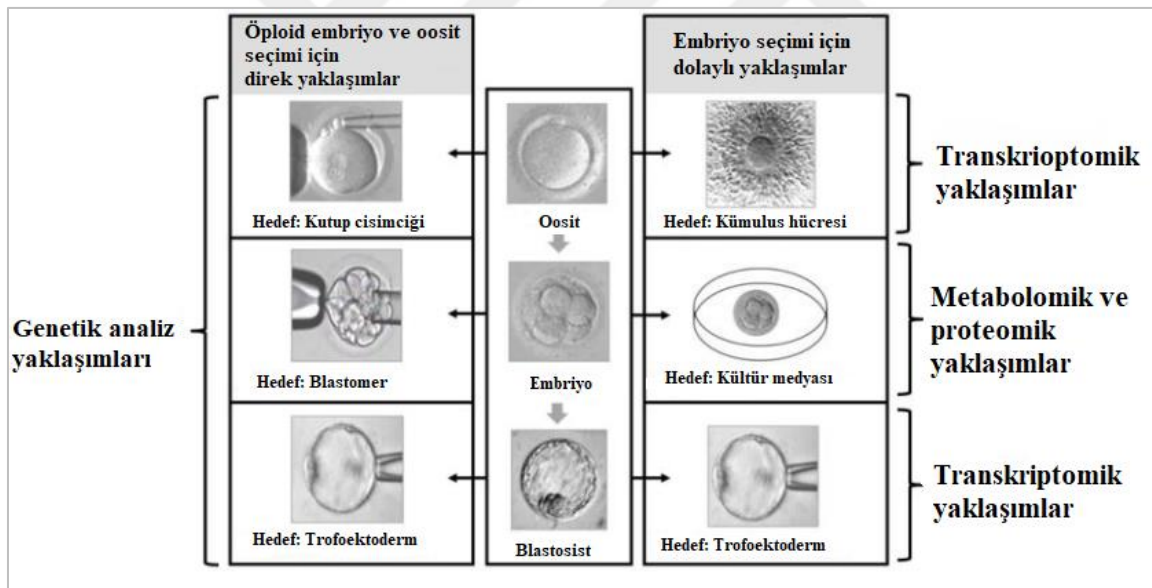


Şekil 2.14. Oosit-kümülüs hücreleri iletişimlari ve kümülüs genişlemesinin şematik gösterimi [58]

Doğrudan veya dolaylı aşamalar sayesinde oosit büyür, gelişir, olgunlaşır ve ovulasyonla yeni bir organizma oluşumunu başlatmak için hazırdır. Gelişimi tamamlanmış olan bir oosit-kümüls kompleksinde metefaz-II aşamasında tutuklanmış sekonder oosit, kutup cisimciği ve münleşmiş kümülüs hücreleri bulunur.

2.5. Moleküler Belirteçlerin Araştırıldığı Yeni Teknolojiler ve Teknikler

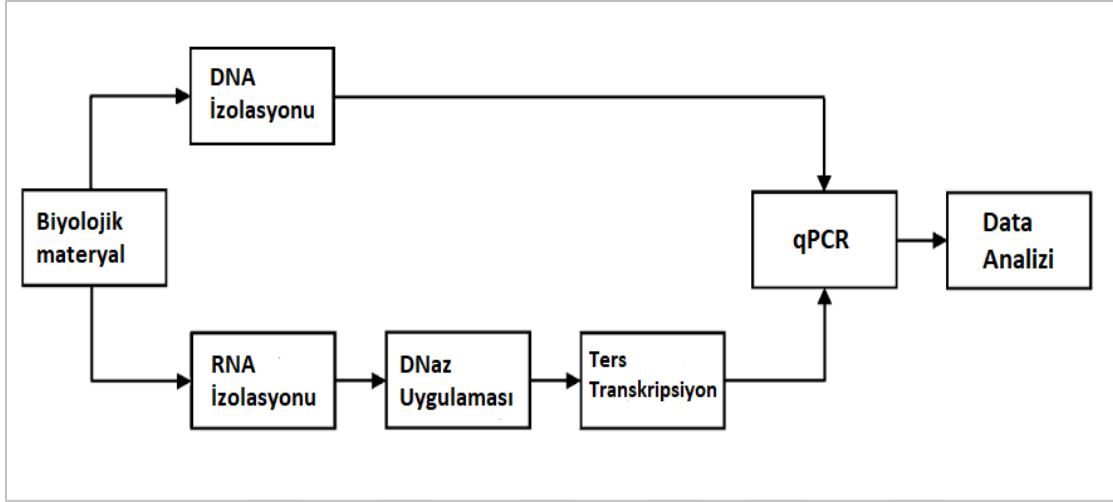
IVF teknolojilerinde ister tek başına ister morfolojik karakterlerle birlikte değerlendirilen ve girişimsel olmayan yeni bir embriyo değerlendirme sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) dizileri, tek nükleotid polimorfizm (SNP) dizileri, niceliksel eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), kümülüs hücrelerinin transkriptomatik analizi, embriyo kültür besiyerinin proteomik veya metabolamik analizi gibi moleküler tekniklerle bu ihtiyaca cevap aranmaktadır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Oosit ve embriyo değerlendirmesi için direkt/dolaylı yaklaşımlar [90]

Transkriptomik analizler sayesinde folikül, gamet ve embriyo hücrelerinde gen ifadesinin izlenmesini sağlar. Kümüls hücrelerinin transkriptomik değerlendirilmesiyle oosit olgunlaşması, döllenmesi, embriyo yeterliliği ve gebelik sonucu ile ilişkilendirilebilecek embriyo seçiminde geleneksel değerlendirme kriterlerine eklenebilecek girişimsel olmayan bir yöntem olarak dikkatleri üzerine çeken yeni araştırma alanıdır. Bir hücrenin içerdiği tüm RNA (mRNA, tRNA, rRNA, miRNA) molekülüne transkriptom adı verilir. Transkriptom analizlerin en kritik basamağı RNA izolasyon aşamasıdır. RNA izolasyonundan sonra tek

iplikli ve kararsız bir molekül olan RNA, daha kararlı ve çift iplikli molekül olan tamamlayıcı DNA (cDNA)'ya çevrilir. Sonrasında araştırılacak olan konuya özel olarak qPCR, RNA dizileme, mikroarray gibi yöntemlerle gen ifadesi değerlendirilebilir. Biyolojik materyalden DNA/RNA izolasyonu ve sonrasındaki aşamaların şematik olarak Şekil 2.16'de gösterilmiştir.



Şekil 2.16. Biyolojik materyalden DNA/ RNA analizinin şematik gösterimi

2.5.1. RNA izolasyonu

Bir memeli hücresindeki toplam RNA'nın, %80-90'ını rRNA (28S, 18S, 5S), %2,5-5'ini mRNA, %3-5'ini tRNA oluşturmaktadır [91]. Kararlı bir molekül olmayan RNA çalışılması zor bir materyaldir. Tüm dokularda, RNA'nın çevredeki birçok bakteri ve mantarda bulunan RNazların saldırısı altında parçalanmadan kalması çok zordur [92]. Bunun için RNA izolasyon protokollerinde güçlü bir RNaz inhibitörü ve protein denatüranları kullanılır [93]. RNA molekülü genomik DNAdan asidik çözeltiler kullanılarak ayrıştırılır [94]. Dolayısıyla örnekler hemen çalışılmayıp bir süre saklanacaksa yıkımı önlemek için ya inhibitör kullanılmalı ya da dondurulmalıdır [95].

Dokulardan RNA izolasyonu için kullanılan üç temel yaklaşım vardır. Organik çözücüler içerisinde hücre bileşenlerinin farklı çözünürlük gösterdiği metodlarla gerçekleştirilen ilk yöntem, örneğin katyonik deterjan olan guanidyum tiosiyonat (GTC) içerisinde lizis yapılmasına dayanır. Takip eden organik ayrıştırma ve en sonunda alkol ile çöktürülmesi ile işlem sonuçlanır. GTC endojen ribonükleazları inaktive eder. Organik çözücü olan

kloroform hücre lizolatı ile karışmayan çok iyi bir organik çözücüdür. Kloroform düzgün bir şekilde karıştırılıp ardından santrifüjlendiğinde iki tabakaya ayrılır. Üst tabaka nükleik asit içerir. Bu kısım temiz bir tüpe alınır ve izopropanol eklenir. Bu sayede RNA çöker. Tekrar yapılan santrifüj ile RNA tuzlarla birlikte çöker. Bu tuzlar sonrasında etanol kullanılarak RNAdan uzaklaştırılır. RNA/DNAdan arındırılmış su içerisinde çözülür [94].

Adsorpsiyon yöntemi, belirli yüzeylerdeki kaotropik tuzlarla RNA'nın bağlanmasına dayanır. Adsorpsiyon için geliştirilen yüzeyler polisitren- lateks, selülöz, glass fiber, materyal olabilir. Hedef örnek GTC içinde lizis yapıldıktan sonra adsorpsiyon materyaline maruz bırakılır. Bağlanmayı arttırmak için çokça çalkalanır. Bağlanma sonrası santrifüjlenerek kirleticiler uzaklaştırılır. Adsorbe RNA tekrar yıkanır. Sonra kaotropik tuz içermeyen tampon ile RNA serbest bırakılır [94].

Gradient yöntemi ise ilk geliştirilen metod olmasına rağmen ticari olarak geliştirilen kitlerde nadiren kullanılır. İlk önce hedef materyal GTC içerisinde çözülür, devamında sezyum trifloroasetat içerisinde denge gradient santrifüjü yapılır. Uygun yoğunlukta yakalanan RNA etanol ile çöktürülür [94]. Yöntem seçimi hedef materyalin kaynağına, miktarına, devamında yapılacak olan uygulamaların türüne ve laboratuvar ekipmanlarına bağlıdır. Günümüzde bu metodlardan yola çıkarak ticari olarak geliştirilmiş birçok kit söz konusudur.

Gen ifade çalışmalarının sonucunu etkileyecek en önemli basamak RNA izolasyonudur. İlerleyen basamakların sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi RNAnın konsantrasyonuna, saflığına ve bütünlüğüne bağlıdır.

RNAnın saflığı NanoDrop veya diğer hassas spektrofotometreler kullanılarak fotometrik olarak ölçülebilmektedir (Şekil 2.17). Bu değerlendirme yönteminde; optik yoğunluk (OD) farklı dalga boyları ile saptanmaktadır. Bu dalga boylarından 230 nm; farklı kontaminant maddelerin absorbans değerini, 260 nm; nükleik asit kontaminasyonunun absorbans değerini, 280 nm; protein-fenol kontaminasyonunun absorbans değerini işaret etmektedir. OD 260/280 oranı ise RNA saflığının belirlenmesi için kullanılır [96]. Bu oranın $\geq 1,80$ olması idealdir. Daha düşük çıkan değer protein, DNA gibi kirleticiler olduğunu gösterir. RNA örneğinin önerilen değer dışında çıkmış olması qPCR veya diğer ileri tetkikler için sorun oluşturmayabilir ama bu durumun bireysel olarak değerlendirilmesini gerektirir.



Şekil 2.17. NanoDrop spektrofotometre cihazı

RNA'nın bütünlüğü ise agaroz jel üzerinde değerlendirilir. Total RNA agaroz jel üzerinde 18S ve 28S bantlar gösterir. 28S/18S oranının 1,8-2 arasında olması beklenir [95]. Ne var ki total RNA'nın çok az miktarda elde edilebildiği örneklerde (oosit, kümülüs hücreleri gibi) bütünlük değerlendirilmesi yapılamayabilir [97]. Çünkü etkin bir değerlendirme için yaklaşık 200 ng/µl RNA'ya ihtiyaç vardır. Genellikle RNA izolasyonu yapılırken çalışılan örneğe DNaz muamelesi yapılarak DNA kontaminasyonu olasılığı yok edilir.

2.5.2. cDNA sentezi

Hedef materyalden elde edilen RNA, retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilebilir. Revers transkriptaz (RT) tek iplikli RNA'yı kalıp olarak kullanarak çift iplikli DNA molekülü sentezler. Bunun için RNA ve primer, RNA'nın sekonder yapısını denature etmek için ısıtılır, sonra hızlıca buz üzerine alınarak primer'in DNA'ya bağlanması sağlanır. Daha sonra reaksiyonun diğer bileşenleri (dNTPler, RNaz inhibitörü, revers transkriptaz ve tampon çözeltisi) reaksiyona eklenir. Termal cyclus içerisinde konularak transkripsiyon gerçekleşir. Son olarak ısıtılarak enzim inaktivasyonu sağlanır. Bu sayede cDNA elde edilmiş olur [98].

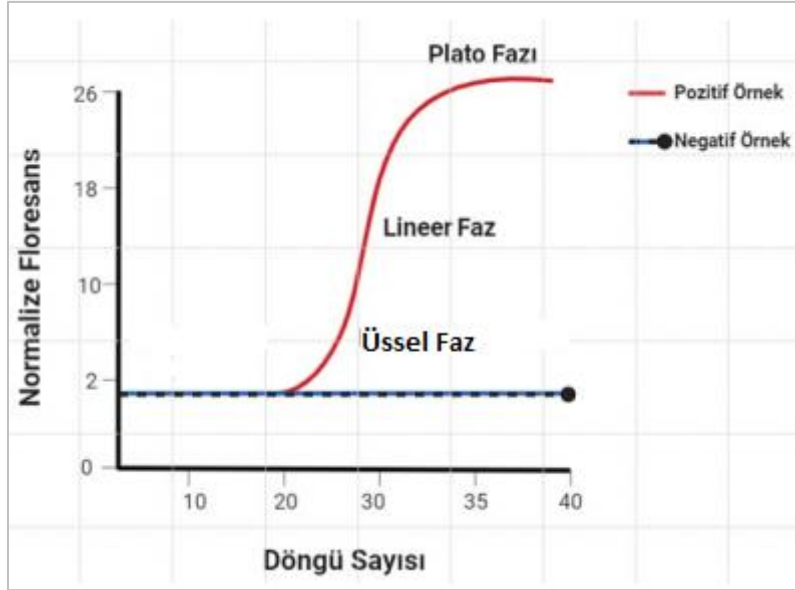
RT reaksiyonunda 3 farklı primer kullanılabilir. Bunlar oligo (dt) primerler, rastgele (heksamer) primerler, gene özel tasarlanmış primerlerdir. Oligo primerler yüksek kalitede RNA materyali mevcut ise tercih edilebilir. Çünkü polimerizasyonun 3'ucundan istenilen bölgenin sonuna kadar devamlılık göstermesi gerekir. Rastgele primerler fragmente RNA

örnekleri için önerilir. Bu primerler, hedef bölgedeki bazların mümkün olan her kombinasyonundan meydana gelen tek zincirli oligonükleotidlerdir. Az miktarda bulunan transkriptleri çoğaltmak için ise, ilgili gene özgü primerleri kullanmak daha akılcı olur [98].

2.5.3. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Kantitatif PCR-qPCR-)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) moleküler biyolojinin en güçlü teknolojisi olup DNA replikasyonunun *in-vitro* tasarlanmış halidir ve moleküler biyolojinin en yaygın kullanılan aracıdır [99]. Yüksek ısıda polimerizasyon yapan polimeraz enziminin (Taq polimeraz) *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilmesiyle nükleik asitlerin tüp içinde çoğaltılması tekniği olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmalarıyla 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür [100]. Spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primer tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesidir. Çift iplikli DNA'nın denatüre olması ($\sim 94^{\circ}\text{C}$), primerlerin bağlanması ($\sim 65\text{-}55^{\circ}\text{C}$) ve uzaması ($\sim 72^{\circ}\text{C}$) aşamalarını içerir. PCR'ın temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılacak DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon çözeltisi ve MgCl_2 'dür. Sentez yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup primerin serbest 3'-OH ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla fosfodiester bağlarının katalizi ile yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Geleneksel PCR'da çoğaltılan DNA miktarının tespiti ve miktarı PCR sonrası yapılan jel elektroforezi ile görüntülenip değerlendirilir.

Son yıllarda PCR teknolojisinin hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi ile eş zamanlı değerlendirmeler mümkün olmaktadır. qPCR ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılabilmektedir. Ürünlerin niteliksel ve niceliksel analizlerinde diziye özgün olmayan floresan boyalar ya da diziye özgün problardan yararlanır. Higuchi ve arkadaşları qPCR sistemlerini ilk geliştiren gruptur [101]. Başlangıç DNA/cDNA miktarının her PCR döngüsünün sonunda iki katına çıkması beklenir. Bu üssel artış bir plato aşamasına ulaşır. qPCR amplifikasyon görseli Şekil 2.18' de gösterilmiştir.



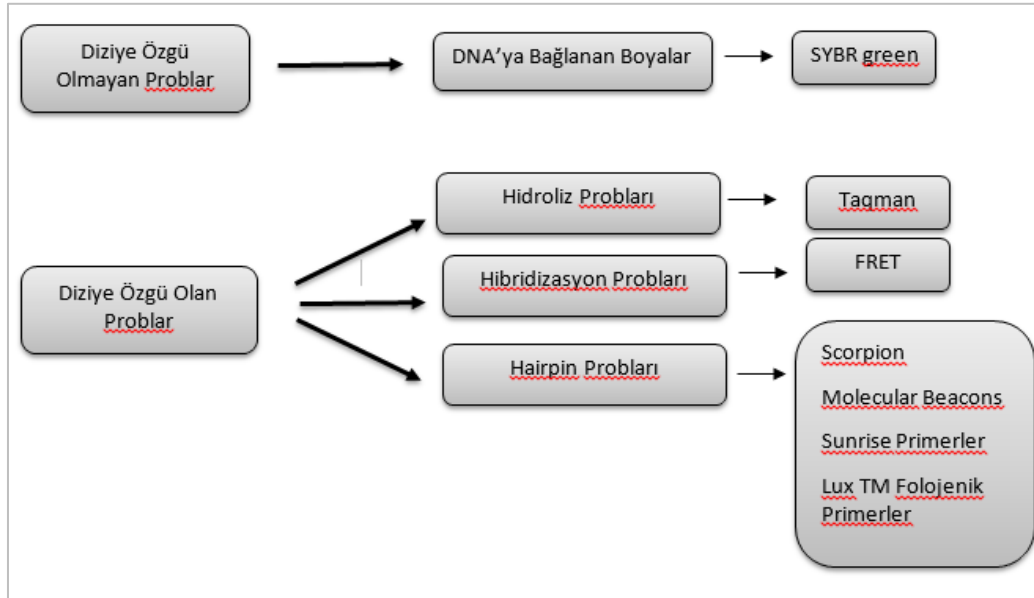
Şekil 2.18. qPCR amplifikasyon görseli [102]

qPCR tekniği reaksiyon tüpünün içerisinde çoğaltılan DNA miktarının reaksiyonla eş zamanlı olarak takip edilmesine olanak sağlar [103]. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. qPCR’ da PCR reaksiyonları esnasında oluşan örnekleri görünür kılan ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyalardır. Oluşan floresan ışımaya, sentezlenen DNA ile doğru orantılı olarak artar. Bu da miktar tayinine imkân vermektedir. 3 temel basamaktan oluşur (Şekil 2.18).

- Üssel Faz (Başlangıç Fazı): Ürün miktarı her döngüde örneklerin 2 katı kadar artar. Reaksiyon bileşenleri tam etkin ve tazedir. Reaksiyonun etkinliği tamdır ve %100 gerçekleşir.
- Lineer Faz (Doğrusal Faz): Reaksiyon ürünleri gittikçe tükenir, tazelikleri bozulur. Oluşan ürünler degrades olmaya başlar. Reaksiyon hızı düşer.
- Plato Faz (Durağan Faz): Reaksiyon ajanları tükenir ve durur. Yeni ürün oluşmaz. Oluşan ürünlerin degradasyonu artar. Bitiş noktası saptaması yapılır.

Herbir döngüde açığa çıkan floresan miktarı kaydedilir. PCR ürünündeki ilk anlamlı artış (üssel aşamaya geçiş) görüntülenebilir. Bu artışın gözlemlendiği ilk döngü başlangıç materyalinin miktarı ile doğru orantılıdır. Başlangıçtaki DNA miktarı ne kadar fazla ise ilk anlamlı artış o kadar erken döngüde olacaktır. Çoğaltılacak hedef dizilerin tespit edilmesi için çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Problar DNA/cDNA üzerinde tanımlanmak istenilen baz

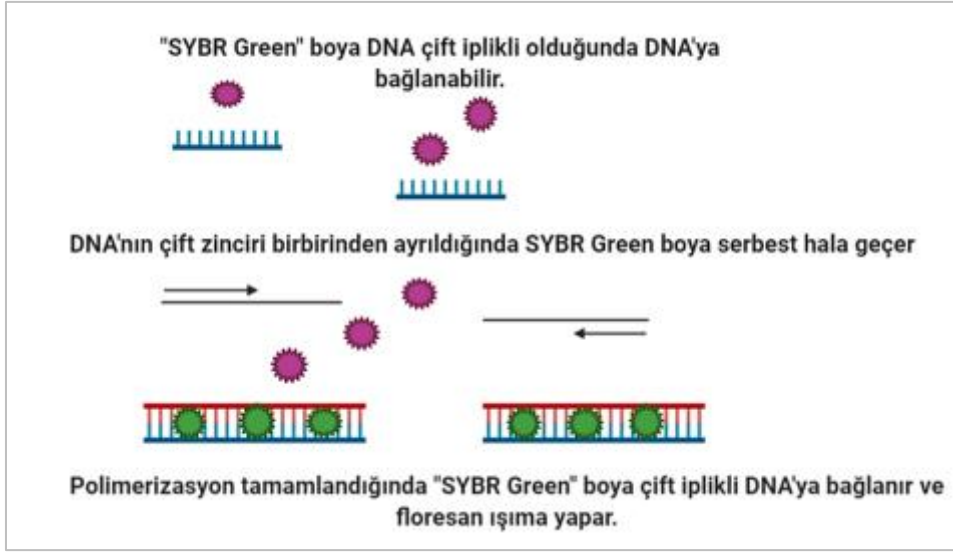
dizisine uygun olarak tasarlanmış, kimyasal ya da radyoaktif olarak işaretlenmiş olan tek zincirli oligonükleotidlerdir. Hedef bölgeyi tespit etmek için, diziye özgü ya da diziye özgü olmayan probler tasarlanabilir [102]. qPCR’da kullanılan prob çeşitleri Şekil 2.19’de gösterilmiştir.



