

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**ART SIKLUSLARINDA POLİKİSTİK OVER
SENDROMU VE HEPATOSİT BÜYÜME
FAKTÖRÜ DÜZEYLERİ**

DR. NUR ŞAHİN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**ART SIKLUSLARINDA POLİKİSTİK OVER
SENDROMU VE HEPATOSİT BÜYÜME
FAKTÖRÜ DÜZEYLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. NUR ŞAHİN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. BÜLENT GÜLEKLİ

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından
2009.KB.SAG.026 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	III
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	1
SUMMARY	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.İNFERİLİTE VE YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ	5
2.1.1. Kadın İnfertilitesi	5
2.1.1.1 Ovulatuvar Fonksiyon Bozuklukları	6
2.1.1.2 Servikal Faktör	7
2.1.1.3 Uterin Faktör	7
2.1.1.4 Tubal Faktör	8
2.1.2. Erkek İnfertilitesi	9
2.1.3. Açıklanamayan İnfertilite	9
2.2. İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ	9
2.2.1. Öykü ve fizik muayene	9
2.2.2. Laboratuvar	10
2.2.3. Pelvik Ultrasonografi	11
2.2.4. Histerosalpingografi(HSG)	11
2.2.5. Laparoscopi	11
2.2.6. Histeroscopi	12
2.2.7. Sonohisterografi	12
2.2.8 Erkek Hastanın Değerlendirilmesi	12
2.2.8.1 Klasik Semen Analizi	13
2.3. OVARIAN STİMULASYON REJİMLERİ	14
2.3.1. Uzun Protokoller	15
2.3.2. Kısa Protokoller	16
2.3.3. Antagonist Protokoller	16
2.4.OVULASYON İNDÜKSİYON MONİTORİZASYONU	17

2.5.FOLLİKÜL ASPİRASYONU VE LABORATUAR İŞLEMLERİ	17
2.6.OOGENEZİS	18
2.6.1. Follikülogenez	18
2.7.OOSİT MATURASYONU	20
2.7.1. Nükleer Maturasyon	20
2.7.2. Sitoplazma Maturasyonu	21
2.8.EMBRİYONEL GELİŞİM	21
2.8.1. Erken Embriyonel Gelişim	21
2.8.2. Morula Ve Blastokist Gelişimi	22
2.8.3. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi	23
2.9. ANJİYOGENEZİS	25
2.10. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF)	25
2.11. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ: c-MET	28
2.12. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ ve ANJİYOGENEZİS	29
2.13. POLİKİSTİK OVER SENDROMU	30
2.13.1.Tanım	30
2.13.2.PCOS Ve Androjen Yüksekliği	31
2.13.3.PCOS Ve Follikül Gelişimi	31
2.13.4. PCOS İle İlişkili İnfertilite Tedavisi:	33
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	35
3.1.Ovaryan Stimulasyon Protokolleri	35
3.2.Oosit Ve Folliküler Sıvı Toplama İşlemi	36
3.3.Oositlerin Elde Edilmesi, Takibi, Morfolojik Değerlendirilmesi Ve ICSI	37
3.4.Fertilizasyon, Embriyo Kalitesi	37
3.5.Serum Ve Follikül Sıvısında HGF Tayini	38
3.6.Granüloza Hücrelerinde c-MET mRNA Miktar Tayini	39
3.7.Serum Hormon Tayini	39
3.8.İstatistiksel Analiz	40
3.9. Çalışma Dizaynı Özeti	41
4. BULGULAR	42
5.TARTIŞMA	53
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR	58