Şekil 2.19. qPCR’da kullanılan prob çeşitleri

Diziye özgü olmayan probler

DNA’ya bağlanan florojenik boyalar kullanılır. Bu yöntem hedef dizideki varyasyonları veya SNP’leri tespit edemez. Ucuz ve hassas oluşundan dolayı çoklukla tercih edilmektedir. SYBR Green, YO-PRO, BEBO gibi boyalar kullanılır. Bu boyalar çift sarmal DNA’ya bağlandığı zaman kuvvetli bir ışıma yapar. Artan DNA miktarına bağlı olarak ortaya çıkan floresan miktarı da artar. Ancak diziye özel bir bağlanma yapmadığı için spesifik değildir. Kantifikasyon ve karakterizasyon erime eğrileri ile saptanır. Primerlerin dimer oluşturmaması için dikkatli tasarlanması gerekir [102]. SYBR Green problemlerin çalışma prensibi Şekil 2.20’de şematik olarak gösterilmiştir.

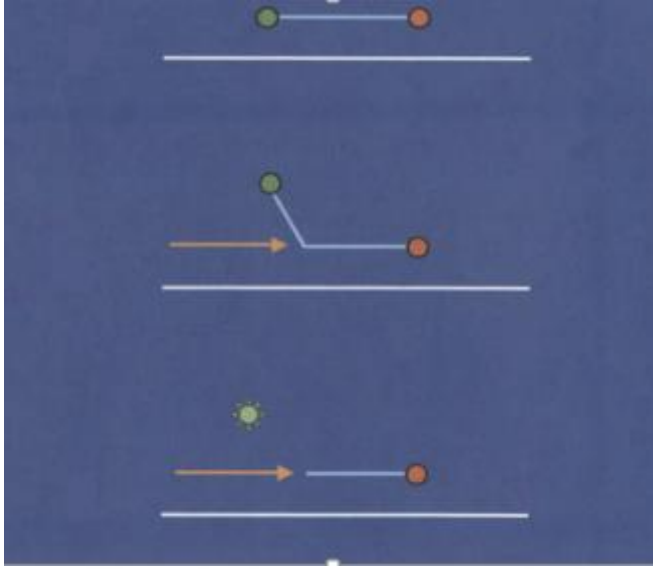


Şekil 2.20. SYBR Green problemin çalışma prensibinin şematik gösterimi [104]

Diziye özgü problemler

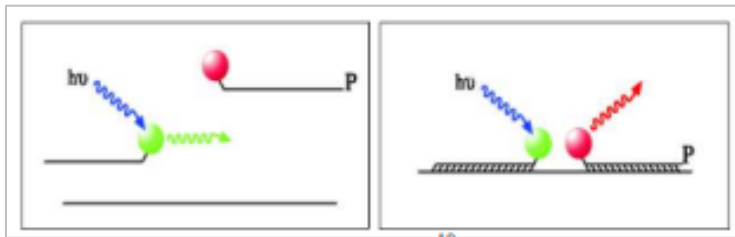
Farklı moleküler yapı ve boyalara sahip olsalar da bu problemlerin çalışma prensibi çoğaltılan DNA içerisinde sadece hedef diziye özgü bağlanma yapmasıdır. Dolayısıyla tespit edilen floresan ışıma hedef diziye aittir. Bunlar Hidroliz problemleri, Hibridizasyon problemleri ve Hairpin (saç tokası) problemleridir [102].

Hidroliz problemlerinde en yaygın kullanılan Taqman problemleridir. Hedeflenen diziye özel sentezlenen probun 5' ucunda 'reporter' boya ve 3' ucunda 'quencher' bulunur. Quencher 5' uçtaki reporter boyanın ışımmasını engeller. PCR amplifikasyonu esnasında önce DNA'ya Taqman problemleri bağlanır. Sonrasında PCR karışımına eklenen primerler bağlanır ve polimerizasyon başlar. DNA polimeraz 5' ekzonükleaz aktivitesi ile Taqman probu 5' ucundan yıkmaya başlar. Bu sayede serbest kalan reporter boya floresan ışıma yapar. Her bir döngüde hedef dizi çoğaltılırken floresan ışıma da doğru orantılı olarak artar [102]. Taqman problemlerin çalışma prensibi Şekil 2.21'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.21. Taqman probunun çalışma prensibinin şematik gösterimi [105]

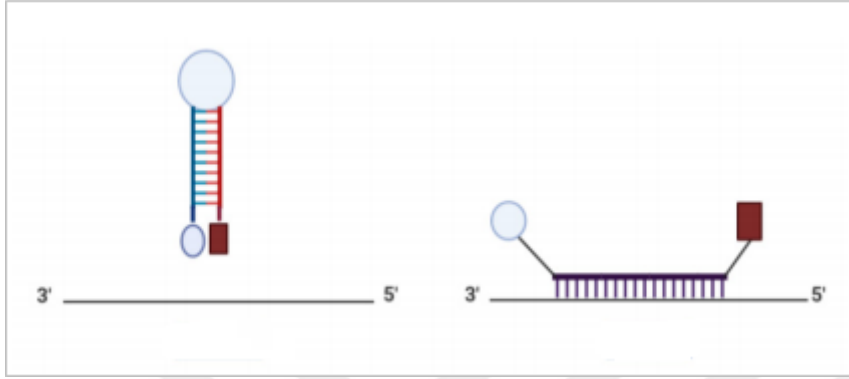
Hibridizasyon probaları LightCycler® PCR cihazlarında kullanılmak üzere Roche tarafından geliştirilmiştir [106]. Bu teknikte iki farklı prob tasarlanmıştır. Birisinin 3' ucunda floresan işaretli boya, diğerinin 5' ucunda alıcı boya bulunur. Amplifikasyon esnasında her iki prob hedef dizilere ters ipliklerden bağlanıp polimerizasyon ile birbirlerine doğru yaklaştıkça bir enerji yayılımı olur ve ışımaya yapar. Enerji verici boyadan alıcı boyaya transfer olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Bu enerji transferi esnasında açığa çıkan floresan ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artar[107]. FRET probunun çalışma prensibi Şekil 2.22'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.22. FRET probunun çalışma prensibinin şematik gösterimi [108]

Hairpin probalarının moleküler yapısı bir saç tokasını andırır. Saç tokasının 5' ucunda florofor, 3' ucunda quencher boya bulunan ters terminal tekrarlar taşıyan dizilerdir. Her ikisinin arasında hedef diziyi tamamlayıcı olan nükleotid dizisi bulunur. Prob hedef diziyeye yaklaştığında konformasyonu değişir. Hedef diziyeye bağlandığında saç tokası açılır ve serbest kalan florofor boya ışımaya yapar. Bu ışımaya hedef dizi miktarıyla doğru orantılıdır [109]. En

çok SNP çalışmalarında ve genetik taramada tercih edilir. Prob tasarımı en önemli aşamadır. Uygun sıcaklık gibi şartlar sağlanamazsa probun konformasyonu değişmeyeceği için hedef dizi mevcut olsa bile ışıma oluşmayabilir [110]. Hairpin problemlerin çalışma prensibi Şekil 2.23’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.23. Hairpin problemlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi [109]

Kurulan her bir deneyde reaktiflerin kontaminasyonunu kontrol etmek için kalıp DNA eklenmeyen bir kuyu da paralel olarak çalışılmalıdır. Eğer bu örnekte herhangi bir çoğalma gözlenirse reaktifler veya çevrenin kontamine olduğunu gösterir. Ayrıca qPCR sonuçlarının kesinliği için biyolojik ve teknik tekrarlarının yapılması önemlidir.

Floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği noktaya eşik döngüsü (Ct veya Cp) denir. Ct değeri sistemin floresandaki artışı fark ettiği aşamadır. Primer seti ya da prob seti için bütün PCR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması gerekir. Çalışmanın güvenle yapılabilmesi için primer/probların tasarımı çok önemlidir. Spesifik ve yüksek verimli olmalı ve primer dimer oluşturmamalıdır. Erime sıcaklığı grafiklerinden bakılarak spesifik olmayan bağlanmalar, primer dimer oluşumlarını saptamak mümkündür [110].

Normalizasyon için çalışılacak olan doku/ organ için uygun referans gen seçilmelidir. Referans gen çalışılan dokularda değişkenlik göstermemeli, en stabil olan minimum sayıda gen kullanılmalıdır. Çalışılan dokuya özgül, ifade seviyesi değişmeyen tek bir referans gen tanımlamak zor olduğu için birden fazla gen kullanarak geometrik ortalama alınması daha doğru olmaktadır [111].

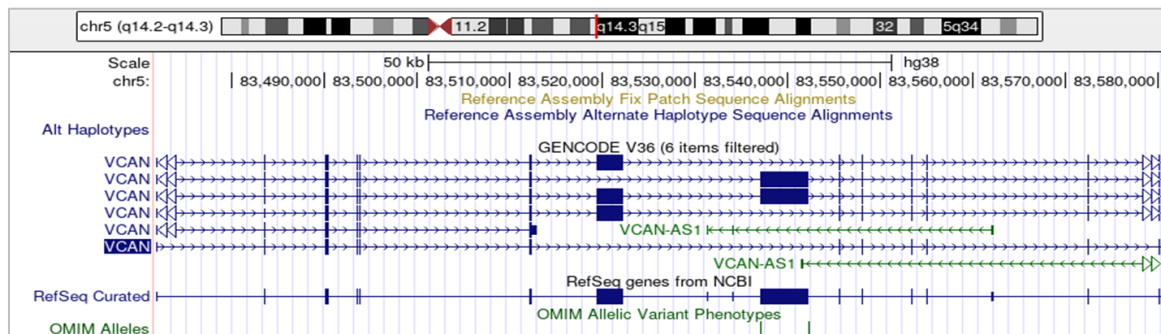
PCR çalışmalarını değerlendirmek için genel olarak iki farklı metod kullanılır. Bunlar mutlak miktar tayini (absolute quantification) ve göreceli miktar tayini (relative

quantification) dir. Mutlak miktar tayininde PCR sinyalleri oluşturulan standart bir eğri ile ilişkilendirilerek transkriptin kopya sayısını belirler. Göreceli miktar tayininde ise belirlenen bir referans gruba göre hedef genin ifadesindeki değişiklikler değerlendirilir [112]. qPCR ile gen ifadesindeki göreceli değişiklikleri belirlemek için denklemler ve doğruluğu test edilmesi gereken varsayımlara ihtiyaç duyulur. Bu verilerin analizinde yaygın olarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılmaktadır [110, 113]. Bu metod bir kalibratör yardımı ile hedef genin ve referans genin karşılaştırılması yapılarak gen ifade seviyelerinin aritmetik bir formülle hesaplanması temeline dayanır. Hedef genin referans gen ile normalizasyonu için reaksiyonun etkinliği belirlenmeli ve genler arasındaki Ct değerlerine dayalı farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır [114].

2.6. Çalışmada Araştırılan Genler

Yaptığımız bu çalışmada iyi ve zayıf kaliteli morfolojiye sahip embriyoların kümülüs hücrelerindeki *VCAN*, *PTGS2*, *ITPKA* genlerinin ifade seviyeleri araştırılmıştır.

Versikan çeşitli insan dokularında bulunan moleküler ağırlığı 1000 kDa'dan fazla olan büyük bir kondrin sülfat proteoglikandır [115]. *VCAN* geni tarafından kodlanır. 5. kromozomun kısa kolunda (5q14.3) yer alır ve 90-100 kb dan oluşan 15 ekzondan oluşur [116]. *VCAN* geninin haritası Şekil 2.24'de gösterilmiştir. Zimmermann ve Ruoslahti tarafından ilk kez 1989 yılında fibroblastlardan elde edilen çekirdek proteinini klonlayıp dizilemişlerdir [117].



Şekil 2.24. *VCAN* geninin haritası [118]

Versikan ayrıca kondroitin sülfat proteoglikan çekirdek proteini 2 veya kondroitin sülfat proteoglikan 2 (CSPG2) ve PG-M olarak da bilinir. Bu proteoglikanlar, homolog bir küresel N-terminali, C-terminali ve glikozaminoglikan (GAG) bağlanma bölgelerini taşır. qPCR,

northern blot analizi ve cDNA dizilemesi göstermiştir ki; versikan mRNAsı farklı splicing modellemesi ile V0, V1, V2, V3, V4 olmak üzere 5 farklı izoform oluşturmaktadır [119]. Dizi analizleri izoformlar arasındaki yapısal farklılığın GAG bağlanma bölgesini kodlayan orta kısımlardan kaynaklandığını göstermiştir. Ana form olan V0, GAG- α ve GAG- β domainlerini içerir. V1 izoformu sadece GAG- β domaini taşıırken, V2 izoformu GAG- α domaini içerir. V3 izoformu herhangi bir GAG bağlanma domaininden yoksundur. V4 formu ise GAG- β domaininin sadece bir parçasına sahiptir. Farklı doku tiplerinde farklı izoformlar ifade edilmektedir [119].

GAG domainleri versikan proteininin merkez domaini olup tekrarlayan glikozaminoglikan ünitelerinden oluşur. Proteinoglikanların negatif yükü sayesinde pozitif yüklü olan büyüme faktörleri, sitokin ve kemokinlere bağlanırlar [120]. Hücre dışı matriksteki ya da hücre yüzeyindeki bu etkileşimler bu faktörlerin sabit bir formda kalmasını ve proteolitik aktiviteden korunmasını sağlar.

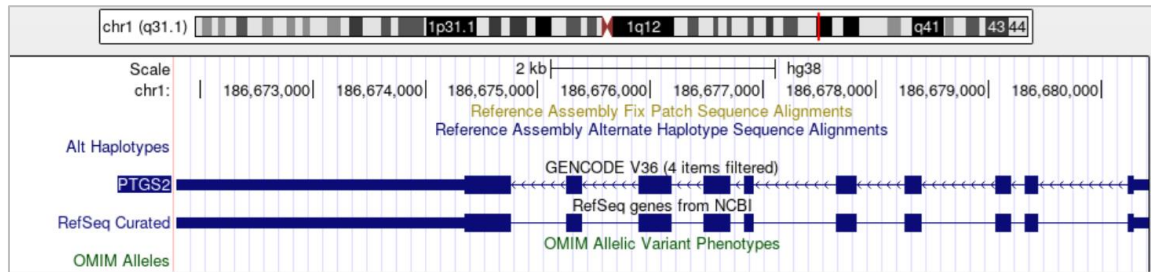
N-terminal (G1) globüler domaini, hyaluronan bağlanma özelliklerine sahiptir ve iki bağlantı modülünden oluşur. Versikan proteinini N-terminal ucu hyaluronan ile bağlanarak hücre dışı matriksin bütünlüğünün korunmasında önemli role sahiptir [120].

C-Terminal (G3) globüler domaini bir veya iki adet epidermal büyüme faktör (EGF) tekrarı, C tipi lektin alanı ve CRP-benzeri bölgeden oluşur [121]. G-3 domaini de hücre dışı matriksteki çeşitli moleküllerle etkileşime girer. Bu önemli ailelerden biri tanasin ailesidir. Tanasinler ise integrinler, hücre adezyon molekülleri gibi bir çok hücre reseptörle etkileşime girer [122]. Versikan geninin ifadesi klasik bir TATA kutusu taşıyan bir promoter ile düzenlenir. Kodladığı protein ekstraselüler matriksin bileşenlerinden biri olup hücre adezyonu, çoğalması, göçü, anjiyogenez, doku gelişimi ve onarımında [123] rol oynar. Embriyonik gelişim hücre dışı matriksin yeniden düzenlendiği dinamik bir süreçtir. Versikan hyaluronan ile kompleks oluşturan bir kondrin sülfat proteoglikan olup, embriyoların geçici matriksinde yaygın olarak bulunur [123]. Ayrıca inflamatuvar lökositlerin yüzeyleriyle girdiği etkileşimler ile enflamasyonda kilit rol oynar [124]. Meme, beyin, over, gastrointestinal, prostat dokularındaki tümörlerde artmış versikan ifadesi gözlenmiştir [120, 125, 126].

Prostaglandin-endoperoxit sentetaz (*PTGS*) prostoglandin biyosentezinde yer alan bir anahtar enzimdir. *PTGS1* ve *PTGS2* olmak üzere insanda iki formu vardır. Siklojenaz-2 (*COX-2*) olarak da bilinir. Araşidonik asidin, inflamasyonda ifade edilen prostaglandinlere dönüşümünde görev alırlar. Bu enzimlerin tersiyer ve kuarterner yapıları çok benzerdir. Monotopik membran proteinleridir. Membran bağlayıcı domainleri hidrofobik aminoasit içeren amfipatik α -heliks domaininden oluşur ve membranın tek tarafında yer alır. Her iki enzim de iki ardışık kimyasal reaksiyonu gerçekleştiren iki işlevli enzimdir. Hem siklooksijenaz hem de peroksidaz aktif siteleri enzimin katalitik domaininde yer alır [127].

PTGS2 (*COX-2*) geni her biri 70 kD ağırlığında olan homodimerden oluşmuştur. Her alt ünite üç farklı yapısal domain içerir. Bunlar; N-terminal ucundaki epidermal büyüme faktör domaini, α -heliks membran bağlayıcı kısım, C-terminal ucundaki katalitik domaininden oluşur [128].

PTGS2 geni prostoglandin biyosentezinde yer alan anahtar enzimi kodlar. 1991 yılında Danial Simmons laboratuvarında keşfedilmiştir [129]. Birinci kromozomun kısa kolunda (1q31.1) yer alır (Şekil 2.25). Yaklaşık 8,3 kb büyüklüğünde olup 10 ekzondan oluşur [130].



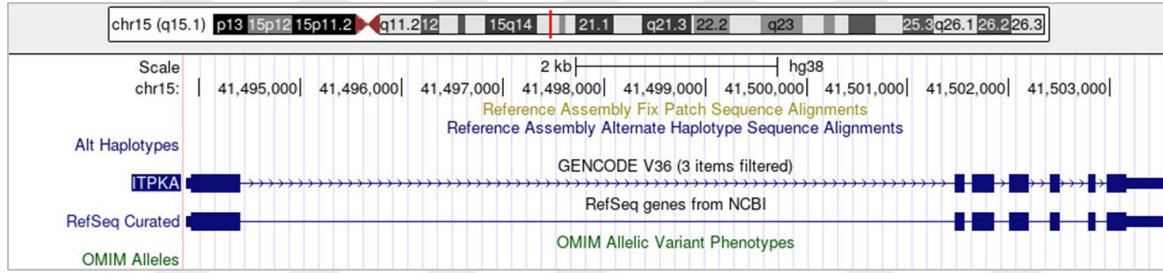
Şekil 2.25. *PTGS2* geninin haritası [131]

PTGS2 geninin ifadesi fibroblastlarda [132], monositlerde [133], over foliküllerinde [134] büyüme faktörlerine, hormonlara, sitokininlere cevap olarak çok hızlı artıp, sonrasında enzim seviyesinin hızla düştüğü gözlenmiştir. *PTGS2* geninin artmış gen ifadesi üreme sisteminin çeşitli aşamalarında da söz konusudur. Koryonik tabakada, amniyon epitelinde, sinsityoblastlarda ve plasentada bu genin varlığı tespit edilmiştir [135]. *PTGS2* inflamasyon sistemde de görev alır. Lökositlerde de varlığı gösterilmiştir.

İnositol-trifosfat 3-kinaz A (*ITPKA*) inositolfosfat metabolizmasında rol oynayan üç enzimden biridir. Üç izoformun da çok sıkı korunmuş C-terminal domaini ve bulundukları

dokulara göre farklılık gösteren N-terminal domaini bulunur. Bu enzimler ikincil haberci olan inositol 1, 4, 5-trifosfatı fosforile ederek inositol-4P üretirler. İnositol tri fosfat hem hücre içi kalsiyumu hem de dolaylı olarak kalsiyum girişini uyararak bir ikincil habercidir [136]. *ITPKA* enzimi, inositol poli-fosfat kinaz enzim ailesinin bir üyesi olup hücre sinyal mekanizmasında etkin rol oynayan inositoltrifosfat seviyesini düzenler. Hem kalsiyum/kalmodulin hem de protein fosforilasyon mekanizmaları aktivitesini kontrol eder.

ITPKA 15. kromozonun kısa kolunda (15q15.1) yer alır (Şekil 2.26). Yaklaşık 9,7 kb büyüklüğünde olup 7 ekzondan oluşur [137]. Takazawa ve arkadaşları tarafından ilk kez 1990 yılında insan beyininin hippokampus hücrelerinden izole edilip, klonlanmış ve dizilenmiştir [138].



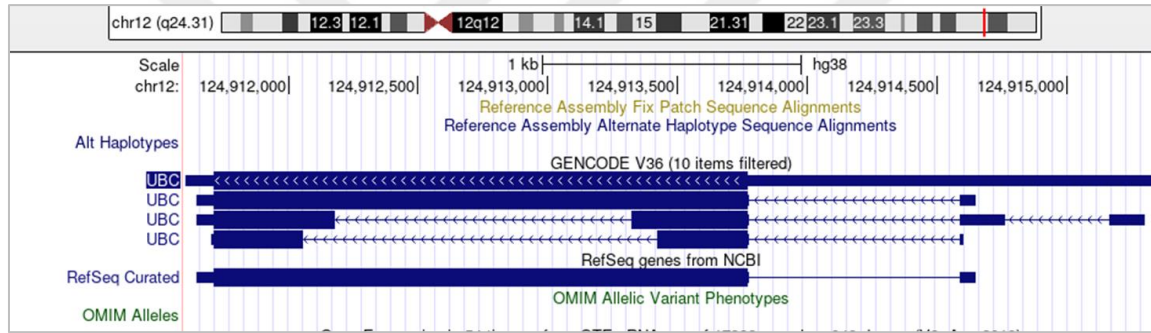
Şekil 2.26. *ITPKA* geninin haritası [139]

ITPKA geni beynin hippokampus bölgesindeki nöronlarda yoğun olarak görülmüştür [140]. Aynı zamanda testislerde ifade edildiği gösterilmiştir [141]. Normalde nöral genlerin ifadesi nöral olmayan dokularda baskılanmış halde bulunur. Bunun yanında birçok tümör hücresinde bu genlerin fazla ifadelendiği de gözlenmiştir. Karaciğer, pankreas, meme, akciğer, kalınbarsak, testis, tiroit, prostat, uterus ve deri kanserlerinde artmış ifade gösterilmiştir [142].

Seçilen bu genlerin ifadelerini değerlendirmek için qPCR’da internal kontrol olarak Ubikitin C (*UBC*) geni kullanılmıştır. İnternal kontrol olarak seçilen genler, çalışma numunelerinden veya araştırılan durumdan bağımsız olarak çalışılan tüm numunelerde aynı seviyede ifade edilmelidir. Yapılan bir çalışmada yaygın kullanımı olan referans genlerin 16 farklı insan dokusunda farklı ifadeler gösterdiği ortaya konmuştur [143]. Bu nedenle transkriptomik çalışmalarda doku tipine veya deneysel koşullara göre değişmez bir internal kontrolü seçmek gen ifadelerini değerlendirmede çok önemli bir rol oynamaktadır. Vandesompele ve

arkadaşlarının yaptığı çalışmada dört farklı dokuda yapılan değerlendirmede *UBC*, *GAPD* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *HPRT1* (Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1) çalışılan 13 gen içerisinde en dengeli ifade edilen genler olarak öne çıkmıştır [144]. Yapılan başka bir çalışmada da kümülüs hücrelerinde normalizasyonu en güvenli şekilde yapabilmek için 13 primer çiftinin ifadesi değerlendirilmiş ve *B2M* (beta-2-microglobulin) ve *UBC* geninin ifadesinin daha kararlı bir şekilde ifade edildiğini gösterilmiştir [17].

Protein degradasyonunda görev alan *UBC* geni 12. Kromozomun kısa kolunda (12q24) yer alır (Şekil 2.27). İki ekzondan oluşur. *UBC* geninin promoteri hücre içi stres attığı zaman indüklenen heat-shock elementler (HSEs) taşır [145].



Şekil 2.27. *UBC* geninin haritası [146]

Ubikitin hücrenin hayatta kalması ve çoklu hücresel fonksiyonları tüm metabolik koşullar altında sürdürebilmesi için gereklidir. Memelilerde stresle düzenlenen iki poli-ubikitin genlerinden biri olan *UBC* geni stres altındaki hücre ortamında ubikitin seviyesini düzenler [145]. DNA tamiri, kinaz aktivitesi, doğuştan gelen bağışıklık gibi birçok biyolojik süreçte görev alır. Toksik protein kümelerini ortadan kaldırmak için proteozom ve otofajiyi birbirine bağlayan ve düzenleyen anahtar moleküllerdir. *UBC* gen ifadesi stresle beraber indüklenir ve hasarı ortadan kaldırabilmek için ekstra ubikitin sağlar [147]. Ubikitinler C-terminal ucundan ya başka proteinlere kovalent olarak bağlı bulunur ya da kendi N-terminal ucuna bağlanıp serbet olarak bulunur [148].

2.7. qPCR Sonuçları ile Embriyo Değerlendirme Çalışmaları

Kümülüs hücreleri hem mikroenjeksiyonunun yapılabilmesi için hali hazırda temizlenmesi gereken hücreler olması hem de oosit gelişiminin her basamağında etkin rol oynaması

sebebiyle transkriptomik analizler için tercih edilmektedir. Gelişim basamaklarının çeşitli aşamalarında yer alan genlerin kümülüs hücrelerindeki ifade seviyelerinin, oosit gelişim kapasitesini gösterebileceği düşünülmektedir [10, 15, 18, 89, 149].

Yerushalmi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *In-vitro* maturasyon (IVM) tedavisi uygulanan hastaların germinal vezikül (GV) oositlerin kompakt kümülüs hücreleri ile ICSI/IVF uygulanan hastaların genişlemiş kümülüs hücreleri kullanılarak global transkriptom profilleri çıkarılmıştır. Diferansiyel ifade analizleri ile kümülüs hücrelerinin genişleme ve maturasyon süreçleri boyunca transkriptom analizlerinde dramatik değişimler olduğu gösterilmiştir. Kompakt ve genişlemiş kümülüs hücreleri karşılaştırıldığında 1746 gende en az iki kat ifade farklılığı gözlenmiştir. Genişlemiş kümülüs hücrelerinde LH sinyallenmesi, kümülüs genişlemesi ve oosit olgunlaşmasında yer alan 1100 gende artmış ifade, 646 gende azalmış ifade izlenmiştir [89].

Feuerstein ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kümülüs hücrelerinin oositle arasındaki iletişim ve etkileşimden yola çıkarak bu hücrelerde geç folikülogenez ve oogenez aşamalarında görev alan genlerden, Steroidogenik Akut Düzenleyici Protein (STAR), Siklooksijenaz 2 (COX2), Amfirekulin (AREG), Sterol-Co enzim A Desaturaz 1/5(SCD1 ve SCD5) and Konneksin 43 (CX43) seviyelerini araştırmışlardır. Seçilen genlerin ifade motifleri ile oositin nükleer olgunluk (GV, M-I, M-II) ve gelişim yeterliliğini değerlendirmişlerdir. Seçilen genlerin ifade seviyelerindeki artış ile oositin nükleer olgunluk seviyesinin artışı arasında pozitif bir korelasyon, *in-vitro* gelişimleri arasında ters korelasyon bulmuşlardır. Nükleer olgunluk derecesi arttıkça ilgili genlerin ifadeleride 2 kat (SCD5, AREG) ve 5 kat (STAR, COX2, SCD1) artış tespit edilmiştir [10].

Ekart ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer araştırmada, iyi kalitede blastosist geliştirme ve canlı doğum potansiyeli taşıyan embriyoyu seçebilmek için oosit dondurma sikluslarında M-II oositleri değerlendirmek için kümülüs hücrelerinde bazı genlerin ifade seviyeleri araştırılmıştır. Değerlendirme için Hyaluran sentetaz (*HAS2*), Folikül stimüle hormon reseptör (*FSHR*), Solute carrier 2-A4 (*SLC2A*), Versikan (*VCAN*), Aktive lökosit hücre adezyon molekülü (*ALCAM*), progesteron reseptör (*PR*), nörofilin (*NRP1*) genleri seçilmiştir. *HAS2*, *VCAN* ve *PR* ifade seviyeleri, iyi kaliteli balastosist geliştirme potansiyeli yüksek olan oositlerin kümülüs hücrelerinde artmış iken diğer genlerde bir farklılık bulunmamıştır. *VCAN* ifade seviyesinin canlı doğumla sonuçlanma potansiyeli olan oositin

kümüls hücrelerinde artmış olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma ile oosit dondurma sikluslarında; M-II oositleri rastgele seçip dondurmak yerine kümüls hücrelerindeki ifade profillerinde öne çıkan aday genlere bakılıp seçilmesi ve sonrasında dondurulması; daha kaliteli oositin seçilmesine olanak tanıdığı gösterilmiştir. Bu sayede özellikle ICSI yapılacak oositlerin sayısının yasal olarak sınırlandırıldığı ve işlem için oositlerin rastgele seçildiği ülkelerde oosit dondurma sikluslarının başarısının artırılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir [149].

Yapılan çalışmalarda kümüls hücrelerindeki ifade farklılıklarının embriyo morfolojisini değerlendirirken morfolojik kriterlerin yanında destekleyici ya da ayırt edici bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir [13, 15, 17, 150]

Wathlet ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada iki farklı ilaç protokolüyle yapılan IVF tedavisindeki hastaların ICSI yapılan oositlerinin kümüls hücrelerinde gen ifade analizini değerlendirmişlerdir. Sekiz aday gen -*SDC4* (Syndecan), *PTGS2*, *ALCAM*, *GREM1*, *TRPM7* (transient receptor potential cation channel, subfamily M member 7), *CALM2* (Calmodulin 2), *ITPKA* belirlemişlerdir. Sonuçları hem kullanılan KOH protokolüne göre hem de hasta içi varyasyona göre değerlendirip, oosit yeterliliği ve embriyo gelişimi ile ilişkilendirmişlerdir. Embriyoları üçüncü gündeki hücre sayısı ve fragmentasyon varlığını değerlendirerek sınıflandırmışlardır. Buna göre üçüncü ve beşinci günde iyi kaliteli olan embriyolardaki ifade seviyeleri değerlendirilmiştir. *VCAN* dışındaki tüm genlerin ifade seviyelerindeki artışın, üçüncü ve beşinci gün embriyo morfolojisiyle pozitif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Her iki stimülasyon programı için farklı gen tahmin modelleri öne sürmüşlerdir. Her iki grupta da en kaliteli bölünme evresindeki embriyosu seçimi için *TRPM7* ve *ITPKA* genlerinin, gebelik tahmini için ise *SDC4* ve *VCAN* genlerinin ifade seviyesi en iyi belirteç olarak öne çıkmıştır [17].

Bazı çalışmalarda da kümüls hücrelerindeki ifade farklılıkları ile IVF tedavisi sonucunda gelişen gebelikler arasındaki ilişki araştırılmıştır [16, 19, 151, 152].

Wathlet ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada 47 ICSI hastasından alınan 47 ayrı kümüls kompleksinde 11 gen ifadesi qPCR ile retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen hastaların tamamına tek embriyo transferi yapılmış ve tedavi sonucuna göre gebe olan ve olmayan iki grup oluşturulmuştur. İki grup arasında *VCAN* geninin ifadesinde

anlamalı bir farklılık gözlenmezken, *EFNB2* (EphrinB2), *ITPKA* and *CAMK1D* (calcium/calmodulin dependent protein kinase 1D) genlerinin ifadesi gebe olanlarda anlamalı olarak fazla bulunmuştur [16]. Daha önceki çalışmalarında öne çıkan genler ile bu çalışmada anlamalı bulunan genleri birlikte değerlendirdiklerinde yeni bir gebelik olasılık modeli geliştirmişlerdir. Bu modele göre transfer edilen embriyoyu geliştiren oositin kümülüs hücrelerinde *EFNB2*, *CAMK1D* ve *STC2* (Stanniocalcin-2) genlerinin artmış ifadesi canlı doğum olasılığını arttırdığını öne sürmüşlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve üreticisi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihazın Adı	Üretici Firma
Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini	K-System
İnkübatör	Thermo
Oosit Aspirasyon Cihazı	Cook
Ultrason	Logicx
Steromikroskop	Zeiss
İnverted mikroskop	Zeiss
Santrifüj	Ependorf
Mikrosantrifüj	Thermo
Mikropipet	Eppendorf
Q-PCR	Roche
Kit Saklama Dolabı	Sanyo
Derin dondurucu (-80°C)	Sanyo

3.1.2. Kullanılan çözelti ve besi yerleri

Çalışmada embriyo kültürü ve sperm hazırlığı için kullanılan tüm çözelti/ besi yerleri ve katalog numaraları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan çözelti/ besi yerleri

Çözelti/ Besi yeri adı	Üretici Firma
ASP (EDTA, Gentamisin, Glukoz, Heparin, HEPES, Sodyum bikarbonat, sodyum klorid, sodyum lakatat, kalsiyum klorid, su)	Vitrolife
G-MOPS PLUS (EDTA, MOPS, Gentamisin, Glukoz, İnsan serum albümini, Lipoik asit, amino asitler, Sodyum bikarbonat, sodyum klorid, sodyum lakatat, kalsiyum klorid, su)	Vitrolife
G-1 PLUS (EDTA, Gentamisin, Glukoz, İnsan serum albümini, esansiyal olmayan amino asitler, Hyalorunan, Lipoik asit, magnezyum sülfat, Sodyum bikarbonat, sodyum klorid, sodyum lakatat, kalsiyum klorid, su)	Vitrolife
G-2 PLUS (EDTA, Gentamisin, Glukoz, İnsan serum albümini, esansiyal amino asitler, Hyalorunan, Sodyum bikarbonat, sodyum klorid, sodyum lakatat, kalsiyum klorid, su)	Vitrolife
G-IVF PLUS (EDTA, Gentamisin, Fruktoz, Glukoz, İnsan serum albümini, esansiyal olmayan amino asitler, Sodyum bikarbonat, Sodyum klorid, Sodyum lakatat, Sodyum pirüvat, Potasyum klorid, Kalsiyum klorid, Kalsiyum pentatenat, su)	Vitrolife
G-TL PLUS (EDTA, Gentamisin, Glukoz, İnsan serum albümini, esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler, Hyalorunan, Sodyum bikarbonat, sodyum klorid, sodyum lakatat, kalsiyum klorid, su)	Vitrolife
HYASE-10X (Hyalorinidaz, İnsan serum albümini, penisilin, Kalsiyum klorid, magnezyum klorid, Potasyum klorid, Sodyum klorid, su)	Vitrolife
ICSI (EDTA, Glukoz, Polivinilpirolidon, Kalsiyum klorid, Potasyum klorid, Sodyum Bikarbonat, Sodyum klorid, Sodyum laktat, su)	Vitrolife
SPERMGRAD (HEPES, Glukoz, Sodyum bikarbonat, Sodyum klorid, Sodyum lakatat, Sodyum pirüvat, Potasyum klorid, Kalsiyum klorid, Magnezyum sülfat, Koloidal silika partikülleri, su)	Vitrolife
OVOİL (Mineral yağ)	Vitrolife
PBS (Sodyum posfat, Sodyum korür)	Sigma

3.1.3. Kullanılan kit ve kimyasallar

RNA izolasyonu için RNA izolasyon kiti Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research Corp., U.S.A) kullanıldı. Kitin içerisinde Lizis Tampon, RNA Yıkama (wash) Tamponu, DNA Kesim (Digestion) Tamponu, RNA Hazırlama (prep) Tamponu, enzim içermeyen su (DNaz/ RNaz-free su) bulunur.

cDNA sentezi için İpsogen® RT Kiti (Qiagen, USA) kullanıldı. Kitin içerisinde 5x Revers Transkriptaz tamponu, dNTP, rastgele (random) Nonamer, Rnaz baskılayıcı (Inhibitör), Revers transkriptaz, DTT tamponu bulunur.

Genlerin amplifikasyonu için Taqman master-prob kiti (Roch Diagnostics, Germany) kullanıldı. Kitin içerisinde probes master, primer-prob karışımı, su bulunur. Çalışılan genlere özel sentezlenen katalog assay primerler (Roch Diagnostics, Germany) kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan malzemeler

Çalışmada kullanılan tek kullanımlık sarf malzemeler ve üreticisi Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan tek kullanımlık sarf malzemeler

Malzeme Adı	Üretici Firma
Konik tüp (15 ml)	BD Sciences
Yuvarlak tabanlı tüp (15 ml)	BD Sciences
Yuvarlak tabanlı tüp (5 ml)	BD Sciences
Kültür kabı (60 mm)	BD Sciences
Centerwell petri kabı (60 mm)	BD Sciences
Petri kabı (120 mm)	BD Sciences
Plastik Steril pastör pipet (3ml)	LP Italiana
Cam pastör pipet (3ml)	Isolab
Serolojik pipet (10ml)	LP Italiana
Yumurta temizleme pipeti (145°)	Synga
Mikroenjeksiyon pipeti	Cook
Tutucu pipet	Vitrolife
Pcr tüpü	Eppendorf
Mikropipet ucu	Eppendorf
OPU iğnesi	Cook
Transfer kateteri	Cook

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmaya dâhil edilme kriterleri

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından desteklenen (Proje No:05/2016-24) çalışmamız infertilite nedeniyle Gazi Üniversitesi Tüp bebek Merkezine tedavi için başvurmuş ve aynı tedavi protokolü uygulanmış 20 gönüllünün katılımı ile yapılmıştır. Çalışmamız için Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan (Karar no: 708) onay alınmıştır.

Tüp bebek tedavisi almak için Gazi Üniversitesi Tüp bebek Merkezine başvuran hastaların çalışmaya dâhil edilme kriterleri kadın hastalar için; 35 yaştan gün almamış olmak, vücut kitle indeksi (VKİ) $\leq 30 \text{ kg/ m}^2$ olmak, kemoterapi ve radyoterapi tedavisi almamış olmak olarak belirlenmiştir.

Erkek hastalar için ise; WHO standartlarına göre sperm parametreleri normal sınırlar içerisinde yer alanlar çalışmaya dahil edilirken; ağır erkek faktörü (şiddetli oligo-asteno-teratozoa spermi) olan, testis biyopsisi yapılarak sperm elde edilen hastalar çalışmadan dışlanmıştır.

3.2.2. Ovulasyon indüksiyon protokolü

Tedaviye başvuran kadın gönüllülerin adet kanamasının 3. günü kanda FSH, LH, progesteron düzeylerine bakıldı ve ultrasonografik olarak overler değerlendirildi. Hastanın infertilite nedeni, serum hormon düzeyleri ve ultrason görüntüleri değerlendirilerek hastaya uygun ilaç dozları ile antogonist tedavi protokolü hekim tarafından başlandı. Tedavi protokolünde rekombinant folikül uyarıcı hormon (rec-FSH), rekombinant luteinizan hormon (rec-LH), insan menopozal gonadotropini (hMG), insan koryonik gonadotropin, GnRH analogları, GnRH antagonistleri ilaç olarak kullanılır. 150-450 IU/gün rekombinant FSH (Gonal-F; Merck, İstanbul, Türkiye) veya hMG (Menagon; Ferring, İstanbul, Türkiye) tek başına veya kombine olarak maksimum doz 450 IU/gün olacak şekilde uygulandı. Bu süreçte hastanın serum E2 değerleri ve vaginal ultrasonografi ile foliküllerin gelişimi takip edildi. Hastanın tedaviye olan cevabına göre gonadotropin doz ayarlaması yapıldı. Serum E2 değeri 400-600 IU ve folikül büyüklüğü 11-12 mm olduğunda protokole GnRH antagonisti (Cetrotide; Merk, İstanbul, Türkiye) eklendi. Takipler sonucunda iki veya daha

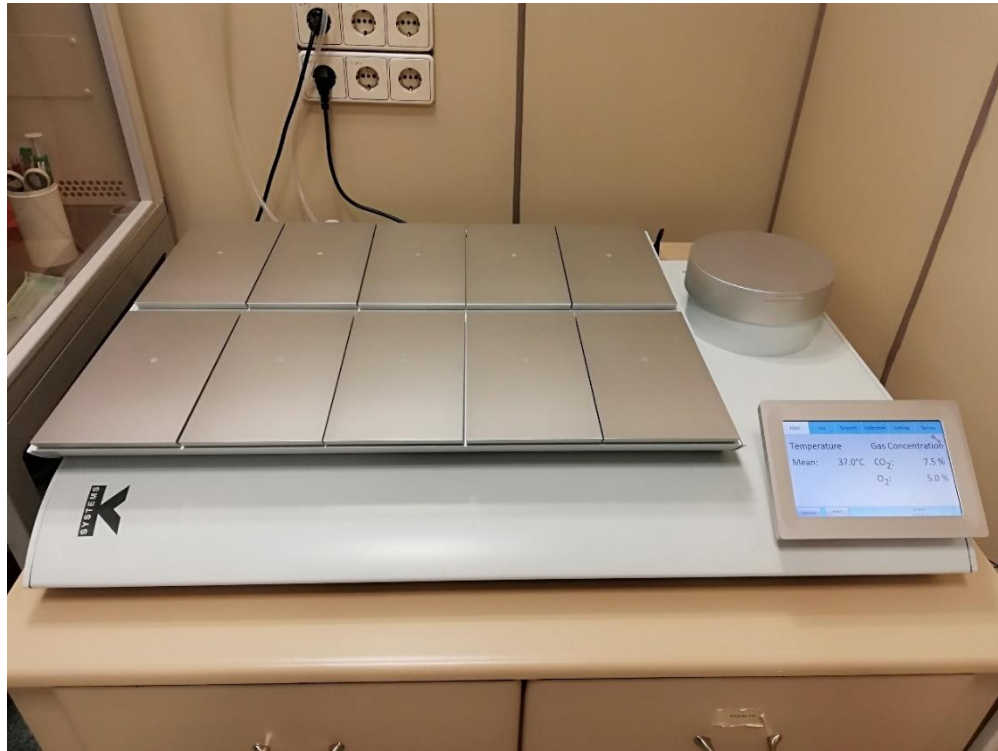
fazla folikül 18 mm olduğunda rekombinant hCG (Ovitrelle®, Serono, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Enjeksiyondan 36 saat sonra yumurta toplama işlemi (OPU) hekim tarafından yapıldı.

3.2.3. Hazırlık işlemleri

OPU işleminden bir gün önce planlanan IVF tedavisinin laboratuvar hazırlığı yapıldı.

- Oosit toplama petri kabı: Centerwell petri kabına 3ml G-MOPS PLUS besiyeri konuldu. Üzeri OVOİL ile kapatıldı.
- Oosit inkübasyon petri kabı: Centerwell petri kabına 3ml G-IVF PLUS besiyeri konuldu. Üzeri OVOİL ile kapatıldı.
- Embriyo kültür petri kabı: 6 mm petri kabına G-1 PLUS besiyeri 100 µl damlacıklar konularak hazırlandı. Üzeri OVOİL ile kapatıldı.

Hazırlanan petri kapları pH dengelenmesi için 37 °C'de % 6 karbondioksit (CO₂) ortamı olan inkübatöre kaldırıldı. OPU için ASP çözeltisi, sperm hazırlama içinde gardient ve sperm yıkama çözeltileri tüplere bölünerek inkübatöre konuldu (Resim 3.1).



Resim 3.1. Embriyo kültür inkübatörü

3.2.4. Oosit toplama işlemi (OPU)

Oosit toplama işlemi steril şartlarda, ultrason eşliğinde (Resim 3.3), aspirasyon cihazı ve oosit toplama iğnesi kullanılarak yapıldı. OPU iğnesi (Resim 3.2) ile overlerdeki foliküllerin (Resim 3.4) içerisindeki kümülüs-oosit kompleksi (KOK), aspire edilerek tüplerin içerisine hekim tarafından toplandı. Gerekirse boşaltılan foliküller ASP çözeltisi ile yıkanarak tekrar aspirasyon yapıldı.



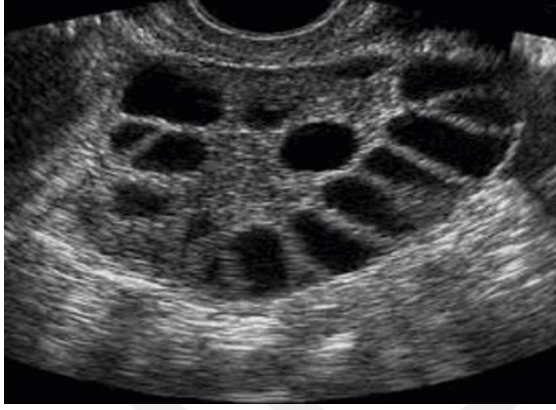
Resim 3.2. OPU (aspirasyon) iğnesi



Resim 3.3. OPU odası ve ultrason

Tüpler hızlı bir şekilde embriyoloji laboratuvarına iletildi. Aspirasyon sıvısı 100 mm petri kaplarına dökülerek mikrobiyolojik güvenlik kabini içerisinde steromikroskop altında

incelendi (Resim 3.5). KOK yapıları toplandı. Toplanan KOK yapıları hazırlanmış olan oosit inkübasyon petri kabına konularak inkübatöre kaldırıldı. Oositlerin temizlenmesine kadar inkübe edildi.