ÖNSÖZ

Kadın hastalıkları ve Doğum alanındaki uzmanlık eğitimim süresince, değerli bilgi ve deneyimleri ile bu uzmanlık alanını sevmemde ve yetişmemde katkıda bulunan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri, sayın hocalarım; Prof. Dr. Oktay ERTEN, Prof. Dr. Ata ÖNVURAL, Prof. Dr. Berrin ACAR, Prof. Dr. Namık DEMİR, Prof. Dr. Turhan USLU, Prof. Dr. Bülent GÜLEKLİ, Prof. Dr. Cemal POSACI, Prof. Dr. Yakup ERATA, Prof. Dr. Murat CELİLOĞLU, Prof. Dr. Uğur SAYGILI, Doç. Dr. Sabahattin ALTUNYURT, Doç. Dr. Serkan GÜÇLÜ, Doç. Dr. Erbil DOĞAN, Uzm. Dr. Bahadır SAATLI, Uzm. Dr. R.Emre OKYAY'a ve Dr. Nesin AKDEMİR, Dr. Funda GÖDE başta olmak üzere beraber çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı sayın hocalarım; Prof. Dr. Bülent GÜLEKLİ, Doç. Dr. Erbil DOĞAN, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Neşe ATABEY, Uzm. Dr. Aslı TOYLU, Tüp Bebek Merkezinden Uzm. Dr. Elvan OK, Embriyolog Seda DOĞAN, Embriyolog Müge KOVALI ve tüm merkez çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca beni bu günlere getiren çok değerli anneme ve babama, zorlu asistanlık yolculuğunda her zaman yanımda olan kıymetli eşim Uzm. Dr. Ali ŞAHİN'e ve biricik oğlum Furkan'a sonsuz teşekkürler...

Dr. Nur ŞAHİN

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil.1 Overdeki folliküllerin gelişimi

Şekil.2 Matür oosit ve polar cisim

Şekil.3 Fertilize olmuş oosit.(merkezde pronükleuslar görülmektedir)

Şekil.4 Üçüncü günde 7 hücreli embriyo

Şekil.5 Hepatosit Büyüme Faktörü

Şekil.6 HGF'nin Follikülogenezdeki Etkisi

Şekil.7 HGF bağımlı sinyal iletim şeması

Şekil.8 Hepatosit Büyüme Faktör Reseptörü.c-MET(tirozin kinaz ailesinden)

a)MET reseptörünün ana şekli b)Üç boyutlu modeli

Şekil.9 Normal Follikülogenez ve PCOS'da Follikülogenez

Şekil.10 hCG ve OPU Günü Serum HGF Düzeylerinin Karşılaştırılması

Şekil.11 Folliküler Sıvı Ortalama HGF ve c-MET Değerleri

Şekil.12 Maturasyona Göre Folliküler Sıvı

HGF(A) ve c-MET Ekspresyon Düzeyleri (B) Değişimi

Şekil.13.Fertilizasyona Göre Folliküler Sıvı

HGF(A) ve c-MET Ekspresyon Düzeyleri (B) Değişimi

Şekil.14. Embriyo Kalitesine Göre Folliküler Sıvı

HGF(A) ve c-MET Ekspresyon Düzeyleri (B) Değişimi

TABLO LİSTESİ

Tablo.1 Klasik Semen Analizi

Tablo.2 Hastaların Klinik ve Hormonal Sonuçlarının Karşılaştırılması

Tablo.3 PCOS ve Kontrol Grubu Genel Özellikleri

Tablo.4 hCG ve OPU Günü Gruplar Arası Serum Hormon ve HGF Düzeylerinin Karşılaştırılması

Tablo.5 Serum ve Follikül Sıvısı HGF Düzeylerinin Karşılaştırması

Tablo.6. Folikül Sıvısı HGF ve cMET Düzeylerinin Maturasyona Göre Karşılaştırması
(PCOS ve Kontrol grubunun kendi içinde)

Tablo.7 Folikül Sıvısı HGF ve cMET Düzeylerinin Fertilizasyona Göre Karşılaştırması
(PCOS ve Kontrol grubunun kendi içinde)

Tablo.8. Folikül Sıvısı HGF ve cMET Düzeylerinin Embriyo Kalitesine Göre Karşılaştırması
(PCOS ve Kontrol grubunun kendi içinde)

KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortiko Tropik Hormon
AMH	Anti-Müllerian Hormon
Ang-2	Anjiyopoetin 2
ART	Yardımcı Üreme Teknikleri
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
bFGF	Basit Fibroblast Büyüme Faktörü
BMI	Vücut Kitle İndeksi
c-MET	HGF reseptörü
CO2	Karbondioksit
DHEAS	Dihidro Epiandrositenodion Sülfat
DNA	Diribonükleik asit
E1	Estron
E2	Estradiol
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ET	Embriyo Transferi
FSH	Folikül Stimule Edici Hormon
FTE	Serbest Testosteron
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GnRH-a	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Analöğü
GV	Germinal Vezikül
GVBD	Germinal Vezikülün Yıkılması
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HGFR	Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü
HMG	Human Menapozal Gonadotropin
HSG	Histerosalpingografi
ICSI	İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
KOH	Kontrollü Ovarian Hiperstimülasyon
LH	Lüteinize Edici Hormon

MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
MI	Metafaz I
MII	Metafaz II
OHSS	Ovarian Hiperstimulasyon Sendromu
OPU	Yumurta Toplama İşlemi
PCOS	Polikistik Over Sendromu
PCR	Polimeraz Zincir reaksiyonu
PG	Progesteron
PI	Profaz I
rFSH	Rekombinant Follikül Stimule Edici Hormon
SCF	Stem Hücre Faktörü
SHBG	Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TTE	Total Testosteron
TV-USG	Transvaginal Ultrason
USG	Ultrasonografi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
17-OHPG	17 Hidroksi Progesteron

ÖZET

ART SIKLUSLARINDA POLİKİSTİK OVER SENDROMU VE HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖR DÜZEYLERİ

AMAÇ: Hepatosit büyüme faktörü (HGF) mitogenez, anjiyogenez ve follikülogenez gibi birçok fizyolojik olayı düzenlemektedir. Folliküler sıvıda HGF konsantrasyonunun oosit maturasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Biz de bu çalışma ile kontrollü ovaryan hiperstimulasyon sikluslarında PCOS'lu hastalarla normal over yapısına sahip olan hastaların folliküler sıvı HGF düzeyleriyle oosit ve embriyo kalitelerini karşılaştırmayı amaçlamaktayız.

YÖNTEM: Kontrollü over stimülasyonu uygulanan 21 tanesi PCOS ve 38 tanesi kontrol olmak üzere 59 hastadan toplam 168 follikül sıvısı ve oosit değerlendirildi. Ayrıca insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulama ve oosit toplama (OPU) günü alınan serum örneklerinde HGF ve androjen düzeyleri ölçüldü. Follikül sıvıları HGF düzeyleri ELİSA'yla ve granüloza hücrelerinde HGF reseptörü (c-MET) mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR ile tespit edildi.

BULGULAR: Bazal serum androjen düzeyleri PCOS'da anlamlı yüksek bulundu. Serum HGF düzeylerinin PCOS grubunda OPU gününde hCG gününe göre ortalama 2.74 kat arttığı saptandı. Kontrol grubunda ise bu artış ortalama 2.18 kat bulundu. hCG ve OPU günü E2 ve androjen düzeyleri PCOS grubunda anlamlı yüksek bulundu. Folliküler sıvı ortalama HGF düzeyleri aynı gün alınan serum HGF düzeylerinden yaklaşık 86 kat fazla tesbit edildi. Fertilize olmuş oositlerin (2PN) folliküler sıvı ortalama c-MET ekspresyon düzeyleri fertilize olmayanlara göre belirgin yüksek saptandı (p:0.034). Kontrol grubunda follikül sıvısı ortalama HGF düzeyleri Grade 1 embriyo gelişen folliküllerde, Grade 2-4 embriyo gelişen folliküllerdeki düzeylerine göre anlamlı yüksek bulundu (p:0.03).