Resim 3.4. İndüksiyon sonrası overlerde gelişen foliküllerin ultrason görüntüsü



Resim 3.5. Mikrobiyolojik güvenlik kabini ve stereo mikroskoplar

3.2.5. İnseminasyon için sperm örneğinin hazırlanması

Oositleri toplanan hastanın eşi işlem gününde örnek alımı için ayrılmış odaya alındı. Sperm örneği mastürbasyon yöntemiyle steril sperm kabının içerisine toplandı ve laboratuvara ulaştırıldı. Sperm 15-20 dk inkübatöre kaldırılarak likefiye olması beklendi. Sonrasında sperm Makler kamerada (Şekil 2.1) sayı ve hareketlilik açısından değerlendirildi. Gradient yöntemi ile sperm hazırlandı. % 9.0'lık ve % 40'lık gradient çözeltileri hazırlandı. Konik tüp içerisine önce % 90'lık gradient çözeltisinden 1 ml, üzerine % 40'lık gradient çözeltisinden 1 ml birbirine karıştırmadan dikkatlice konuldu. Gradient çözeltilerinin üzerine hastadan alınan tüm seminal plazma konuldu. 10 dk 400 g santrifüj edildi. Sonrasında en alttaki %90'lık gradient kalacak şekilde süpernatant atıldı. Üzerine 3 ml sperm yıkama çözeltisi konuldu. Tekrar 10 dk 400 g santrifüj edildi. Tüpte 0,5 ml kalacak şekilde süpernatant atıldı. Mikroenjeksiyon işlemine kadar inkübatöre kaldırıldı.

3.2.6. ICSI öncesi oositlerin temizlenmesi ve kümülüs hücrelerinin toplanması

Toplanan oositlerin kümülüs hücrelerinin bireysel olarak ayrıştırılıp temizlenmesi ve ICSI için hazırlanabilmesi için 40 µl HYASE-10X enzimi ve 5 µl GMOPS PLUS besiyeri ile damlacıklar yapılarak üzeri mineral yağ ile kapatıldı. Hyaluronidaz enziminde 10-15 sn steril cam steril pastör pipet ile pipetaj yapılan oositler enzimatik olarak kümülüs hücrelerinden ayrıldı. Mekanik temizlik için denüstasyon pipeti (Resim 3.6) kullanarak oosit tamamen kümülüs hücrelerinden temizlendi.



Resim 3.6. Denudasyon pipeti

Temizlenen oositlerden metefaz-II aşamasında olan oositler sıraları bozulmadan ICSI petri kabına alındı. Her bir oositte elde edilen kümülüs hücreleri mikropipet ile toplanarak ayrı PCR tüplerine konuldu. Üzerlerine aynı hacimde soğuk PBS çözeltisi konularak 10 dk 2000 g santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellete dokunmaksızın süpernatant atıldı. Her oositin kümülüs hücrelerinin ayrı ayrı toplandığı tüpler etiketleme yapılarak -80°C kaldırıldı.

3.2.7. ICSI uygulaması

ICSI işlemi ön hazırlığında mikromanipülatörün pipet ayarları yapılarak enjeksiyon için hazır hale getirildi (Resim 3.7). 6 mm petri kabının kapağına oosit ve sperm için 5 µl lik GMOPS PLUS damlacıkları ve polivinilpropilen (PVP) kullanılarak sperm havuzu yapıldı ve üzeri mineral yağ ile kaplandı. PVP havuzuna, hazırlanmış sperm örneğinden 1-3 µl konuldu. Metefaz-II oositler takip sırasına uygun olarak petri kabındaki damlacıklara yerleştirildi. ICSI 20x10X büyütmede inverted mikroskop altında yapıldı (Resim 3.4). ICSI işlemi tamamlandıktan sonra her bir oosit önceden hazırlanmış kültür petri kabına aynı sıra ile alınarak inkübatöre kaldırıldı. Hastanın tüm bilgileri embriyoloji kayıt formuna işlendi. ICSI uygulanan oositlerde ise 16-18. saatlerde fertilizasyon kontrolü yapıldı. Embriyo kültürü boyunca embriyoların morfolojik karakterleri kayıt altına alınarak embriyo derecelendirilmesi yapıldı. Embriyoların 3. gün değerlendirilme kriterleri Çizelge 2.4’de gösterilmiştir.



Resim 3.7. İverted Mikroskop ve Mikromanipülatör

3.2.8. Embriyo transferi

Transfer günü hastanın kayıtlarına göre değerlendirme yapılarak morfolojik olarak en kaliteli embriyo transfer için seçildi. Bir gün önceden G-2 PLUS besi yeri ile hazırlanan transfer petri kabına alındı. Buradan embriyo transfer kateterine yüklendi. İdrara sıkışık olan hastaya ultason eşliğinde embriyo transferi hekim tarafından yapıldı. Transfer sonrası 12. günde kanda beta-insan koryonik gonadotropin hormonu (β hcg) seviyesi kontrol edilerek gebelik sonucu değerlendirildi.

3.2.9. RNA izolasyonu

Çalışmaya katılan her gönüllünün tedavi boyunca geliştirdiği en kaliteli ve en zayıf embriyoları kayıtlardan tespit edildi ve bu embriyoların gelişimini sağlayan oositin kümülüs hücreleri çözülerek RNA izolasyonu yapıldı. Kümülüs hücrelerinden total RNA izolasyonu Quick-RNA[™] MiniPrep (Zymo Research Corp., U.S.A) ticari kiti kullanılarak yapıldı. İzolasyon uygulayıcı protokolüne uygun yapıldı.

- İzolasyonu yapılacak olan -80 °C’de saklanan kümülüs hücreleri çözüldü. Hücrelerin üzerine lizolat haline getirebilmek için 300 µl RNA Lysis Buffer konuldu. Oda sıcaklığında 20 dk boyunca vortekslendi. 1dk x 14000 g santrifüjlendi.
- Koleksiyon tüpünün içine sarı filtre (Spin-Away™ Filter(yellow)) yerleştirildi. Süpernatant bu kolona yüklendi. 30sn x 14000 g santrifüjlendi. Kolondan geçen filtrat bundan sonraki izolasyon çalışmasında kullanıldı.
- Filtratın üzerine aynı miktarda etanol eklenerek iyice karıştırıldı. Karışım koleksiyon tüpünün içine yerleştirilen yeşil filtreye (Spin-Away™ Filter(green)) yüklendi. 30sn x 14000 g santrifüjlendi. Filtrat atıldı.

DNaz-I Uygulaması

Kolona 4 µl RNA Wash Buffer yıkama tamponu yüklendi. 30 sn x 14000 g santrifüjlendi. Filtrat atıldı. 5 µl DNaz-I ve 75 µl DNA Digestion Buffer ayrı bir tüpte karıştırıldı. Kolona yüklendi. Oda ısısında 15 dk inkübe edildi.

- 400 µl RNA Prep Buffer kolona yüklendi. 30 sn x 14000 g santrifüjlendi. Filtrat atıldı.
- 700 µl RNA Wash Buffer kolona yüklendi. 30 sn x 14000 g santrifüjlendi. Filtrat atıldı.
- 400 µl RNA Wash Buffer kolona yüklendi. 2 dk x 14000 g santrifüjlendi. Filtrat atıldı. Kolon dikkatlice temiz bir tüpe aktarıldı.
- Kolondan RNA’yı uzaklaştırmak için 50 µl DNaz/ RNaz-free su eklendi. 1 dk x 14000 g santrifüjlendi.
- Filtrat yeniden aynı kolona yüklenerek 1 dk x 14000 g santrifüjlendi.

3.2.10. RNAnın konsantrasyonu ve saflığının ölçülmesi

İzolasyon sonrası elde edilen RNA miktarı ve saflıkları Nanodrop ND-100 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wlmington, USA) ile ölçüldü. Nükleik asitler (DNA, RNA) 260nm, proteinler 280 nm dalga boylarında maksimum absorbansa sahiptir. Bu iki dalga boyunda elde edilen absorbanların oranı saflık derecesini verir. Nükleik asitler için saflık değerini 260/230 oranı değerlendirilerek RNA saflığı saptandı. O.D.260/ 280 oranı ~ 2,0 olarak okunan RNAlar saf olarak kabul edildi. RNA örnekleri cDNA sentezine kadar -80 °C kaldırıldı.

3.2.11. cDNA sentezi

Çalışmada elde edilen total RNAdan cDNA sentezi İpsogen® RT Kiti (Qiagen, USA) kullanılarak yapıldı. İzolasyon uygulayıcı protokolüne uygun yapıldı. Senteze başlamadan önce enzim hariç kitin tüm bileşenleri çözülüp buz içine alındı. Tüpler karıştırılıp (vortekslemeden) santrifüjlendi. RNA örnekleri 0,1ng/ µl konsantrasyon ve total hacim 10 µl olacak şekilde nükleaz-free su ile ayarlandı. 10 µl RNA örneği 5 dk 65°C de inkübe edildi. 5 dk buz üzerinde soğutuldu. Tüptekileri dipte toplamak için 10.000 rpm'de 10 sn santrifüjlendi. Buz üzerine alındı. Buz üzerinde Revers Transkripsiyon karışımı Çizelge 3.4'de belirtilen hacimlerde vortekslemeden dikkatlice karıştırılarak hazırlandı.

Çizelge 3.4. Rever Transkripsiyon bileşenlerinin içerikleri ve hazırlanması

Premix Bileşenleri	Örnek Başına Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
5x Reverse Transkriptaz tamponu	5,0	1x
dNTP (10mm)	2,0	0,8 mM
Rastgele Nonamer (100um)	5,25	21uM
Rnaz İnhibitör (40U/UL)	0,5	0,8 U/ µl
Revers Transkriptaz (200U/UL)	1,0	8 U/ µl
DTT	1,25	-
Örnek başına RT Premix	15	

10 µl RNA örneğinin üzerine 15 µl premix konularak toplam hacim 25 µl olarak ayarlandı. Kontrol için örnek yerine su konuldu. Tüpler dikkatlice karıştırılıp santrifüjlendi. PCR cihazına konuldu. PCR programı Çizelge 3.5' de gösterilmiştir. cDNA' yı tüpün dibinde toplamak için dikkatlice 10.000 rpm' de 10 sn santrifüjlendi. PCR yapılana kadar örnekler - 80 °C' de saklandı.

Çizelge 3.5. cDNA sentezi için PCR programı

Revers transkripsiyon 1	25° C x 10 dk
Revers transkripsiyon 2	50° C x 60 dk
Inaktivasyon	85 °C x 5 dk
Soğuma	4 °C x 5 dk

3.2.12. qPCR ile genlerin amplifikasyonu

Çalışmada elde edilen cDNAlarından hedef genleri çoğaltmak için LightCycler®480 Real-Time PCR Sistemi (Roche Diagnostics, Germany) kullanıldı (Resim 3.8). PCR protokolü firmanın optimize ettiği proplar ve program kullanılarak yapıldı. Normalizasyon (housekeeping gen) için UBC (*UbiquitinC*) geni kullanıldı.



Resim 3.8. qPCR cihazı

PCR karışımı her örnek için Çizelge 3.6'deki hacimlere göre hazırlandı. Amplifikasyon için ticari olarak tasarlanan primerler kullanıldı. Hazırlanan karışım, multiwell petri kabının her kuyucuğuna 15 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Her kuyuya 5 µl cDNA konulup, pipetlendi. Reaksiyon toplam 20 µl hacimde gerçekleştirildi

Çizelge 3.6. PCR karışımının hazırlanması

Bileşenler	Hacim
Su	4µl
Catalog Assay	1µl
Probes Master	10µl
Toplam Hacim	15µl

Tüm örnekler 3 teknik tekrarlı yapıldı. Cihazın arayüzüne gen isimleri ve örneklerin kodları girildi ve firma tarafından optimize edilmiş program başlatıldı. PCR programı Çizelge 3.7’ de gösterilmiştir. PCR sonrası alınan sonuçlar LightCycler®480 ara yüzünde değerlendirildi.

Çizelge 3.7. qPCR programı

	Derece	Süre
Pre-inkübasyon (1 döngü)	95 ⁰ C	10 dk
Amplifikasyon (45 döngü)	95 ⁰ C	10 sn
	60 ⁰ C	30 sn
	72 ⁰ C	1 sn
Soğuma (1 döngü)	40 ⁰ C	30 sn

3.2.13. qPCR ile gen ifadelerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplanması

VCAN, *PTGS2* ve *ITPKA* genlerinin ekspresyon seviyesi, referans gen olan *UBC* ekspresyonuna göre göreceli olarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplandı.

LightCycler®480 Real-Time PCR Sistemi ara yüzü kullanılarak çalışılan örneklerin Ct değerleri Microsoft Excel programına aktarıldı. Her örneğin hem hedef gen hem de referans gen için üç tekrar sonrası elde edilen Ct değerleri tabloya aktarıldı. Aynı gönüllünün hem iyi morfoloji (Ct_{iyi}) geliştiren örneğinin hem de zayıf morfoloji ($Ct_{zayıf}$) geliştiren örneğin ortalama Ct değerleri hesaplandı. İyi morfoloji geliştiren örneğin $\Delta Ct_{(iyi)}$ değerini hesaplamak için hedef gen ve referans gen Ct değerlerinin farkı alındı. Aynı şekilde zayıf morfoloji geliştiren örneğin $\Delta Ct_{(zayıf)}$ değeri hesaplandı,

$$\Delta Ct_{(iyi)} = \text{Hedef gen } Ct_{iyi} - \text{Referans gen } Ct_{iyi}$$

$$\Delta Ct_{(zayıf)} = \text{Hedef gen } Ct_{zayıf} - \text{Referans gen } Ct_{zayıf}$$

$\Delta\Delta CT$ hesaplamak için $\Delta Ct_{(iyi)}$ ve $\Delta Ct_{(zayıf)}$ değerlerinin farkı alındı.

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct_{(iyi)} - \Delta Ct_{(zayıf)}$$

Son olarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri hesaplandı. Bu şekilde yapılan hesaplamalar sonucunda araştırılan genlerin iyi morfoloji geliştiren embriyoların oositlerinin kümülüs hücrelerindeki ifadelerinin zayıf morfoloji geliştirenlere oranla ne kadar artmış ya da azalmış olduğu değerlendirildi.

3.2.14. İstatistiksel analiz

Yapılan çalışmada gönüllülere ait tüm tedavi parametreleri, embriyoların morfolojik değerlendirmeleri kayıt altına alındı. Gen ifade farklılıklarını değerlendirmek için Delta-delta Ct metodu kullanıldı [113]. İstatistiksel analiz için SPSS (SPSSInc., Chicago. IL., USA) kullanıldı. Embriyoların morfolojik profillerine (iyi kalite/zayıf kalite) göre ayırdığımız iki grup arasındaki gen ifade seviyeleri arasındaki farklılıkları değerlendirmek için T-testi kullanıldı. Yanılma düzeyi olarak 0,05 değeri seçildi. Bu değere eşit ya da küçük “p değerleri” için parametreler arası ilişkinin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu yorumu yapıldı. Gebelik sonuçlarına göre yaptığımız değerlendirmede çarpık değişkenleri (nonparametrik) karşılaştıran Mann-Whitney U testi uygulandı. Yanılma düzeyi olarak 0,05 değeri seçildi. Bu değere eşit ya da küçük “p değerleri” için sıfır hipotezi reddedildi.



4. BULGULAR

4.1. Ovaryan Stimülasyon Protokolü

Çalışmamıza Gazi Üniversitesine tüp bebek tedavisi için başvuran 20 gönüllü dâhil edildi. Gönüllülere ait ovaryan indüksiyon parametreleri Çizelge 4.1’de gösterildi. Çalışmaya katılan gönüllülere ait olan tedavi parametrelerinin minimum, maksimum ve ortalama değerleri de Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Buna göre gönüllülerin yaşları 23-35 arasında olup ortalaması 29 olarak hesaplandı. Beden/kütle indeksleri ise 18-30 arasındaydı. Tedaviye başladıkları menstural döngüde bazal FSH, E2 (östrodiol), Progesteron değerleri ortalamaları sırasıyla; 7,5; 51,3; 0,8’idi. Tamamına oosit inküsyonu için antagonist tedavi protokollü uygulandı. 150-450 IU/gün rekombinant FSH (Gonal-F; Merck, İstanbul, Türkiye) veya hMG (Menagon; Ferring, İstanbul, Türkiye) tek başına veya kombine olarak maksimum doz 450 IU/gün olacak şekilde uygulandı. Tedavi süresi ortalama 10 gün sürdü. Kullanılan toplam doz ortalama 2774 (IU) idi. Tedavi boyunca serum E2 değerleri ve vaginal ultrasonografi ile foliküllerin gelişimi takip edildi. Hastanın tedaviye olan cevabına göre gonadotropin doz ayarlaması yapıldı. Folikül büyüklüğü 11-12 mm olduğunda protokole GnRH antagonisti (Cetrotide; Merk, İstanbul, Türkiye) eklendi. Takipler sonucunda iki veya daha fazla folikül 18 mm olduğunda rekombinant hCG (Ovitrelle®, Serono, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Enjeksiyondan 36 saat sonra OPU yapıldı.

Çizelge 4.1. Gönüllülere ait tedavi parametreleri

Gönüllü Sıra No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Yaş (yıl)	34	27	26	23	29	32	26	31	23	34	25	30	30	31	35	25	32	30	32	25
BMI Değeri (KG/ m ²)	18	24	26	26	24	29	21	18	22	27	30	30	26	20	29	27	19	28	24	30
Bazal FSH (IU/ L)	9,6	8,9	5,3	9,3	6,5	7,9	6,7	6,3	5,3	7,4	6,2	6,8	7,6	15	4,7	7,5	6,5	8,1	6,2	6,7
Bazal E2 (IU/ L)	32	166	35	36	88	25	65	58	58	67	98	33	30	26	21	28	35	32	27	67
Bazal Progesteron (IU/ L)	0,7	0,8	0,8	0,7	0,1	1,1	0,5	0,8	0,5	0,4	0,9	1,9	1,1	0,8	1,6	0,7	0,6	0,5	0,8	0,9
İndüksiyon Süresi (gün)	13	13	11	11	18	9	10	8	9	8	9	12	11	12	12	10	8	9	8	14
Toplam Gonadotropin Dozu (IU)	3750	2700	1915	2475	1875	2215	2025	1700	2475	2350	1125	3850	5100	6025	4150	2225	3200	3200	1450	2585

4.2. Embriyolojik Çalışmalar

Gönüllülere ait embriyoloji parametreleri Çizelge 4.2’de gösterildi. Çalışmaya katılan gönüllülere ait olan embriyoloji parametrelerinin istatistiksel değerlendirmenin sonucundaki minimum, maksimum ve ortalama değerleri de Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Yumurta toplama işlemi esnasında OPU iğnesi ile foliküller aspire edilerek, kümülüs-oosit kompleksleri (KOK), embriyoloji laboratuvarına iletildi. Tespit edilen KOK’leri toplanarak inkübatöre kaldırıldı. OPU işlemlerinde ortalama 4-16 arasında oosit toplandı. Erkek hastanın sperm örneği yıkama işleminden geçirilerek hazırlandı. Mikroenjeksiyon öncesi kümülüs hücreleri bireysel olarak önce temizlendi ve oosit olgunluk değerlendirilmesi yapıldı. Toplanan oositlerin olgunlaşma oranı (metefaz-II oosit/ toplanan oosit) ortalama % 85,3 bulundu. Metefaz-II olan oositlere mikroenjeksiyon yapıldı. ICSI sonrası oositler aynı sıra ile kültür petri kabına alınarak inkübatöre kaldırıldı. ICSI uygulanan oositlerde ise 16-18. saatlerde fertilizasyon kontrolü yapıldı. Mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon oranı (döllenen oosit/ metefaz-II oosit) ise ortalama % 78,1 bulundu. Embriyo transfer gününe kadar embriyolar her gün morfolojik olarak değerlendirildi ve bilgiler kayıt altına alındı. Bölünen embriyolar hücre sayısına, fragmentasyon içerip içermemesine ve blastomerlerin eşit büyükte olup olmamasına göre değerlendirilip Çizelge 2.4’e göre derecelendirildi. Embriyo gelişim oranı (bölünene embriyo/döllenen oosit) ortalama % 90,6 bulundu. Üçüncü gün embriyolarından 7 ve üzeri hücreye sahip olanların oranı (≥ 7 hücreye sahip embriyolar/ oluşan tüm embriyolar) % 68 olarak hesaplandı. Düşük fragmentasyon (%5) taşıyan embriyoların oranı (≤ 5 fragmentasyon taşıyan embriyolar/ oluşan tüm embriyolar) % 76 idi. Buna göre üçüncü günde en az 7 hücre olan ve düşük fragmentasyon oranına sahip embriyolar; iyi kalite embriyo olarak değerlendirildi. Çalışma grubunda 3. günde iyi kaliteli embriyo geliştirme ortalama olarak 3,4 (% 65,8) bulundu. Tüm hastalara tedavi sonucunda geliştirdiği en iyi tek embriyo transfer edildi. 12 gün sonra kanda β -hcg seviyesine bakılarak gebelik sonucu değerlendirildi.

Çizelge 4.2. Gönüllülere ait embriyoloji parametreleri

Gönüllü Sıra No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Toplanan Oosit sayısı (n)	4	10	5	9	8	9	16	7	15	12	11	11	4	8	11	8	5	8	10	4
MII oosit Sayısı(n)	3	9	5	7	6	9	16	7	11	9	10	9	4	6	10	6	4	6	8	3
Olgun Oosit oranı (%)	75	90	100	77	75	100	100	100	93	75	90	81	100	75	90	75	80	75	80	75
ICSI Yapılan Oosit Sayısı(n)	3	9	5	7	6	9	14	5	14	9	10	9	4	6	10	6	4	6	8	3
Döllenen Oosit Sayısı (n)	2	6	5	7	5	8	14	5	11	6	9	9	2	6	6	6	3	4	3	2
Dölllenme Oranı (%)	66	66	100	100	83	88	100	71	78	66	90	100	50	100	60	100	75	66	38	66
Bölünme Oranı (%)	100	100	100	85	100	100	100	100	100	100	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100
≥ 7 Hücre Olan Embriyo Sayısı (3. Günde)	2	5	3	6	2	6	5	4	5	4	1	5	2	4	4	5	3	4	2	1
Düşük Fragmantasyonlu Embriyo Sayısı(3. Günde)	2	6	4	6	3	7	1	5	10	5	1	7	2	2	6	6	3	4	2	1
İyi kaliteli Embriyo Sayısı (3. Günde)	2	5	3	6	2	6	2	4	5	4	1	5	2	2	4	5	3	4	2	1
Transfer Edilen Embriyo Sayısı (n)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sonuç	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-

Çizelge 4.3. Gönüllülere ait tedavi parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

VERİLER	Minimum	Maksimum	ORTALAMA	SD
Yaş (yıl)	23	35	29	± 3,7
BMI Değeri (KG/ m ²)	18	30	24,87	± 4
Bazal FSH (IU/ L)	4,7	17,0	7,5	± 2,5
Bazal E2 (IU/ L)	21,0	166,0	51,3	±34,8
Bazal Progesteron (IU/ L)	0,1	1,9	0,8	±0,4
İndüksiyon Süresi (gün)	8	18	10,7	± 2,5
Toplam Gonadotropin Dozu (IU)	1125,0	6025,0	2774,9	± 1261,1
Toplanan Oosit sayısı (n)	4	16	8,7	± 3,4
MII oosit Sayısı (n)	3	16	7,4	± 3,1
Olgun Oosit oranı (%) (MII oosit / toplam oosit)	0,75	1,00	0,85	± 0,1
Döllenen Oosit Sayısı (n)	2	14	5,9	± 3,1
Döllenme Oranı (%) (Döllenen oosit/MII oosit)	0,38	1,00	0,78	± 0,18
Bölünme Oranı (%) (Bölünen embriyo/ Döllenen oosit)	0,38	1,00	0,90	± 0,19
≥ 7 Hücre Oranı (%) (3. Günde)	0,11	1,00	0,68	± 0,24
Düşük Fragmantasyon Oranı (%) (3. Günde)	0,7	1,00	0,76	± 0,29
İyi Kaliteli Embriyo Oranı (%) (3. Günde)	0,11	1,00	0,65	± 0,27

4.3. Gebelik Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tedavi sonucunda gebelik sonuçları değerlendirildiğinde 20 hastanın 9 tanesi gebe kalırken, 11 tanesi gebe kalamadı. Gönüllülerin tedavi sonuçlarına göre parametrelerinin değerlendirilmesi Çizelge 4.4' de gösterilmiştir. İki grup arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Gebe olan gönüllülerin ortalama yaşları 29,1 iken gebe olmayanların 28,9 bulundu. Beden/kütle indeksleri ise sırasıyla 24,8; 24,9 olarak hesaplandı. Gebe olanların tedaviye başladıkları menstural döngüde bazal FSH, E2 (östrodiol), progesteron değerleri ortalamaları sırasıyla; 7,8; 53,2; 0,7 iken gebe olmayanlarda 7,2; 49,8; 0,8 olarak hesaplandı. Tedavi süresi ortalama gebe olanlarda 10, olmayanlarda 11 gün sürdü. Kullanılan toplam gonadotropin doz gebe olanlarda ortalama 2502 (IU) iken gebe olmayanlarda 2997 (IU) idi. OPU işlemlerinde gebe olanlarda ortalama 8, olmayanlarda 9,3 oosit toplandı. Toplanan oositlerin olgunlaşma oranı (metefaz-II oosit/ toplanan oosit) sırasıyla % 85,2; % 85,3 bulundu. Mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon oranı (döllenen oosit/ metefaz-II oosit) ise sırasıyla % 80,3; % 76,3 bulundu. Bölünme oranı (bölünen embriyo/döllenen oosit) gebe olanlarda % 98 iken gebe olmayanlarda % 94 olarak hesaplandı. Üçüncü gün embriyolarından 7 ve üzeri hücreye sahip olanların oranı (≥ 7 hücreye sahip embriyolar/ oluşan tüm embriyolar) sırasıyla % 81; % 72 hesaplandı. Düşük fragmentasyon (%5) taşıyan embriyoların oranı (≤ 5 fragmentasyon taşıyan embriyolar/ oluşan tüm embriyolar) ise sırasıyla % 91; % 73 bulundu. Gebe olanlarda 3. günde iyi kaliteli embriyo geliştirme sayısı %81, gebe olmayanlarda ise % 58 bulundu. İki grubun tedavi parametreleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

Çizelge 4.4. Gönüllülerin tedavi sonuçlarına göre parametrelerin değerlendirilmesi

Veriler	GEBE (n= 9)	GEBE OLMAYAN (n=11)
Yaş(yıl)	29,1 ± 4	28,9 ± 3,7
BMI (kg/m ²)	24,8 ±4	24,9 ± 4,2
Bazal FSH (IU/ L)	7,8 ± 1,3	7,3 ± 3,3
Bazal E2 (IU/ L)	53,2 ± 44,5	49,8 ± 26,8
Bazal Progesteron (IU/ L)	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,5
Toplam Gonadotropin Dozu (IU)	2502,6 ± 638,3	2997,7 ± 1500
İndüksiyon Süresi (gün)	10,2 ± 1,9	11,2 ± 2,9
Toplanan Oosit (n)	8 ± 2,4	9,4 ± 4
Olgun Oosit oranı (%)	6,7 ± 2	7,9 ±3,8
Olgun Oosit oranı (MII/toplam oosit)	0,85 ± 0,12	0,85 ± 0,09
Döllen Oosit Sayısı (n)	5,4 ± 1,7	6,3 ± 3,9
Döllenme Oranı (%) (Döllen oosit/MII)	0,80 ± 0,16	0,76 ± 0,21
Bölünme Oranı (Bölünen embriyo/fertilize oosit)	0,98 ± 0,5	0,94 ± 0,18
≥ 7 Hücre Oranı (%) (3. Günde)	0,81 ± 0,13	0,72 ± 0,12
Düşük Fragmantasyon Oranı (%) (3. Günde)	0,91 ± 0,11	0,73 ± 0,24
İyi Kaliteli Embriyo Oranı (%) (3. Günde)	0,81 ± 0,13	0,58 ± 0,25

*İki grup arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (p>0,05).

4.4. Kümülsüs Hücrelerinin Toplanması

Her bir oositte elde edilen kümülüs hücreleri mikropipet ile toplanarak ayrı ayrı PCR tüplerine konuldu. Üzerlerine aynı hacimde soğuk PBS çözeltisi konularak 10 dk 2000 g

santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellete dokunmaksızın süpernatant atıldı. Her oositin kümülüs hücrelerinin ayrı ayrı toplandığı tüpler etiketleme yapılarak -80°C kaldırıldı.

Kümülüs hücrelerindeki gen ifade seviyeleri incelendiğinden embriyoların üçüncü günde gösterdikleri morfolojik gelişimlerine göre iyi/ zayıf kaliteli embriyo değerlendirmesi yapıldı.

4.5. RNA İzolasyonu, Saflık ve Konsantrasyon Ölçümleri

Çalışmaya katılan gönüllülerin tedavi boyunca geliştirdiği en iyi ve en zayıf embriyonun gelişimini sağlayan oositin kümülüs hücrelerinden materyal-metodda belirtildiği gibi RNA izole edildi. RNA saflık ve konsantrasyon ölçümleri Nanodrop ND-100 Spectrophotometer ile ölçüldü. Çalışmada izole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri Çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. İzole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri

	RNA Konsantrasyonu (ng/ μ L)	RNA Saflığı ($A_{260/280}$ nm)
No:1 / iyi	7,1	1,84
No:1 /zayıf	16,0	1,76
No:2 / iyi	10,5	1,95
No:2 /zayıf	33,3	1,68
No:3 / iyi	14,4	1,97
No:3 /zayıf	12,7	2,02
No:4 / iyi	9,0	1,98
No:4 /zayıf	18,7	1,86
No:5 / iyi	17,8	1,92
No:5 /zayıf	17,3	1,85
No:6 / iyi	15,1	1,78
No:6 /zayıf	14,8	1,98
No:7 / iyi	14,1	2,01
No:7 /zayıf	19,2	1,69
No:8 / iyi	10,6	2,12
No:8 /zayıf	16,8	2,01
No:9 / iyi	14,1	2,04
No:9 /zayıf	12,3	1,95
No:10 / iyi	9,7	1,91
No:10/zayıf	11,7	1,89
No:11 / iyi	8,9	1,94
No:11 /zayıf	13,1	2,05
No:12 / iyi	12,1	2,16
No:12 /zayıf	16,7	1,89
No:13 / iyi	6,6	1,86
No:13 /zayıf	9,1	2,00
No:14 / iyi	18,1	1,94
No:14 /zayıf	20,9	1,96
No:15 / iyi	10,5	1,88
No:15 /zayıf	7,6	1,97
No:16 / iyi	9,1	2,05
No:16 /zayıf	7,7	1,88
No:17 / iyi	10,6	2,11
No:17 /zayıf	10,6	2,01
No:18 / iyi	14,8	2,00
No:18 /zayıf	11,8	1,96
No:19 / iyi	8,9	19,4
No:19 /zayıf	10,8	1,89
No:20 / iyi	8,7	1,87
No:20 /zayıf	12,8	1,98

4.6. qPCR Uygulaması

İzole edilen RNAlar materyal metoddan belirtildiği şekilde cDNA'ya dönüştürüldü. Her gönüllüye ait olan iyi ve zayıf kaliteli embriyo geliştiren oositin kümüls hücreleri *ITPKA*, *VCAN* ve *PTGS2* genlerinin ifade seviyeleri LightCycler®480 Real-Time PCR kullanılarak üç tekrarlı çalışıldı. Referans gen olarak *UBC* kullanıldı. *VCAN*, *PTGS2* ve *ITPKA* genleri gen ekspresyon seviyesi, referans gen olan *UBC* ekspresyonuna göre göreceli olarak $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemine göre hesaplandı [112]. Sonuçlar Çizelge 4.6, 4.7, 4.8'de gösterilmiştir. Hesaplamalar yapılırken her hastaya ait olan iyi ve zayıf kaliteli embriyo geliştiren oositin kümüls hücrelerindeki *ITPKA*, *VCAN*, *PTGS2* genlerinin qPCR reaksiyonundaki üç teknik tekrar sonucunda verdikleri C_t değerlerinin ortalaması hesaplandı. Aynı şekilde referans geninde üç teknik tekrarın ortalama C_t değerleri hesaplandı. Hedef genin ortalama C_t değeri ile referans genin ortalama C_t değerinin farkı alınarak ΔC_t hesaplaması yapıldı. İyi morfoloji geliştiren örneğin ΔC_t değeri ile zayıf morfoloji geliştiren örneğin ΔC_t değerinin farkı alınarak $\Delta\Delta C_t$ değeri hesaplandı. Son olarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hesaplanarak genler arasındaki kat artışı değerlendirildi (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.6. *ITPKA* geninin *UBC* referans genine göre ifade seviyesinin hesaplaması

	<i>ITPKA</i> ortalama Ct (hedef)	<i>UBC</i> ortalama Ct (ref)	Hedef gen / referans gen	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$
No:1 / iyi	32,92	23,98	0,0020	8,94	-0,36
No:1 / zayıf	34,39	25,10	0,0016	9,29	
No:2 / iyi	34,61	24,84	0,0011	9,78	-0,18
No:2 / zayıf	35,97	26,02	0,0010	9,96	
No:3 / iyi	31,93	25,76	0,0139	6,17	-0,89
No:3 / zayıf	35,86	28,81	0,0075	7,06	
No:4 / iyi	34,2	22,78	0,0004	11,42	0,67
No:4 / zayıf	34,96	24,21	0,0006	10,75	
No:5 / iyi	35,78	25,11	0,0006	10,67	0,81
No:5 / zayıf	33,27	23,41	0,0011	9,86	
No:6 / iyi	31,03	23,15	0,0042	7,88	-0,67
No:6 / zayıf	32,42	23,87	0,0027	8,55	
No:7 / iyi	32,54	22,37	0,0009	10,17	0,01
No:7 / zayıf	31,73	21,58	0,0009	10,16	
No:8 / iyi	32,16	22,80	0,0015	9,36	-0,71
No:8 / zayıf	32,80	22,73	0,0009	10,07	
No:9 / iyi	29,69	21,35	0,0031	8,34	-0,23
No:9 / zayıf	30,64	22,07	0,0026	8,57	
No:10 / iyi	31,29	22,96	0,0031	8,33	-0,58
No:10 / zayıf	32,09	23,18	0,0021	8,91	
No:11 / iyi	32,47	21,37	0,0005	11,10	0,18
No:11 / zayıf	32,71	21,80	0,0005	10,92	
No:12 / iyi	34,72	28,81	0,0166	5,91	-0,96
No:12 / zayıf	36,35	29,48	0,0085	6,87	
No:13 / iyi	29,88	21,30	0,0026	8,58	0,40
No:13 / zayıf	29,86	21,68	0,0034	8,18	
No:14 / iyi	34,44	24,36	0,0009	10,08	0,16
No:14 / zayıf	34,48	24,56	0,0010	9,92	
No:15 / iyi	35,36	29,95	0,0235	5,41	-1,08
No:15 / zayıf	37,06	30,57	0,0111	6,50	
No:16 / iyi	29,95	22,10	0,0043	7,85	0,02
No:16 / zayıf	33,20	25,38	0,0044	7,83	
No:17 / iyi	32,33	23,73	0,0026	8,60	-0,23
No:17 / zayıf	34,66	25,83	0,0022	8,82	
No:18 / iyi	31,26	22,16	0,0018	9,09	0,57
No:18 / zayıf	30,70	22,17	0,0027	8,53	
No:19 / iyi	32,15	22,08	0,0009	10,07	-0,06
No:19 / zayıf	33,18	23,05	0,0009	10,13	
No:20 / iyi	30,37	21,82	0,0027	8,55	-1,70
No:20 / zayıf	33,67	23,42	0,0008	10,25	

Çizelge 4.7. *VCAN* geninin *UBC* referans genine göre ifade seviyesinin hesaplaması

	VCAN ortalama Ct (hedef)	UBC ortalama Ct (ref)	Hedef gen / referans gen	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$
No:1 / iyi	26,53	23,98	0,1712	2,55	0,99
No:1 / zayıf	26,66	25,10	0,3394	1,56	
No:2 / iyi	26,40	24,84	0,3391	1,56	-0,23
No:2 / zayıf	27,81	26,02	0,2889	1,79	
No:3 / iyi	26,55	25,76	0,5789	0,79	-0,52
No:3 / zayıf	30,11	28,81	0,4048	1,30	
No:4 / iyi	25,52	22,78	0,1490	2,74	0,63
No:4 / zayıf	26,32	24,21	0,2310	2,11	
No:5 / iyi	26,21	25,11	0,4670	1,1	0,16
No:5 / zayıf	24,35	23,41	0,5210	0,94	
No:6 / iyi	24,09	23,15	0,5210	0,94	-0,07
No:6 / zayıf	24,88	23,87	0,4970	1,01	
No:7 / iyi	25,56	22,51	0,1200	3,06	-0,65
No:7 / zayıf	25,28	21,58	0,0765	3,71	
No:8 / iyi	24,70	22,80	0,2666	1,91	-0,14
No:8 / zayıf	24,77	22,73	0,2424	2,04	
No:9 / iyi	24,24	21,35	0,1350	2,89	-0,11
No:9 / zayıf	25,07	22,07	0,1249	3,00	
No:10 / iyi	24,86	22,96	0,2686	1,90	-1,09
No:10 / zayıf	26,17	23,18	0,1261	2,99	
No:11 / iyi	24,73	21,37	0,0973	3,36	1,00
No:11 / zayıf	24,16	21,80	0,1948	2,36	
No:12 / iyi	32,87	28,81	0,0597	4,07	0,38
No:12 / zayıf	33,16	29,48	0,0776	3,69	
No:13 / iyi	24,36	21,30	0,1197	3,06	0,46
No:13 / zayıf	24,28	21,68	0,1646	2,60	
No:14 / iyi	28,00	24,36	0,0800	3,64	0,10
No:14 / zayıf	28,11	24,56	0,0855	3,55	
No:15 / iyi	30,60	29,95	0,6351	0,65	-2,05
No:15 / zayıf	33,27	30,57	0,1535	2,70	
No:16 / iyi	25,05	22,10	0,1297	2,95	-0,10
No:16 / zayıf	28,42	25,38	0,1212	3,04	
No:17 / iyi	26,99	23,73	0,1043	3,26	-0,11
No:17 / zayıf	29,21	25,83	0,0964	3,37	
No:18 / iyi	25,93	22,16	0,0733	3,77	1,51
No:18 / zayıf	24,43	22,17	0,2087	2,26	
No:19 / iyi	25,80	22,08	0,0760	3,72	0,26
No:19 / zayıf	26,50	23,05	0,0912	3,46	
No:20 / iyi	25,11	21,82	0,1025	3,29	0,58
No:20 / zayıf	26,13	23,42	0,1535	2,70	

Çizelge 4.8. *PTGS2* geninin UBC referans genine göre ifade seviyesinin hesaplaması

	<i>PTGS2</i> ortalama Ct (hedef)	<i>UBC</i> ortalama Ct (ref)	Hedef gen / referans gen	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$
No:1 / iyi	27,63	23,98	0,0801	3,64	0,06
No:1 / zayıf	28,68	25,10	0,0836	3,58	
No:2 / iyi	28,05	24,84	0,1075	3,22	-0,35
No:2 / zayıf	29,59	26,02	0,0842	3,57	
No:3 / iyi	26,06	25,76	0,8124	0,30	-2,16
No:3 / zayıf	31,26	28,81	0,1822	2,46	
No:4 / iyi	27,44	22,78	0,0395	4,66	-0,63
No:4 / zayıf	29,5	24,21	0,0256	5,29	
No:5 / iyi	28,88	25,11	0,0733	3,77	1,81
No:5 / zayıf	25,37	23,41	0,2570	1,96	
No:6 / iyi	23,94	23,15	0,5780	0,79	-0,66
No:6 / zayıf	25,32	23,87	0,3660	1,45	
No:7 / iyi	26,96	22,51	0,0457	4,45	-0,86
No:7 / zayıf	26,88	21,58	0,0253	5,31	
No:8 / iyi	25,88	22,80	0,1183	3,08	0,89
No:8 / zayıf	24,91	22,73	0,2200	2,18	
No:9 / iyi	25,86	21,35	0,0438	4,51	-0,60
No:9 / zayıf	27,19	22,07	0,0289	5,11	
No:10 / iyi	25,72	22,96	0,1474	2,76	-0,50
No:10 / zayıf	26,45	23,18	0,1040	3,27	
No:11 / iyi	28,57	21,37	0,0068	7,20	1,28
No:11 / zayıf	27,72	21,80	0,0164	5,93	
No:12 / iyi	34,25	28,81	0,0229	5,45	-1,62
No:12 / zayıf	36,54	29,48	0,0075	7,07	
No:13 / iyi	23,50	21,30	0,2177	2,20	0,84
No:13 / zayıf	23,04	21,68	0,3894	1,36	
No:14 / iyi	28,82	24,36	0,0454	4,46	0,58
No:14 / zayıf	28,44	24,56	0,0678	3,88	
No:15 / iyi	32,02	29,95	0,2369	2,08	-2,15
No:15 / zayıf	34,80	30,57	0,0534	4,23	
No:16 / iyi	24,35	22,10	0,2101	2,25	-0,17
No:16 / zayıf	27,79	25,38	0,1871	2,42	
No:17 / iyi	28,12	23,73	0,0476	4,39	-0,72
No:17 / zayıf	30,95	25,83	0,0288	5,12	
No:18 / iyi	25,11	22,16	0,1297	2,95	-0,07
No:18 / zayıf	25,18	22,17	0,1239	3,01	
No:19 / iyi	26,61	22,08	0,0431	4,54	0,02
No:19 / zayıf	27,56	23,05	0,0437	4,52	
No:20 / iyi	26,00	21,82	0,0554	4,17	-1,57
No:20 / zayıf	29,17	23,42	0,0187	5,74	

Çizelge 4.9. Gönüllülere ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

	GENLER $2^{-\Delta\Delta Ct}$			SONUÇ
	<i>ITPKA</i>	<i>VCAN</i>	<i>PTGS2</i>	
Gönüllü no:1	1,28	0,50	0,96	GEBE
Gönüllü no:2	1,13	1,17	1,28	-
Gönüllü no:3	1,86	1,43	4,46	GEBE
Gönüllü no:4	0,63	0,65	1,55	GEBE
Gönüllü no:5	0,57	0,90	0,29	-
Gönüllü no:6	1,59	1,05	1,58	GEBE
Gönüllü no:7	0,99	1,57	1,81	
Gönüllü no:8	1,64	1,10	0,54	GEBE
Gönüllü no:9	1,17	1,08	1,51	-
Gönüllü no:10	1,49	2,13	1,42	GEBE
Gönüllü no:11	0,88	0,50	0,41	-
Gönüllü no:12	1,95	0,77	3,08	-
Gönüllü no:13	0,76	0,73	0,56	-
Gönüllü no:14	0,89	0,94	0,67	-
Gönüllü no:15	2,12	4,14	4,44	-
Gönüllü no:16	0,98	1,07	1,12	GEBE
Gönüllü no:17	1,17	1,08	1,65	-
Gönüllü no:18	0,67	0,35	1,05	GEBE
Gönüllü no:19	1,04	0,83	0,99	-
Gönüllü no:20	3,24	0,67	2,96	-

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda; gönüllülerin tedavi sonucunda geliştirdikleri en iyi kaliteli embriyo ile en zayıf kaliteli embriyoların kümülüs hücrelerindeki *ITPKA*, *VCAN*, *PTGS2* gen ifade seviyelerinde anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir (p değeri < 0,005 anlamlılık düzeyi). İstatistiksel değerlendirme sonuçları Çizelge 4.10’da verilmiştir.

ITPKA geninin kümülüs hücrelerindeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde iyi morfolojili embriyolarda ΔCt değeri 8,81 iken zayıf morfolojili embriyolarda 9,05 olarak

hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ise 1,18 olarak hesaplanmıştır. *ITPKA* geninde p değeri 0,11 olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle örneklem sayısı artırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık kazanabilme olasılığının olabileceği düşünülmektedir. *ITPKA* geninin ifadesi iyi kalite embriyoda zayıf kaliteli embriyoya oranla 1,18 kat artmıştır.

VCAN geninin ifade seviyesi değerlendirildiğinde iyi morfolojili embriyolarda ΔCt değeri 2,56 iken zayıf morfolojili embriyolarda 2,50 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ise 0,95 olarak hesaplanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p=0,78$; p değeri $< 0,005$ anlamlılık düzeyi).

PTGS2 geninin ifade seviyesi değerlendirildiğinde iyi morfolojili embriyolarda ΔCt değeri 3,54 iken zayıf morfolojili embriyolarda 3,87 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ise 1,25 olarak hesaplanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p=0,19$; p değeri $< 0,005$ anlamlılık düzeyi).