SONUÇ: Serum HGF düzeylerinin OPU gününde hCG gününün iki katına çıkması, HGF sentezinin artışında LH'nin rolü olduğunu düşündürmektedir. Grade 1 embriyolarda daha yüksek bulunan follikül sıvısı HGF düzeyleri, HGF ile insan embriyo kalitesi arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Fertilize olan oositlerde c-MET mRNA ekspresyon düzeylerinin belirgin yüksek olması, HGF'nin diğer bilinen sitokin sistemleri ile birlikte fertilizasyon başarısında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: HGF, c-MET, PCOS, Oosit maturasyonu, ICSI, Oosit kalitesi, Embriyo kalitesi

SUMMARY

HEPATOCYTE GROWTH FACTOR IN POLYCYSTIC OVARY SYNDROME DURING CONTROLLED OVARIAN HYPERSTIMULATION

OBJECTIVE: Hepatocyte growth factor (HGF) regulates many physiological responses such as mitogenesis, angiogenesis and folliculogenesis. A relation between the concentrations of HGF in follicular fluid and oocyte maturation has been reported. We aimed to evaluate levels of HGF in follicular fluid in respect to the quality of oocyte and embryo in patients with PCOS and normal ovary during controlled ovarian hyperstimulation cycles.

METHODS: Total 168 follicular fluid samples and their oocytes from 59 patients (21 PCOS and 38 control) undergoing IVF treatment were evaluated. The levels of serum HGF and androgens were measured on the day of human chorionic gonadotropin (hCG) administration and oocyte retrieval (OPU). The levels of follicular fluid HGF were measured by ELISA and mRNA expression of HGF receptor (c-MET) was detected by real-time PCR.

RESULTS: The basal levels of serum androgens were higher in PCOS patients comparing to controls. Levels of serum HGF on the day of OPU were showed a 2.74 fold increase in PCOS group compared to the day of hCG, whereas 2.18 fold in control group. On the day of hCG and OPU, mean E2 and androgen levels were higher in PCOS group. Follicular fluid samples contained 86 fold higher amounts of HGF compared with those of serum. Fertilized oocytes (2PN) had significantly higher c-MET expression levels in follicular fluid than those of oocytes that failed to fertilize (p:0.034). The mean HGF levels in the follicular fluid was higher in Grade 1 embryos than Grade 2-4's (p:0.03).

CONCLUSION: Doubling of serum HGF levels on the day of OPU compared to the day of hCG suggest that LH may have a role in HGF synthesis. Higher HGF levels in follicular fluid of grade I embryos were shown a relation between HGF and quality of embryo in human. Significantly higher c-MET mRNA expression levels in fertilized oocytes suggest that HGF might play a role with the other known cytokines systems, in the fertilization success.

Keywords: HGF, c-MET, PCOS, maturation of oocyte, ICSI, quality of oocyte, quality of embryo

1. GİRİŞ ve AMAÇ

In vitro fertilizasyon (IVF) yardımcı üreme teknikleri içerisinde yer alan ve 1978 yılından bugüne kadar gebelik elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Tekniğin başarısı siklus başına elde edilen gebelik oranları ile değerlendirilir. SART 2005 sonuçlarına göre siklus başına gebelik oranı %34, embriyo transferi başına canlı doğum oranı %34.3'dür (1). İngiltere 2004 yılı sonuçlarına göre siklus başına gebelik oranı %27.4, embriyo transferi başına canlı doğum oranı %26'dır (2). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi IVF Merkezinde ise siklus başına gebelik oranı %31.5, embriyo transferi başına canlı doğum oranı 2008 yılında %26,1'dir. IVF başarısına etki eden kadın ve erkeğe ait birçok faktör mevcuttur. Bu faktörler arasında anne yaşı, over rezervi, ovarian yanıt, sperm parametreleri sayılabilir (3-5). Gebeliğin devamı için en önemli parametre anne yaşıdır (6). Ovarian yanıtta folliküler mikroçevrede yer alan çeşitli hormonlar ve büyüme faktörlerinin etki ettiği bilinmektedir. Bu maddeler ovarian yanıtla birlikte fertilizasyon ve implantasyon oranları ile de ilişkilidir.