Çizelge 4.10. Gönüllülerin iyi kaliteli ve zayıf kaliteli embriyolarının kümülüs hücrelerindeki *ITPKA*, *VCAN*, *PTGS2* gen ifade seviyelerinin değerlendirilmesi

	<i>ITPKA</i>			<i>VCAN</i>			<i>PTGS2</i>		
	İyi Kalite (ΔCt)	Zayıf Kalite (ΔCt)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	İyi Kalite (ΔCt)	Zayıf Kalite (ΔCt)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	İyi Kalite (ΔCt)	Zayıf Kalite (ΔCt)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Ortalama (Std Dv.)	8,81 $\pm$ 1,64	9,05 $\pm$ 1,29	1,18	2,56 $\pm$ 1,07	2,50 $\pm$ 0,87	0,95	3,54 $\pm$ 1,59	3,87 $\pm$ 1,61	1,25
p değeri	0,11			0,78			0,19		

Tedavi sonuçlarına göre gebe olan ve olmayan gruplarda yaptığımız değerlendirmede; ilgili gen ifadeleri açısından zayıf morfolojiye sahip embriyoya oranla iyi embriyoların oositinden elde edilen kümülüs hücrelerindeki ifade farklılığı Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

ITPKA geninin gebe olan gönüllülerdeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde iyi morfolojili embriyolarda ΔCt değeri 8,75 iken zayıf morfolojili embriyolarda 8,99 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ise 1,18 olarak hesaplanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,24$; p değeri $< 0,005$ anlamlılık düzeyi). *VCAN* geninin gebe olan gönüllülerdeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde iyi morfolojili embriyolarda ΔCt değeri

2,12 iken zayıf morfolojili embriyolarda 2,01 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta ct}$ değeri ise 0,92 olarak hesaplanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,69$; p değeri $<0,005$ anlamlılık düzeyi). *PTGS2* geninin gebe olan gönüllülerdeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde iyi morfolojili embriyolarda ΔCt değeri 2,62 iken zayıf morfolojili embriyolarda 3,02 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta ct}$ değeri ise 1,31 olarak hesaplanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,18$; p değeri $<0,005$ anlamlılık düzeyi).

ITPKA geninin gebe olmayan gönüllülerdeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde iyi morfolojili embriyolarda ΔCt değeri 8,86 iken zayıf morfolojili embriyolarda 9,10 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta ct}$ değeri ise 1,18 olarak hesaplanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,29$; p değeri $<0,005$ anlamlılık düzeyi). *VCAN* geninin gebe olmayan gönüllülerdeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde iyi morfolojili embriyolarda ΔCt değeri 2,91 iken zayıf morfolojili embriyolarda 2,91 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta ct}$ değeri ise 1,00 olarak hesaplanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,99$; p değeri $<0,005$ anlamlılık düzeyi). *PTGS2* geninin gebe olmayan gönüllülerdeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde iyi morfolojili embriyolarda ΔCt değeri 4,29 iken zayıf morfolojili embriyolarda 4,56 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta ct}$ değeri ise 1,20 olarak hesaplanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,49$; p değeri $<0,005$ anlamlılık düzeyi).

Çizelge 4.11. Gönüllülerin iyi kaliteli ve zayıf kaliteli embriyolarının kümülüs hücrelerindeki *ITPKA*, *VCAN*, *PTGS2* gen ifade seviyelerinin tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi

	<i>ITPKA</i>			<i>VCAN</i>			<i>PTGS2</i>		
	İyi Kalite (ΔCt)	Zayıf Kalite (ΔCt)	$2^{-\Delta\Delta ct}$	İyi Kalite (ΔCt)	Zayıf Kalite (ΔCt)	$2^{-\Delta\Delta ct}$	İyi Kalite (ΔCt)	Zayıf Kalite (ΔCt)	$2^{-\Delta\Delta ct}$
GEBE OLAN Ortalama (Std Dv.)	8,75 $\pm$ 1,46	8,99 $\pm$ 1,16	1,18	2,12 $\pm$ 0,97	2,01 $\pm$ 0,69	0,92	2,62 $\pm$ 0,13	3,02 $\pm$ 1,09	1,31
p değeri	0,24			0,69			0,18		
GEBE OLMAYAN Ortalama (Std Dv.)	8,86 $\pm$ 1,84	9,10 $\pm$ 1,44	1,18	2,91 $\pm$ 1,06	2,91 $\pm$ 0,80	1,00	4,29 $\pm$ 1,39	4,56 $\pm$ 1,68	1,20
p değeri	0,29			0,99			0,49		

Çalışmamızda 20 gönüllünün tamamına transfer günü tek ve birinci kalite embriyo transferi yapılmıştır. Gebeliklerin tamamı birinci kalite embriyolardan elde edilmiştir. Transferi yapılan iyi kaliteli embriyoların kümülüs hücrelerindeki ilgili genlerin ifadesi ile gebelik durumları arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.12’de gösterilmiştir.

ITPKA geninin gebe olan gönüllülerin transfer edilen embriyolarını geliştiren kümülüs hücrelerindeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde, ΔCt değeri 8,63 iken gebe olmayan gönüllülerin ΔCt değeri 8,94 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ise 1,24 olarak hesaplanmıştır. Transfer yapılan iyi kaliteli embriyolarda *ITPKA* geninin ifade farklılığına bakıldığında; gebe olanlarda gebe olmayanlara oranla anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir ($p=0,89$; p değeri $<0,005$ anlamlılık düzeyi).

VCAN geninin gebe olan gönüllülerin transfer edilen embriyolarını geliştiren kümülüs hücrelerindeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde, ΔCt değeri 2,19 iken gebe olmayan gönüllülerin ΔCt değeri 2,81 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ise 1,54 olarak hesaplanmıştır. *VCAN* geninde p değeri 0,10 olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle örneklem sayısı artırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık kazanabilme olasılığının olabileceği düşünülmektedir. Transfer edilen iyi kaliteli embriyolarda gen ifadesi gebe olanlarda olmayanlara oranla 1,54 kat artmıştır.

PTGS2 geninin gebe olan gönüllülerin transfer edilen embriyolarını geliştiren kümülüs hücrelerindeki ifade seviyesi değerlendirildiğinde, ΔCt değeri 2,55 iken gebe olmayan gönüllülerin ΔCt değeri 4,20 olarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ise 3,14 olarak hesaplanmıştır. *PTGS2* geninde ifade farklılığı gebe olan grupta olmayana göre anlamlı olarak artmıştır ($p=0,01$; anlamlılık düzeyi $p>0,05$). İyi kaliteli embriyolarda gen ifadesi gebe olanlarda olmayanlara oranla 3,14 kat artmıştır. Bu gen ifadesindeki 3,18 katlık artışın gebelik tahmininde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşünülmektedir.

Çizelge 4.12. Gönüllülerin transfer yapılan embriyolarının kümülüs hücrelerindeki *ITPKA*, *VCAN*, *PTGS2* gen ifade seviyelerinin tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi

	<i>ITPKA</i>			<i>VCAN</i>			<i>PTGS2</i>		
	Gebe Olan (ΔCt)	Gebe Olmayan (ΔCt)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Gebe Olan (ΔCt)	Gebe Olmayan (ΔCt)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Gebe Olan (ΔCt)	Gebe Olmayan (ΔCt)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Ortalama (Std Dv.)	8,63 $\pm$ 1,46	8,94 $\pm$ 1,84	1,24	2,19 $\pm$ 0,97	2,81 $\pm$ 1,06	1,54	2,55 $\pm$ 1,35	4,20 $\pm$ 1,39	3,14
p değeri	0,89			0,10			0,01*		



5. TARTIŞMA

Folikülogenez ve oosit olgunlaşması çok sıkı düzenlenmiş ve karmaşık gelişim yollarıdır. Oosit ve onu çevreleyen kümülüs hücreleri hem yapısal hem de fonksiyonel bir değişim geçirerek ovulasyon ve fertilizasyon için hazırlanırlar. Bu yollar fare, inek, primat gibi birçok hayvan grubunda çalışılmış olmasına rağmen insan verileri kısıtlıdır [89]. IVF tedavisinde canlılığı en yüksek olan embriyoyu transfer için seçmek hem medikal hem sosyal hem de ekonomik fayda sağlayacaktır [153].

Bu güne kadar IVF tedavilerinde embriyo seçimi kutup cisimciği yapısı, zona pellusida ve sitoplazma görüntüsü gibi morfolojik karakterlere göre yapılmaktaydı. Buna rağmen morfolojik değerlendirme oosit yeterliliği ve embriyo kalitesi hakkında güvenilir bir tahmin sağlayamamaktadır [75]. Oosit gelişiminin sağlıklı bir şekilde tamamlanması, folikül mikro çevresinin kalitesine ve karşılıklı olarak devam eden hücre iletişiminin devamlılığına bağlıdır [75, 97, 154, 155]. Dolayısıyla embriyo kalitesini değerlendirecek yeni parametre arayışı içerisinde kümülüs hücreleri değerli bir veri sunmaktadır.

Yapılan birçok çalışmada seçilen aday genlerin kümülüs hücrelerindeki ifade seviyesinin oosit olgunlaşması [10, 13, 15, 17], embriyo canlılığı [10, 13, 15, 17, 152, 156-158], gebelik [10, 11, 13, 152, 157, 159, 160] ve canlı doğumla [19, 152] ilişkisi değerlendirilmiştir.

Biz de yaptığımız bu çalışmada *ITPKA*, *VCAN* ve *PTGS2* genlerinin kümülüs hücrelerindeki ifade seviyesi ile embriyo morfolojisi ve gebelik geliştirme potansiyelleri arasındaki ilişkiyi qPCR kullanarak değerlendirdik. Seçilen genler oosit tarafından gelen sinyallerle düzenlenen ve kümülüs genişlemesinde, gonadotropin sentezinde, hücre içi Ca^{+2} metabolizmasında önemli fonksiyonlarda görev almaktadır. *ITPKA* hücre içi ikinci habercilerden olup Ca^{+2} metabolizmasında görevlidir. Ca^{+2} oosit aktivasyonunda oldukça önemli olan bir iyonudur. Döllenme için spermin zona pellusidaya temas etmesi sonucu oosit sitoplazmasında birçok metabolik ve fiziksel değişiklik meydana gelir. Bunların en başında hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artması ve mayozun tamamlanması gelmektedir [74]. Versikan kümülüs-oosit kompleksinin ana bileşenlerinden bir proteoglikan olup hücre dışı matrikste yer alan hyaluronana bağlanarak onu stabilize eder [161]. *PTGS2* geni prostaglandin sentezini yapan *PTGS2* enzimini kodlar. Ovulasyondan birkaç saat önce enzim seviyesi yükselmeye başlar ve kümülüs genişlemesini tetikler. *PTGS2* geni susturulmuş olan

farelerde mayozun yeniden başlatılmasında hatalar, ovulasyon ve fertilizasyon bozuklukları meydana geldiği gösterilmiştir [162].

Çalışmalarda yapılan metodolojik ve biyolojik farklılıkların kümülüs hücrelerindeki genlerin ifade profillerini etkiliyor olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamıza 35 yaş altındaki açıklanamayan infertilite tanısı almış olan gönüllüleri dâhil edilmiştir. Tedavide kullanılan gonadotropinlerin türü gen ifade seviyesini etkilediği için [51, 163] çalışmaya dâhil edilen tüm gönüllülere aynı protokol uygulanmış ve tedavi sonunda da tek embriyo transfer yapılmıştır. Polikistik over sendromu, endometriozis gibi kümülüs hücrelerindeki gen ifade seviyesinin normal hastalara oranla farklı olduğu gösterildiğinden [39] yalnız çalışmamıza sadece açıklanamayan infertilite tanısı almış olan hastaları dâhil edilmiştir

Yaptığımız çalışmada;

İlk olarak; kümülüs hücrelerindeki *ITPKA*, *VCAN*, *PTGS2* genlerinin ifade seviyeleri değerlendirildiğinde embriyo morfolojisi açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p değeri<0,005 anlamlılık düzeyi). *ITPKA* geninde diğer iki genden farklı olarak örneklem sayısı arttırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık kazanabilme olasılığı gözlenmiştir (p=0,109).

İkinci olarak; Tedavi sonuçlarına göre gebe olan ve olmayan gruplarda yaptığımız değerlendirmede; ilgili gen ifadeleri açısından zayıf embriyoya oranla iyi embriyoların oositinden elde edilen kümülüs hücrelerinde anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır (p>0,05).

Son olarak; Çalışmamıza katılan gönüllülerin tamamına transfer günü tek ve birinci kalite embriyo transferi yapılmıştır. Gebeliklerin tamamı birinci kalite embriyolardan elde edilmiştir. Transferi yapılan iyi kaliteli embriyoların kümülüs hücrelerindeki ilgili genlerin ifadesi ile gebe olup olmama durumu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Buna göre gebe olanlarda olmayanlara oranla *ITPKA* geninde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır (p= 0,89; p değeri < 0,005 anlamlılık düzeyi).

VCAN geninde ise p değeri % 10 anlamlı olma eğilimi göstermiştir ($p= 0,10$). Örneklem sayısı arttırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık kazanabilme olasılığı olabilir. İyi kaliteli embriyolarda *VCAN* geninin ifadesi gebe olanlarda olmayanlara oranla 1,54 kat artmıştır.

İyi kaliteli embriyoların kümulus hücrelerinde *PTGS2* gen ifadesi gebe olanlarda olmayanlara oranla 3,14 kat artmıştır. İyi morfolojiye sahip olan embriyonun gebelik geliştirme potansiyelini değerlendirmede *PTGS2* geninin kümülüs hücrelerindeki artmış ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0,01$; anlamlılık düzeyi $p>0,05$). *PTGS2* geni oositin salgılanan *GDF9* büyüme faktörü ile düzenlendiği için bu genin ifadesinin oositin kapasitesini yansıtabildiği düşünülmektedir. Aynı zamanda ovulasyon ve fertilizasyonda da aktif görev almaktadır [162]. *PTGS2* enzimi prostaglandin biyosentezinde anahtar enzimdir. Prostaglandinler de embriyoların implantasyonunda hayati rol oynar. İmplantasyon öncesi ve esnasında prostaglandin sentezinin engellenmesi implantasyonun gecikmesine ya da desidual dokunun incelmeye neden olur [164]. Farelerde *PTGS2* eksikliği implantasyon başarısızlığına neden olduğu gösterilmiş. *PTGS2* enzimi ile sentezlenen prostasiklinlerin farelerde implantasyon için gereklidir [162]. Bu gen ifadesindeki 3,14 katlık artış gebelik tahmininde güçlü bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Sonuçlarımız Gebhard ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile desteklenmektedir. Gebhard ve arkadaşları yaptıkları 38 IVF hastasının katıldığı çalışmada; tek embriyo transferi sonrasında elde edilen gebeliklerde kümülüs hücrelerindeki metabolik aktivitelerde (*ALDOA*, *LDHA*, *PFKP*, *PKM2*), sinyal mekanizmasında (*AHR*, *GREM1*, *PTGS2*, *STS*) ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinde yer alan (*HAS2*, *PTX3*, *TNFAIP6*, *VCAN*) genlerin ifade seviyeleri araştırılmıştır. Çalışmada aynı zamanda oositlerden elde edilen kümülüs hücreleri geliştirdikleri embriyo morfolojisi bakımından da düşük ve yüksek kalite olacak şekilde ikili karşılaştırılmıştır. Sonuçta *VCAN* (3,2 kat yüksek (0,46:0,16) ve *PTGS2* (3,1 kat yüksek (0,34:0,11) gen ifadesi canlı doğum yapan hastalarda anlamlı olarak yüksek çıkarken diğer genlerin ifadelerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. İncelenen hiçbir gende embriyo morfolojisi açısından anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir. Aynı çalışmada ayrıca doğum ağırlığı ile *VCAN*, *GREM1* ve *PFKP* genlerinin ifade seviyeleri arasında da bir korelasyon tespit edilmemiştir [19].

Benzer bir çalışma McKenzie ve arkadaşları tarafından yapılmış fakat morfolojik parametrelerle gen ifade seviyesi arasında bu kez anlamlı fark bulunmuştur. Bu çalışmada 8 IVF hastasının 108 oositinden elde edilen iyi kaliteli embriyo geliştiren oositlerin kümülüs hücreleri ile zayıf kaliteli embriyo geliştiren oositlerin kümülüs hücreleri *HAS2*, *PTGS2* ve *GREM1* genlerinin ifade seviyeleri açısından karşılaştırılmıştır. İyi kaliteli embriyolarda *PTGS2* ve *HAS2* genlerinin ifade seviyeleri zayıf kaliteli embriyolara oranla 6 kat artış gösterirken *GREM1* geninde 15 kat artış gösterilmişti [15]. Bu çalışmadaki kümülüs hücrelerindeki *PTGS2* geninin ifadesinin embriyo morfolojisi ile gösterdiği pozitif korelasyon bizim çalışmamızda tekrarlanamamıştır.

Feuerstein ve arkadaşlarının yaptığı; oositlerin bireysel olarak nükleer olgunlukları ve yeterliliklerinin değerlendirildiği gen ifade çalışmasında seçilen genler oosit olgunlaşmasıyla ilgili bulunurken, morfolojik parametreler gen ifadesinden bağımsız bulunmuştur. Seçilen genler; *STAR*, *PTGS2*, *AREG*, *SCD1*, *SCD5*, *CX43* olup, nükleer olgunlaşmayla korele bir şekilde artmış ifade gösterirken, ikinci gün embriyo morfolojisinden bağımsız bulunmuştur. Beşinci güne ulaşan embriyolarda ise azalan bir ifade seviyesi gözlenmiştir [10]. Yazarlar bu duruma dayanarak çalışmada değerlendirilen genlerin ifade seviyeleri oosit gelişiminden ve embriyo gelişimi boyunca değişebileceğini de öne sürmüşlerdir. Bu tez çalışmasında ise *PTGS2* geninin ifadesi ile iyi kaliteli embriyo morfolojisi arasında ilişki bulunmamıştır.

Adriaenssens ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada daha önce fare ve insan üzerinde yaptıkları mikroarray çalışmasının sonuçlarına dayanarak seçtikleri ovulatuar LH cevabıyla ilgili olan 10 aday gen belirlemiş ve bu genlerin kümülüs hücrelerindeki ifadesini qPCR ile değerlendirmişlerdir [18]. Çalışmaya dâhil edilen ve iki farklı indüksiyon protokolü uygulanan (GnRH agonisti + HP-hMG/ rFSH) 63 hastanın değerlendirmesi için 13 adet sitümlasyon parametresi (yaş, BMI, stimulasyon süresi, ovaryan cevap vb.) ve oosit değerlendirme parametresi (oosit olgunlaşması, üçüncü gün embriyo morfolojisi vb.) belirlenmiş ve kayıt altına alınmıştır. Değerlendirilen genler *HAS2* (Hyaluronan synthase), *VCAN*, *SDC4* (Syndecan 4), *ALCAM* (Activated leukocyte cell adhesion molecule), *GREM1* (Gremlin 1), *PTGS1* (Prostaglandin-endoperoxide synthase 1), *PTGS2*, *DUSP16* (Dual specificity phosphatase 16), *SPROUTY4* (Sprouty homolog 4), *RPS6KA2*'dir (Ribosomal protein S6 kinase, 90 kDa, polypeptide 2). Yapılan değerlendirme sonucunda farklı ifade seviyesi ile ilgili üç değişken (yaş, VKİ, serum FSH seviyeleri) belirlenmiştir. *VCAN* geninin

rFSH grubunda oosit olgunlaşması negatif korelasyon gösterirken diğer grupta herhangi bir ilişki göstermemiştir. *ALCAM* ve *GREM1* geninin ifadesi, embriyonun üçüncü gündeki iyi morfolojisi ile tedavi protokolünden bağımsız olarak pozitif olarak ilişkili bulunmuştur. Çalışmada gösterilmiştir ki; kümülüs hücrelerindeki ovulasyonla ilişkili genlerin ifadeleri oosit kapasitesini etkilemekte ve hastaya uygulanan tedavi protokollerine göre de değişkenlik göstermektedir [18]. Bu nedenle bu çalışmada tüm hastalara antogonit protokol uygulanmıştır

Wathlet ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada GnRH antagonisti + rFSH veya GnRH agonisti + HP-hMG ile iki farklı ilaç protokolüyle yapılan IVF tedavisindeki hastaların ICSI yapılan oositlerinin kümülüs hücrelerinde gen ifade analizi değerlendirilmiştir. Daha önce sonuçlarını yayınlamadıkları mikroarray çalışmasının yönlendirmesiyle 8 aday gen -*SDC4* (Syndecan), *PTGS2*, *ALCAM* (activated leukocyte cell adhesion molecule), *GREM1*, *TRPM7* (transient receptor potential cation channel, subfamily M member 7), *CALM2* (Calmodulin 2), *ITPKA* belirlemiştir. Sonuçlar hem kullanılan KOH protokolüne göre hem de hasta içi varyasyona göre değerlendirip, oosit yeterliliği ve embriyo gelişimi ile ilişkilendirmişlerdir. Sonuç olarak olgun oositlerden elde edilen kümülüs hücrelerinde yüksek *PTGS2*, düşük *VCAN* ifadesi tespit etmişlerdir. *VCAN* dışındaki tüm genlerin ifade seviyelerinin 3/5. gün embriyo morfolojisiyle pozitif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Her iki stimülasyon programı için farklı tahmin modelleri öne sürmüşlerdir. Her iki grupta da en kaliteli bölünme evresi embriyosu seçimi için *TRPM7* ve *ITPKA* genlerinin, gebelik tahmini için ise *SDC4* ve *VCAN* genlerinin ifade seviyesi en iyi belirteç olarak öne çıkmıştır. Önerdikleri bu model ile %70 duyarlılık, %90 özgüllük ile gebelik tahmini elde ettiğini belirtmektedirler [17].

Aynı grubun yaptığı bir sonraki çalışmada kümülüs hücrelerinde bu kez 11 gen ifadesi gebe olan ve olmayan iki grup arasında karşılaştırılmıştır. İki grup arasında *VCAN* geninin ifadesinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken, *EFNB2* (EphrinB2), *ITPKA* and *CAMK1D* (calcium/calmodulin dependent protein kinase 1D) genlerinin ifadesi gebe olanlarda anlamlı olarak fazla bulunmuştur. Araştırmacılar bir kez daha tahmin modeli geliştirerek, canlı doğum ihtimalini değerlendirmek için *EFNB2*, *CAMK1D* ve *STC2* (Stanniocalcin-2) genlerini önermişlerdir [152]. Bu grup yaptığı çalışmalarla transkript ifadesine dayalı tahmin oluşturmalarının yanında bu ifadelerin hormon seviyeleri, stimülasyon protokolleri gibi klinik verilerle birleştirerek daha güçlü modeller sunmuşlardır.

Embriyo kültürünün kamera yardımıyla sürekli kayıt altına alındığı embriyo izleme sistemiyle takip edilen beşinci gün embriyoları ile bu embriyoları geliştiren oositlerden elde edilen kümülüs hücrelerindeki gen ifade profilleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir başka çalışmada; her ne kadar kümülüs hücrelerindeki ekspresyon ile morfoloji arasında bazı genlerde anlamlı farklılıklar gözlenmiş olsa da embriyo izleme sisteminin belirteçleriyle korelasyon göstermediği görülmüştür [150]. Yapılan çalışmada seçilen kümülüs hücrelerindeki enerji metabolizmasında, sinyalizasyonda, hücre stresinde, steroidogeneizde görev alan 31 aday genin ifade seviyeleri araştırılmıştır. Kümülüs hücrelerindeki ifade profilleriyle beşinci gün embriyo morfolojisi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde enerji metabolizmasında yer alan ATP6VIA (ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A) gen ifadesinde iyi kaliteli embriyolarda artan bir ifade söz konusu iken, hücre stresinde görev alan HSPA5 (heat shock protein 5) geni, kümülüs genişlemesinde görev alan VCAN geninde iyi kaliteli embriyolarda azalan bir ifade tespit edilmiştir. Embriyo izleme parametreleri ile kümülüs hücrelerindeki ifade profilleri karşılaştırıldığında, pronükleusların yıkılması, üç hücreye bölünme zamanı ile *PTGS2* geninin ifadesi pozitif korelasyon göstermiştir [150]. Fakat her iki seçim yönteminin birlikte öne çıkardığı anlamlı bir değerlendirme bulunamamıştır.

Scarica ve ekibinin yaptığı çalışmada daha önceki çalışmalarda [10, 15] iyi embriyo kalitesi ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenen genlerden olan *PTGS2* ve *HAS2* genleri ve *EFNB2*, *CAMK1D* ve *STC1* genlerinin de eklenmesiyle oluşturdukları gen kümesinin 18 IVF hastasından (>37±4 yaş) elde edilen 75 kümülüs kompleksindeki ifade motifleri ile *in-vitro* blastosist gelişimi arasındaki korelasyonu araştırmışlardır. Embriyolar time-lapse kültür sistemi ile beşinci güne kadar takip edilmiştir. Gelişen embriyoların 33'ünün gelişimi duraklarken, 42'si blastosist aşamasına ulaşmıştır. Aynı zamanda blastosistlerin kromozomal yapıları da değerlendirilmiştir. Blastosistlerin %50'sinin anöploidi taşıdığı belirlenmiştir. qPCR sonuçlarına göre gelişim duraklaması olan embriyolarda *PTGS2*, *HAS2* ve *CAMK1K* genlerinde anlamlı olarak az ifadelenme gözlenmiştir. Öploid ve anöploid blastosistler arasında gen ifadelerinde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir [165].

Shen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise; 48 IVF hastasının 354 oosit-kümülüs kompleksinde seçilen 10 genin ifade seviyelerini değerlendirmişlerdir. Değerlendirilen genler glikoz metabolizmasında (*PFKF*, *PKM2*, *LDHA* ve *GFPT*) ve kümülüs genişlemesinde (*HAS2*, *VCAN*, *TNFAIP6*, *PTGS2*, *PTX3*, *SDC4*) görev alan genlerin

arasından seçilmiştir. Gen ifadeleri ile oosit maturasyonu, fertilizasyon, embriyo morfolojisi, implantasyon, hasta yaşı ve VKİ arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmışlardır. Glikolitik genlerden *PFKP*, *PKM2* matur oositlerde artmış ifade izlenirken diğer genlerde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Oosit maturasyonu esnasındaki enerji ihtiyaçları kümülüs hücreleri tarafından karşılandığı için kümülüs hücrelerinde glikolitik enzimlerin ifadesinin artması anlamlıdır. Literatürün aksine aynı korelasyon embriyo kalitesiyle kurulamamıştır. *VCAN* gen ifadesi ise matür oositlerde azalmıştır. *VCAN* ifadesi FSH, LH ve HCG hormonları ile düzenlendiği için kümülüs hücrelerindeki transkripsiyonu önce artar sonrasında azalır. Bu nedenle matur oositin kümülüs hücrelerinde azalmış *VCAN* ifadesi gözlenmiştir. Bununla beraber gen ifadesinin 3. gün embriyo morfolojisi ile pozitif korelasyon gösterirken, implante olan embriyolarda azaldığı gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında ise embriyo morfolojisiyle bir korelasyon bulunmamışken, gebelikle sonuçlanan hastalarda artmış ifade göstermiştir. Diğer genlerin ifade seviyeleri ile oosit maturasyonu, fertilizasyon, embriyo kalitesi ve implantasyon anlamlı bir farklılık saptanmamıştır [166].

Yapılan bir başka çalışmada *EFNB2*, *RGS2* ve *VCAN* genlerinin IVF tedavisinde gebelik tahmininde bir biyobelirteç olup olmadığı araştırılmış ve genlerde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir [151]. 43 kadından oluşan oldukça homojen bir çalışma grubunda tek embriyo transferi yapılmış, tedavi sonuçlarına göre gebelikle sonuçlanan ya da sonuçlanmayan embriyoları geliştiren oositlerin kümülüs hücrelerinde seçilen genlerin ifadeleri qPCR ile değerlendirilmiştir. *RGS2* ve *VCAN* genlerinin ifadesi gebe olan ve olmayan grup karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermezken, *EFNB2* geninde gebe olmayan grupta sınırda artmış bir ifade tespit edilmiştir. *VCAN* geninin ifadesi ile gebe olup olmama durumu arasındaki ilişki bizim çalışmamızla uyumlu olarak anlamlı bulunmamıştır.

Yapılan bir diğer çalışmada ICSI yapılan 75 kadının 674 oositinin kümülüs hücrelerinde *HAS2* (hyaluronin synthase 2), *PTGS2*, *BDNF* (bone morphogenetic proteins), *GREM1*, *TNFAIP6* (tumour necrosis factor- α -induced protein 6), *PTX3* (pentraxin 3) genlerinin ifade seviyelerine qPCR ile değerlendirmiştir. *PTGS2* geninin ifadesi olgun oositlerde artmış iken *BDNF* geni ise azalmıştır [13].

Hamel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada öncelikle bireysel olarak toplanan foliküler hücrelerde ifade edilen sekansları içeren mikroçipler kullanarak mikrodizin hibridizasyon

analizi yapmışlardır. Analiz sonuçlarından yola çıkarak qPCR ile çalışılacak aday genler belirlemişlerdir. IVF tedavisi yapılan 18 hastanın foliküler hücreleri bireysel olarak toplanmış ve işlem günü sıvı azotta dondurulmuştur. Kümülüs hücreleri de aynı şekilde bireysel olarak toplanmış ve dondurulmuştur. Tedavi sonrası gelişen embriyolar morfolojik kriterlere bakılarak değerlendirilmiş ve gebelikle sonuçlanan kaliteli embriyoların foliküler hücreleri bir havuzda toplanmış, morfolojisi zayıf olan gelişimin herhangi bir evresinde duraklamış olan embriyoların foliküler hücreleri de bir havuzda toplanmıştır. Seçilen 18 aday genin ifadeleri qPCR ile bu iki grup arasında değerlendirilmiştir. 18 gende 5 tanesi-FDX1 ($P = 0.0203$), CYP19A1 ($P = 0.0359$), CDC42 ($P = 0.0396$), SERPINE2 ($P = 0.0499$) ve 3bHSD 1 ($P = 0.0078$)- morfolojisi iyi olan grupta istatistiksel olarak anlamlı artmış ifade söz konusuken diğer 8 gende fark bulunamamıştır [11]. Bu 5 genin oosit yeterliliği ile ilgili olarak biyobelirteç olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Aynı grup yaptıkları bir diğer çalışmada bu kez 18 IVF hastasının gebelik geliştiren embriyolarının folikül hücrelerini bir havuzda, geliştirmeyenlerin folikül hücrelerini bir havuzda toplayarak benzer çalışmayı tekrarlamışlardır. Öncesinde yapılan mikro dizin çalışması sonrası 10 adet adet gen belirlenmiş ve bu genlerin ifadeleri qPCR’da değerlendirilmiştir. UGP2 (UDP-glucose pyrophosphorylase 2) ($p=0.0023$) ve PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain, family A, member 1) ($p=0.0461$) genleri başarılı bir gebelik için biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir [12].

Kümülüs hücrelerindeki gen ifade seviyesi ile bu hücre grubundan gelişen oositin geliştirdiği embriyo morfolojisi kombine olarak embriyo/oosit canlılığını değerlendirmede kullanılması özellikle mikroenjeksiyon yapılacak oosit sayısının yasal olarak sınırlandırıldığı ülkeler için oldukça ümit vermektedir [149]. Bazı ülkelerde mikroenjeksiyon yapılacak oositler işlem öncesi (İtalya gibi) rastgele seçilirken, bazılarında da döllenmiş oositlerden embriyo kültürü için embriyolar (Almanya, İsviçre) rastgele olarak seçilmektedir [167-169]. Türkiye’de 6 Mart 2010 tarihinde Resmi Gazete ’de yayımlanan Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları Ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri Hakkında Yönetmeliğinin 18. Maddesinin 8. Fıkrasının b bendine ‘Merkezlerde ÜYTE uygulamasında birden fazla embriyo transfer edilmemesi esastır. Ancak, 35 yaşa kadar birinci ve ikinci uygulamada tek embriyo, üçüncü ve sonraki uygulamalarda iki embriyo, 35 yaş ve üzerinde tüm uygulamalarda en fazla iki embriyo transfer edilebilir’ ifadesi ile IVF tedavilerinde transfer edilen embriyolara yasal kısıtlama getirilmiştir [170].

Ekart ve arkadaşlarının yaptığı retrospektif analize dayalı bir çalışmada kümülüs hücrelerindeki gen ifade seviyelerinin oositleri değerlendirmedeki başarısı, kümülüs-oosit kompleksinin morfolojik değerlendirmesi [171], embriyo kültür ortamının metabolomik profili [172] gibi şimdiye kadar sunulan diğer alternatiflere oranla daha yüksek bir kesinlik ile sonuçlandığını göstermiştir [149]. Türkiye'nin de aralarında bulunduğu yasal olarak zorunlu tek embriyo transferi yapılan ülkelerde gebelik olasılığını arttırmak için embriyo seçim kriterlerine belirlenen bazı genlerin kümülüs hücrelerindeki ifade seviyelerinin değerlendirilmesinin eklenmesi gebelik olasılığını arttırabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın güçlü olduğu yönleri olduğu gibi sınırlılıkları da söz konusudur. İfade profilini etkileyen bildiğimiz biyolojik ve klinik nedenleri dışlanmasıyla oluşturulan çalışma grubu oldukça homojen bir dağılım göstermektedir. Ayrıca tedavi sonunda yapılan tek embriyo transferi, embriyo gelişiminin bireysel olarak takip edilmesi, gelişen embriyonun köken aldığı oositi; dolayısıyla yapılan değerlendirme ile bu oositin yeterliliğinin tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. IVF tedavilerinde yapılan çoklu embriyo transferleri sonrası elde edilen tekil gebeliklerde gebeliğin hangi embriyodan geliştiğini tespit etmek neredeyse imkânsızdır. Böyle bir durumda gen ifadelerinin değerlendirilmesi spekülatif olmaktadır.

Çalışmamızın sınırlılığı ise çalışılan hücre grubundan ve çalışma grubunun büyüklüğünden kaynaklanmaktadır. Çalışmadaki kümülüs hücreleri çok sınırlı sayıda ve tekrarlanamaz şekilde elde edilmektedir. Sayıca az olan hücreden kaliteli RNA elde edebilmek çalışmanın sonuçlarını etkileyebilmektedir. Çalışmamız nispeten küçük bir örneklem boyutuna sahip idi. Bu nedenle gen ifadesindeki potansiyel küçük farklılıklar bazı genlerin değerlendirilmesinde tespit edilememiş olabilir. Belki daha büyük bir örneklem grubu analiz edilmiş olsa idi potansiyel farklılıklar tespit edilebilirdi. Bir gen IVF tedavilerinde bir biyobelirteç olarak kullanılacaksa sadece gebelik potansiyeline sahip embriyoların kümülüs hücrelerinde değil gelişen tüm embriyolarda değerlendirilmelidir. Gebelik söz konusu olduğunda morfolojik olarak düşük kaliteli olarak değerlendirilse bile her embriyonun bir gebelik potansiyeli olduğu unutulmamalıdır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre iyi kaliteli embriyoların kümülüs hücrelerindeki *PTGS2* geninin ifadesi gebe olanlarda gebe olmayanlara oranla 3,14 kat artmıştır. Bu gen ifadesindeki 3,14 katlık artışın gebelik tahmininde biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. İyi kaliteli embriyoların kümülüs hücrelerindeki *VCAN* geninin ifadesi

gebe olanlarda olmayanlara oranla 1,54 kat artmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı olmasa da örneklem sayısı arttırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık kazanabilme olasılığı olabilir. Türk popölasyonuunda yapılacak benzer çalışmaların daha fazla gönüllünün katılımıyla tekrarlanması gerekir. Buradan çıkacak paralel sonuçlarla iki gen embriyo seçim kriterlerine biyobelirteç olarak eklenebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

IVF laboratuvarlarında yeni transkriptomik ve biyoinformatik araçların uygulanması heyecan verici olsa da, uygulamaya geçmeden önce cevaplanması gereken bir takım sorular vardır. Klinik uygulama içerisinde, embriyo değerlendirmesi yapılabilmesi için embriyo transferine kadar olan sınırlı zaman çok iyi değerlendirilmelidir. Her oositten alınan kümülüs hücrelerinin tam bir transkriptomik profil elde etmek için mikrodizin analizine tabi tutulması uygulanabilir değildir. Bu durum embriyoloji laboratuvarına yüksek maliyetli özel donanım ve teknik personel ihtiyacını beraberinde getirir. Bunu yerine mikroarray çalışmalarıyla oosit/ embriyo yeterliliğini tahmin edebilecek sınırlı sayıda fakat kuvvetli biyobelirteçler qPCR ile değerlendirilebilir. Bu noktada tek bir gen ürününün sonucu tahmin etmesi olası olmadığından birden fazla gen bir algoritma içerisinde kullanılmalıdır.

Türkiye gibi yasal zorunlu olarak tek embriyo transferi (SET) yapılan ülkelerde transfer başına düşen gebelik oranını yükseltebilmek IVF tedavilerinin en büyük hedefidir. Farklı araştırma gruplarının sonuçları göstermektedir ki; kümülüs hücrelerindeki gen ifade farklılıkları bunu başarabilecek en kuvvetli adaydır. Bu çalışmada tek embriyo transferi yapılan IVF tedavisi alan hastaların oositleri arasında gebelik sonucunu tahmin etmek için aday genler tanımlamıştır. *PTGS2* geninin gebelik potansiyeli en yüksek olan embriyoyu seçmekte güçlü bir biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir. Bunun yanında *VCAN* geni ise gebelik potansiyeli en yüksek olan embriyoyu seçmekte ümit vermektedir. Daha büyük örneklem gruplarında tekrar değerlendirilmelidir.

Bu genler sadece daha büyük ve daha çeşitli SET döngülerinde değil aynı zamanda hasta içi varyasyonların da değerlendirildiği yeni çalışmalarda tekrar değerlendirilmelidir. Bu sayede ilk tedavi döngüsünde gebelikle sonuçlanmayan oositlerden elde edilen kümülüs hücreleri ile sonraki dondurulmuş embriyo transferi döngüsü ile canlı doğumla sonuçlanan oositlerin kümülüs hücrelerinin birlikte değerlendirildiği hasta içi sonuçlar da çok değerli veriler sunacaktır.

Sonuç olarak tek bir transkript ya da bir grup transkript algoritmasının tek başına ya da morfolojiyle birlikte, implantasyon oranı, gebelik oranı veya canlı doğum oranı gibi IVF sonuç parametrelerini iyileştirip iyileştirmedini belirlemek için randomize klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Kümülüs hücrelerinin gen ifade seviyelerinin değerlendirildiği çalışmalarla sunulan sonuçlarda genel olarak bakıldığında tanımlanan biyobelirteçler üzerinde sınırlı bir fikir birliği söz konusudur. Bunun nedenleri; laboratuvar ortamındaki farklılıklar, çalışma sonuçlarının ölçümleri, çalışma gruplarının büyüklükleri ve homojenlikleri ve kullanılan teknolojiler olabilir. Tüm bunların yanında IVF tedavisinde kullanılan tedavi protokolleri, incelenen kadınların yaşı da araştırılan gen ifade profillerini etkileyebilir. Tüm bunların yanında yapılan çalışmaların çok büyük kısmı retrospektif kohort çalışmasına dayanmaktadır. Bu çalışmaların kapsamlı performans değerlendirmesi sınırlı olup, tanımlanan belirteçlerin klinik doğrulamasının yapılması gerekir.

Tüm bunların sonunda kümülüs hücrelerindeki gen ifade seviyelerinin oosit/embriyo yeterliliğini tayin edebilecek biyobelirteçler olabileceğini düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Vayena, E., Rowe, P. J., and Griffin, P. D. (Eds). (2002). *Current practices and controversies in assisted reproduction*, Geneva: World Health Organization, 3-12.
2. Wang, X., Chen, C., Wang, L., Chen, D., Guang, W., and French, J. (2003). Group RHS: Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertility and Sterility*, 79(3), 577-584.
3. Gomel, V., Urman, B., and Yaralı, H. (1993). Investigation of the infertile couple. In S. Aksel ve S. Beksac. (Editorler). *Reproductive Endocrinology and Infertility*. Ankara: Medical Network Press, 143-155.
4. Zargar, A. H., Wani, A. I., Masoodi, S. R., Laway, B. A., and Salahuddin, M. (1997). Epidemiologic and etiologic aspects of primary infertility in the Kashmir region of India. *Fertility and Sterility*, 68(4), 637-643.
5. Simpson, J. L. (2014). Birth defects and assisted reproductive technologies. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 19(3), 177-182.
6. Osmanagaoglu, K., Tournaye, H., Camus, M., Vandervorst, M., Van Steirteghem, A., and Devroey, P. (1999). Cumulative delivery rates after intracytoplasmic sperm injection: 5 year follow-up of 498 patients. *Human Reproduction*, 14(10), 2651-2655.
7. Huang, X., Hao, C., Shen, X., Zhang, Y., and Liu, X. (2013). RUNX2, GPX3 and PTX3 gene expression profiling in cumulus cells are reflective oocyte/embryo competence and potentially reliable predictors of embryo developmental competence in PCOS patients. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 1-10.
8. Başaran, E., Aras, S., ve Cansaran-duman, D. (2010). Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67(2), 85-96.
9. Keith, L. G., Oleszczuk, J. J. (2002). Triplet births in the United States: An epidemic of high-risk pregnancies. *The Journal of Reproductive Medicine*, 47(4), 259-265.
10. Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R., and Royere, D. (2007). Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Human Reproduction*, 22(12), 3069-3077.
11. Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Gravel, C., Leveille, M. C., Leader, A., and Sirard, M.A. (2008). Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human Reproduction*, 23(5), 1118-1127.
12. Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Léveillé, M-C., Leader, A., and Sirard, M-A. (2010). Identification of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF: new evidence for the involvement of luteinization process. *Molecular Human Reproduction*, 16(8), 548-556.

13. Anderson, R. A., Sciorio, R., Kinnell, H., Bayne, R. A., Thong, K. J., de Sousa, P. A., and Pickering, S. (2009). Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction*, 138(4), 629-637.
14. 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), 1-9.
15. McKenzie, L. J., Pangas, S. A., Carson, S. A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J. E., Amato, P., and Matzuk, M. M. (2004). Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Human Reproduction*, 19(12), 2869-2874.
16. Wathlet, S., Adriaenssens, T., Segers, I., Verheyen, G., Van Landuyt, L., Coucke, W., Devroey, P., and Smitz, J. (2013). Pregnancy prediction in single embryo transfer cycles after ICSI using QPCR: validation in oocytes from the same cohort. *Plos One*, 8(4), 1-10.
17. Wathlet, S., Adriaenssens, T., Segers, I., Verheyen, G., Van de Velde, H., Coucke, W., Ron El, R., Devroey, P., and Smitz, J. (2011). Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. *Human Reproduction*, 26(5), 1035-1051.
18. Adriaenssens, T., Wathlet, S., Segers, I., Verheyen, G., De Vos, A., Van der Elst, J., Coucke, W., Devroey, P., and Smitz, J. (2010). Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Human Reproduction*, 25(5), 1259-1270.
19. Gebhardt, K. M., Feil, D. K., Dunning, K. R., Lane, M., and Russell, D. L. (2011). Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 96(1), 47-52.
20. Cousineau, T. M., Domar, A. D. (2007). Psychological impact of infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 21(2), 293-308.
21. Denson, V. (2006). Diagnosis and management of infertility. *The Journal for Nurse Practitioners*, 2(6), 380-386.
22. Taşkın, L. (2007). *Doğum ve Kadın Hastalıkları Hemşireliği*. (8. Baskı). Ankara: Sistem Ofset Matbaacılık, 9-11.
23. Cooper, T. G., Noonan, E., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H., Behre, H. M., Haugen, T. B., Kruger, T., Wang, C., and Mbizvo, M. T. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16(3), 231-245.
24. Kadioğlu, A. (editör). (2011). *WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 223-224

25. De la Taille, A., Rigot, J., Mahe, P., Gervais, R., Dumur, V., Lemaitre, L., and Mazeman, E. (1998). Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens. *Progres en Urologie: Journal de L'association Francaise D'urologie et de la Societe Francaise D'urologie*, 8(3), 370-376.
26. Gökçe, A. (2011). Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. *Türk Üroloji Seminerleri*, 2, 1-7.
27. Kayıkçı, M., Çam, H., Akman, Y., ve Erol, A. (2002). Erkek infertilitesini değerlendirmede semen analizinin özellikleri ve rolü. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 4(3), 35-38.
28. Gardner, D. K., Weissman, A., Howles, C. M., and Shoham, Z.(Eds). (2018). *Textbook of assisted reproductive technologies: laboratory and clinical perspectives*: New York: CRC press, 36-41.
29. Correa-Pérez, J. R., Fernández-Pelegrina, R., Aslanis, P., and Zavos, P. M. (2004). Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necropermia. *Fertility and sterility*, 81(4), 1148-1150.
30. Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., and Oehninger, S. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 49(1),112-117.
31. Speroff, L., Fritz, M. A., and Erk, A. (2007). *Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite* (çev. S. Günalp ve G. Bozdağ). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 1030-1065.
32. Orhon, E., Enginsu, E., ve Günalp, S. (1995). *Sperm Morfoloji Atlası*. İstanbul: Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları, 17-29.
33. Erdemir, F., Fırat, F., ve Gençten, Y. (2011). Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Türk Üroloji Seminerleri*, 2, 11-17.
34. Yumru, A. E., Öndeş, B. (2011). İnfertil Çifte Yaklaşım ve İn Vitro Fertilizasyon'a Doğru Hasta Seçimi. *Journal Of Academic Research in Medicine*, 1(2), 57-60.
35. Rowe, P. J., Comhaire, F. H., Hargreave, T. B., Mahmoud, A. M. (2000). *WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male*. Cambridge University Press, 3-38.
36. Gözükar, K. H., Görür, S. (2019). Ürogenital enfeksiyonlar ve erkek infertilitesi. *Erkek Üreme Sağlığı*, 12, 43-48.
37. Gürkan, T., Urman, B., Yaralı, H., and Duran, H. E. (1997). Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 to predict ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization using a flare-up protocol. *Fertility and Sterility*, 68(3), 483-487.

38. Erçoban, S., Koçak, M., Çalışkan, E., Şimşir, C., Kaplan, M., ve Haberal, A. (2001). İntrauterin Patoloji Şüphesi Bulunan İnfertil Olguların Değerlendirilmesinde Sonohisterografinin Tanısal Önemi. *Journal of Clinical Obstetrics & Gynecology*, 11(4), 251-256.
39. Guzick, D., Sullivan, M., Adamson, G. D., Cedars, M., Falk, R., Peterson, E., and Steinkampf, M. (1998). Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 70(2), 207-213.
40. Duvan, C. İ., Şatiroğlu, H., Berker, B., Çetinkaya, E., and Kahraman, K. (2003). Yardımla üreme tekniklerinde implantasyon ve gebelik oranlarını etkileyen faktörler. *Journal of Clinical Obstetrics & Gynecology*, 13(6), 466-475.
41. Fishel, S. (2018). First in vitro fertilization baby—this is how it happened. *Fertility and Sterility*, 110(1), 5-11.
42. Jones, Jr. H. W. (2008). The use of controlled ovarian hyperstimulation (COH) in clinical in vitro fertilization: the role of Georgeanna Seegar Jones. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1-3.
43. Kutlu, T. (2007). Kontrollü Ovaryan Hipersitmulasyon. In R. Pabuçcu, C. Fıçıcıoğlu, ve B. Baysal (Editörler). *Üreme Endokrinolojisi Teknikleri ve Cerrahisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevileri, 196-203.
44. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., and Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340(8810), 17-18.
45. Windt, M. L., Barros, A., and Sousa, M. (2000). *The intracytoplasmic sperm injection technique: pitfalls and essentials*. New York: Parthenon Publishing Group, 65-82.
46. Delilbaşı, L. (2008). *A'dan Z'ye: Tüp Bebek Laboratuvarı*. Ankara: Veri Medikal Yayıncılık. 165-181.
47. Depa-Martynow, M., Jedrzejczak, P., and Pawelczyk, L. (2007). Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45(I), 85-89.
48. Fauser, B. C., Devroey, P., and Macklon, N. S. (2005). Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *The Lancet*, 365(9473), 1807-1816.
49. Senat, M-V., Ancel, P-Y., Bouvier-Colle, M-H., and Bréart G. (1998). How does multiple pregnancy affect maternal mortality and morbidity? *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 41(1), 79-83.
50. Singh, V.(2014). *Textbook of Clinical Embryology*. e-book: Elsevier Health Sciences. 48-56.
51. Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine reviews*, 17(2), 121-155.

52. Delilbaşı, L. (2008). *In vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri. 85-104.
53. Chuang, C. Y., Huang, M. C., Chen, H. F., Tseng, L. H., Yu C. Y., Stone, L., Huang, H. P., Ho, H. N., and Kuo, H. C. (2015). Granulosa cell-derived induced pluripotent stem cells exhibit pro-trophoblastic differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 1-14.
54. Sadler, T. W., (2011). *Langman's medical embryology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins. 35-48.
55. Jangueria, L., Carneiro, J., and Kelley, O. (1998). *Temel histoloji* (çev: Y. Aytekin, S. Solakoğlu, B. Ahışhalı). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 407-422.
56. Carlson, B. M., (2008). *Human Embryology and Developmental Biology*. E-Book: Elsevier Health Sciences. 31-45.
57. Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., and Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and Sterility*, 103(2), 303-316.
58. El-Hayek, S., Clarke, H. J. (2016). Control of Oocyte Growth and Development by Intercellular Communication Within the Follicular Niche. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 58, 191-224.
59. Sadler, T. (1996). *Langman's Medikal Embriyoloji* (7. Baskı).(çev. C. Başaklar ve K. Sönmez) Ankara: Palme Yayıncılık. 31-49
60. Xaviour, R. (2020). *Essentials of Human Embryology*, 1st Edition-E-Book: Elsevier Health Sciences. 11-25.
61. Moore, K., Persaud, T., and Torchia, M. (2002). *İnsan embriyolojisi*. (çev. H. Dalçık ve M. Yıldırım). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 17-45.
62. İnternet: FemaleGametogenesis, URL: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BGDA_Practical_3_-_Gametogenesis#/media/File:Female_gametogenesis.jpg, Son Erişim Tarihi: 12.05.2021.
63. Anwar, A., Moussa, M. D. (2002). In vitro maturation of oocytes. a review article *Journal of Anatomy* , 25, 1-70.
64. Larsen, W. J. (2001). *Human Embriology*. In L. S. Sherman, S.S. Potter and W.J. Scott, (Eds.) Philadelphia:Churchill Livingstone, 88-120.
65. Picton, H., Harris, S., Muruvi, W., and Chambers, E. (2008). The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, 136(6), 703-715.
66. Fortune, J. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 78(3-4), 135-163.

67. Liu, Y. X. (2007). Interaction and signal transduction between oocyte and somatic cells in the ovary. *Frontiers in Bioscience*, 12, 2782-2796.
68. Schoenwolf, G. C, Bleyl, S. B, Brauer, P. R, and Francis-West, P. H. (2014). *Larsen's human embryology E-book*. Elsevier Health Sciences, 25-33.
69. Moore, K. L, Persaud, T. V. N., and Torchia, M.G. (2015). *Before We Are Born E-Book: Essentials of Embryology and Birth Defects*. Online Access: Elsevier Health Sciences, 14-19.
70. Zhang, M., Ouyang, H., and Xia G. (2009). The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular human Reproduction*, 15(7), 399-409.
71. Wigglesworth, K., Lee, K. B., O'Brien, M. J., Peng, J., Matzuk, M. M., and Eppig, J.J. (2013). Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), 3723-3729.
72. Sugimura, S., Ritter, L. J., Sutton-McDowall, M. L., Mottershead, D. G., Thompson, J. G., and Gilchrist, R. B. (2014) Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Molecular Human Reproduction*, 20(6), 499-513.
73. Grøndahl, C. (2008). Oocyte maturation. *Danish Medical Bulletin*, 55, 1-16.
74. Gedikli, S., Özbek, E., ve Demirci, T. (2020). Molecular Basis of Fertilization. *Van Medical Journal*, 20(4), 294-301.
75. Assou, S., Haouzi, D., De Vos, J., and Hamamah, S. (2010). Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Molecular Human Reproduction*, 16(8), 531-538.
76. Robker, R. L., Hennebold, J. D., and Russell, D. L. (2018). Coordination of ovulation and oocyte maturation: a good egg at the right time. *Endocrinology*, 159(9), 3209-3218.
77. Assou, S., Anahory, T., Pantesco, V., Le Carrou, T., Pellestor, .F, Klein, B., Reyftmann, L., Dechaud, H., De Vos, J., and Hamamah, S. (2006). The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. *Human Reproduction*, 21(7), 1705-1719.
78. Eppig, J. J., Schroeder, A. C. (1989). Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 41(2), 268-276.
79. Hasegawa, A., Mochida, N., Ogasawara, T., and Koyama, K. (2006). Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 86(4), 1182-1192.

80. Albertini, D. F., Rider, V. (1994). Patterns of intercellular connectivity in the mammalian cumulus-oocyte complex. *Microscopy Research and Technique*, 27(2),125-133.
81. Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E., and Paul, D. L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, 385(6616), 525-529.
82. Emori, C., Sugiura, K. (2014). Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Animal Science Journal*, 85(6), 627-633.
83. Zhang, X., Wu, X. Q., Lu, S., Guo, Y. L., and Ma, X. (2006). Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Research*, 16(10), 841-850.
84. Pratt, H.P. (1982). Preimplantation mouse embryos synthesize membrane sterols. *Developmental Biology*, 89(1), 101-110.
85. Richards, J. S. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, 15(6), 725-751.
86. Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., Lo, Y. K., and Sharma, S. C. (2002). Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 195-220.
87. 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.
88. Monniaux, D. (2016). Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*, 86(1), 41-53.
89. Yerushalmi, G. M., Salmon-Divon, M., Yung, Y., Maman, E., Kedem, A., Ophir, L., Elemento, O., Coticchio, G., Dal Canto, M., Mignini Renzinu, M., Fadini, R., and Hourvitz, A. (2014). Characterization of the human cumulus cell transcriptome during final follicular maturation and ovulation. *Molecular Human Reproduction*, 20(8), 719-735.
90. Assou, S., Boumela, I., Haouzi, D., Anahory, T., Dechaud, H., De Vos, J., and Hamamah, S. (2011). Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications. *Human Reproduction Update*, 17(2), 272-290.
91. Buckingham, L. (2019). Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications. F.A. Davis Company, 125-138
92. Brooks, G. (1998). An introduction to basic molecular biology In G. Brooks (Eds), *Biotechnology in Healthcare: an Introduction to Biopharmaceuticals*. London: The Pharmaceutical Press, 1-15
93. Thatcher, S. A. (2015). DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clinical Chemistry*, 61(1), 89-99.

94. Vomelova, I., Vaníčková, Z., and Šedo, A. (2009). Technical note methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biologica*, 55, 243-251.
95. Nolan, T., Bustin, S. (2008). Procedures for quality control of RNA samples for use in quantitative reverse transcription PCR. In J.T. Kerr ve L. Birch (Eds). *Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach*, Cambridge: RSC Publishing, 189-207.
96. Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., and Pfaffl, M. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50(4), 237-243.
97. Uyar, A., Torrealday, S., and Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*, 99(4), 979-997.
98. Okutucu, B., Pehlivan, S. (2003). Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(2), 138-148
99. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
100. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 263-273.
101. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11(9), 1026-1030.
102. Ercan, Ş., Yaylim, İ. (2020). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-time PCR”. *Ürolojik Cerrahi Derneği Güncelleme Serileri*, 9(2), 43-47.
103. Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10), 995-1001.
104. Van der Velden, V., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and Van Dongen, J. (2003). Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17(6), 1013-1034.
105. Cockerill, F. R., Uhl, J. R. (2002). Applications and challenges of real-time PCR for the clinical microbiology laboratory. In U. Reischl, C. Wittwer and F. Cockerill. (Eds). *Rapid cycle real-time PCR—methods and applications*. Berlin, New York: Springer, 3-27.
106. Caplin, B., Rasmussen, R., Bernard, P., and Wittwer, C. (1999). Lightcycler™ hybridization probes - the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica*, 1, 5-8.
107. Günel, T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR” *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27, 763-764.

108. Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22(1), 130-138.
109. McChlery, S. M., Clarke, S. C. (2003). The use of hydrolysis and hairpin probes in real-time PCR. *Molecular Biotechnology*, 25(3), 267-273.
110. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., and Shipley, G. L. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-622
111. Dorak, M. T (Editör). (2007). Real-time PCR. London: Taylor & Francis (eBook), 95-110.
112. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
113. Schmittgen, T. D. (2001). Real-time quantitative PCR. *Methods*, 25(4), 383-385.
114. Ağaoğlu, Ö. K., Sidekli, Ö. (2020). Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun Housekeeping Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(1), 76-83.
115. İnternet: VCAN, versican Homo sapiens (human), URL: [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), Son Erişim Tarihi: 12.05.2021.
116. Iozzo, R. V., Naso, M. F., Cannizzaro, L. A., Wasmuth, J. J., and McPherson, J. D. (1992). Mapping of the versican proteoglycan gene (CSPG2) to the long arm of human chromosome 5. *Genomics*, 14(4), 845-851.
117. Zimmermann, D. R., Ruoslahti, E. (1989). Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *The EMBO Journal*, 8(10), 2975-2981.
118. İnternet: UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly, URL: https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A83471925%2D83580448&hgid=269785124_jdLaLaV1rPraQ2sGeEDEkuqVHsOu, Son Erişim Tarihi: 07.07.2021.
119. Naso, M. F., Zimmermann, D. R., and Iozzo, R. V. (1994). Characterization of the complete genomic structure of the human versican gene and functional analysis of its promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32999-33008.
120. Kischel, P., Waltregny, D., Dumont, B., Turtoi, A., Greffe, Y., Kirsch, S., De Pauw, E., and Castronovo, V. (2010). Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *International Journal of Cancer*, 126(3), 640-650.
121. Lebaron, R. (1996). Versican. *Perspectives on developmental neurobiology*, 3(4), 261-271.

122. Aspberg, A., Miura, R., Bourdoulous, S., Shimonaka, M., Heinegård, D., Schachner, M., Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. (1997). The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein–protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(19), 10116-10121.
123. Nandadasa, S., Foulcer, S., and Apte, S. S. (2014). The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. *Matrix Biology*, 35, 34-41.
124. Zhang, Z., Miao, L., and Wang, L. (2012). Inflammation amplification by versican: the first mediator. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6873-6882.
125. Paulus, W., Baur, I., Dours-Zimmermann, M. T., and Zimmermann, D. R. (1996). Differential expression of versican isoforms in brain tumors. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 55(5), 528-533.
126. Papadas, A., Asimakopoulos, F. (2020). Versican in the Tumor Microenvironment. *Tumor Microenvironment*, Springer eBook, 55-72.
127. Kurumbail, R. G., Kiefer, J. R., and Marnett, L. J. (2001). Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 752-760.
128. Smith, W. L., Garavito, R. M., and DeWitt, D. L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and– 2. *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33157-33160.
129. Xie, W., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R., and Simmons, D. L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(7), 2692-2696.
130. Hla, T., Neilson, K. (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7384-7388.
131. İnternet: UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly, URL:https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr1%3A186671791%2D186680423&hgside=269780987_OFAcQA5nuwi5ZAxRMdeVQ76uiWm7, Son Erişim Tarihi: 07.07.2021.
132. Evett, G. E., Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., and Simmons, D. L. (1993). Prostaglandin G/H Synthase Isoenzyme 2 Expression in Fibroblasts-Regulation by Dexamethasone, Mitogens, and Oncogenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 306(1), 169-177.
133. O'Sullivan, M., Chilton, F. H., Huggins, E., and McCall, C. (1992). Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14547-14550.

134. Sirois, J., Simmons, D., and Richards, J. (1992). Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles: Induction in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 11586-11592.
135. Fortier, M., Krishnaswamy, K., Danyod, G., Boucher-Kovalik, S., and Chapdalaine, P. (2008). A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(Suppl 1), 65-89.
136. Berridge, M. J., Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341(6239), 197-205.
137. Erneux, C., Roeckel, N., Takazawa, K., Mailleux, P., Vassart, G., and Mattei, M. (1992). Localization of the genes for human inositol 1, 4, 5-trisphosphate 3-kinase A (ITPKA) and B (ITPKB) to chromosome regions 15q14-q21 and 1q41-q43, respectively, by in situ hybridization. *Genomics*, 14(2), 546-547.
138. Takazawa, K., Perret, J., Dumont, J. E., and Erneux, C. (1990). Human brain inositol 1, 4, 5-trisphosphate 3-kinase cDNA sequence. *Nucleic Acids Research*, 18(23), 7141-7141.
139. Internet: UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly, URL: https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr15%3A41493874%2D41503551&hgid=269780987_OFAcQA5nuwi5ZAxRMdeVQ76uiWm7, Son Erişim Tarihi: 07.07.2021.
140. Mailleux, P., Takazawa, K., Erneux, C., and Vanderhaeghen, J-J. (1991). Inositol 1, 4, 5-trisphosphate 3-kinase distribution in the rat brain. High levels in the hippocampal CA1 pyramidal and cerebellar Purkinje cells suggest its involvement in some memory processes. *Brain Research*, 539(2), 203-210.
141. Vanweyenbergh, V., Communi, D., D'santos, C., and Erneux, C. (1995). Tissue-and cell-specific expression of Ins (1, 4, 5) P₃ 3-kinase isoenzymes. *Biochemical Journal*, 306(2), 429-435.
142. Windhorst, S., Kalinina, T., Schmid, K., Blechner, C., Kriebitzsch, N., Hinsch, R., Chang, L., Herich, L., Schumacher, U., and Mayr, G. W. (2011). Functional role of inositol-1, 4, 5-trisphosphate-3-kinase-A for motility of malignant transformed cells. *International Journal of Cancer*, 129(6), 1300-1309.
143. Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., and Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 856-862.
144. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), 1-12.

145. Wiborg, O., Pedersen, M., Wind, A., Berglund, L., Marcker, K., and Vuust, J. (1985). The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *The EMBO Journal*, 4(3), 755-759.
146. İnternet: UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly, URL: https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr12%3A124911604%2D124915348&hgid=269780987_OFACQA5nuwi5ZAxRMdeVQ76uiWm7, Son Erişim Tarihi: 07.07.2021.
147. Pickart, C. M., Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(6), 610-616.
148. Ryu, K. Y., Maehr, R., Gilchrist, C. A., Long, M. A., Bouley, D. M., Mueller, B., Ploegh, H. L., and Kopito, R. R. (2007). The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance. *The EMBO Journal*, 26(11), 2693-2706.
149. 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.
150. Hammond, E. R., Stewart, B., Peek, J. C., Shelling, A. N., and Cree, L. M. (2015). Assessing embryo quality by combining non-invasive markers: early time-lapse parameters reflect gene expression in associated cumulus cells. *Human Reproduction*, 30(8), 1850-1860.
151. Burnik Papler, T., Vrtacnik Bokal, E., Maver, A., and Lovrecic, L. (2015). Specific gene expression differences in cumulus cells as potential biomarkers of pregnancy. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(4), 426-433.
152. Wathlet, S., Adriaenssens, T., Segers, I., Verheyen, G., Janssens, R., Coucke, W., Devroey, P., and Smitz, J. (2012). New candidate genes to predict pregnancy outcome in single embryo transfer cycles when using cumulus cell gene expression. *Fertility and Sterility*, 98(2), 432-439.
153. Iager, A. E., Kocabas, A. M., Out, H. H., Ruppel, P., Langerveld, A., Schnarr P., Suarez, M., Jarrett, J. C., Conaghan, J., and Rosa, G. J. (2013). Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential. *Fertility and Sterility*, 99(3), 745-752.
154. Ouandaogo, Z. G., Haouzi, D., Assou, S., Dechaud, H., Kadoch, I. J., De Vos, J., and Hamamah, S. (2011). Human cumulus cells molecular signature in relation to oocyte nuclear maturity stage. *Plos One*, 6(11), e27179.
155. Assou, S., Ait-Ahmed, O., El Messaoudi, S., Thierry, A. R., and Hamamah, S. (2014). Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders. *Medical Hypotheses*, 83(4), 506-508.
156. Cillo, F., Brevini, T. A., Antonini, S., Paffoni, A., Ragni, G., and Gandolfi, F. (2007). Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction*, 134(5), 645-650.

157. Assou, S., Haouzi, D., Mahmoud, K., Aouacheria, A., Guillemin, Y., Pantesco, V., Reme, T., Dechaud, H., De Vos, J., and Hamamah, S. (2008). A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Molecular Human Reproduction*, 14(12), 711-719.
158. Feuerstein, P., Puard, V., Chevalier, C., Teusan, R., Cadoret, V., Guerif, F., Houlgatte, R., and Royere, D., (2012) Genomic assessment of human cumulus cell marker genes as predictors of oocyte developmental competence: impact of various experimental factors. *Plos One*, 7(7), e40449.
159. Assidi, M., Montag, M., Van Der Ven, K., and Sirard, M-A. (2011). Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(2), 173-188.
160. Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Léveillé, M-C., Leader, A., and Sirard, M-A. (2009). Genomic assessment of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 16(2), 87-96.
161. Evanko, S. P., Potter-Perigo, S., Johnson, P. Y., and Wight, T. N. (2009). Organization of hyaluronan and versican in the extracellular matrix of human fibroblasts treated with the viral mimetic poly I: C. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57(11), 1041-1060.
162. Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., and Dey, S. K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 91(2), 197-208.
163. Seli, E., Babayev, E., Collins, S. C., Nemeth, G., and Horvath, T. L. (2014). Minireview: metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. *Molecular Endocrinology*, 28(6), 790-804.
164. Shah, B. H., Catt, K. J. (2005). Roles of LPA3 and COX-2 in implantation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(9), 397-399.
165. Scarica, C., Cimadomo, D., Dovere, L., Giancani, A., Stoppa, M., Capalbo, A., 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.
166. 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.
167. Rienzi, L., Vajta, G., and Ubaldi, F. (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human Reproduction Update*, 17(1), 34-45.
168. Kufner, K., Tonne, M., and Barth, J. (2009). What is to be done with surplus embryos? Attitude formation with ambivalence in German fertility patients. *Reproductive Biomedicine Online*, 18, 68-77.

169. Mohler-Kuo, M., Zellweger, U., Duran, A., Hohl, M. K., Gutzwiller, F., and Mutsch, M. (2009). Attitudes of couples towards the destination of surplus embryos: results among couples with cryopreserved embryos in Switzerland. *Human Reproduction*, 24(8), 1930-1938.
170. Üremeye yardımcı tedavi uygulamaları ve üremeye yardımcı tedavi merkezleri hakkında yönetmelik, (2010, Mart 6). Resmî Gazete , yayın no: 27513.
171. Ng, S. T., Chang, T-H., and Wu, T. J. (1999). Prediction of the rates of fertilization, cleavage, and pregnancy success by cumulus-coronal morphology in an in vitro fertilization program. *Fertility and Sterility*, 72(3), 412-417.
172. Nel-Themaat, L., Nagy, Z. P. (2011). A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta*, 32, 257-S263.





GAZİ GELECEKTİR..