IVF'de elde edilen oositlerin matür olması fertilizasyon ve IVF başarısı ile doğrudan ilişkilidir. Oosit maturasyonunun tesbit edilmesi amacı ile direk mikroskopik gözlem dışında folikül sıvısında birçok biyokimyasal belirteç araştırılmıştır. Costa ve ark. (7), folliküler sıvıda yüksek estradiol ve testosteron düzeylerinin oositin matürasyonu ile ilgili olduğunu, ancak IVF başarısı ile ilişkisinin olmadığını göstermişlerdir. Buna karşın, yapılan bir başka çalışmada folliküler sıvı estradiol düzeylerinin gebelik elde edilen grupta serum estradiol düzeyi ile doğru orantılı olduğu gözlenmiştir (8). Diğer bir çalışmada folliküler sıvıda mevcut anti-müllerian hormon (AMH) düzeyi elde edilen oosit sayısı ile doğru orantılı ancak oosit maturasyonu ile ters orantılı bulunmuş, yüksek serum estradiol (E2) ve foliküler sıvı inhibin-B düzeyleri ise artmış ovarian yanıtla ilgili olduğu gösterilmiştir (9). Wu ve ark. (10), foliküler sıvı BMP15 düzeyleri ile fertilizasyon, klivaj ve embriyo kalitesini karşılaştırmışlar ve anlamlı ilişki saptamışlardır.

Hepatosit büyüme faktörü (HGF) disülfid bağı ile bağlı 60 kDA α -zincir ve 30 kDA β -zincirden oluşan heparin bağı bir glikoproteindir (11). Hepatosit büyüme faktörü ilk kez fulminan hepatitli hastaların plazmalarında keşfedilmiş (12), hepatositler için potansiyel bir mitojen olarak bulunmuş ve moleküler olarak tanımlanmıştır (13). Hepatosit büyüme faktörünün endotelial hücrelere direk etki ederek anjiyogenezi uyardığı, kan akımını ve kapiller yoğunluğu arttırdığı gösterilmiştir (14). Memelilerin over folliküllerinde teka hücre tabakası iyi vaskülarize iken granüloza hücre tabakası avaskülerdir (15) Overlerde vasküler

ağın gelişimi folliküler gelişim ile yakından ilişkilidir (16). Devam eden araştırmalar neticesinde HGF'nin farklı tipteki epitelyal hücrelerde büyüme, motilite ve morfogenez üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (17).

Hepatosit büyüme faktörü mezenşimal hücrelerden köken alan teka hücrelerinde sentezlenir ve follikül gelişimi sırasında granüloza hücre proliferasyonunu uyarır (18). Bu proliferatif etkisi yanında steroid sentezinin çeşitli basamaklarında da etki gösterdiği bulunmuştur. Sıçan over folliküllerinden elde edilen teka hücrelerinde HGF'nin progesteron üretimini uyardığı, geçici olarak lüteinize hormon (LH) bağımlı andrositeron üretimini azalttığı gösterilmiştir. Buradan hareketle foliküldeki androjen düzeyleri azaltarak follikülün apoptozis ile atreziye gidişini engelleyen mekanizmalardan birinin HGF sistemi olduğu iddia edilmiştir (18). Sığır over folliküllerinde yapılan bir çalışmada insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulanması ile HGF mRNA değerlerinde belirgin artış saptanmıştır. Böylece LH'ın HGF'ü arttırarak over folliküllerinde büyümeyi uyardığı tesbit edilmiştir (19).

Follikül sıvısında HGF varlığı ilk kez Osuga ve ark (20) tarafından gösterilmiştir. Follikül sıvısında HGF'nin aynı gün alınan serum örneklerinden 90 kat fazla bulunduğunu saptamışlardır. Hepatosit büyüme faktörünün follikül sıvısındaki düzeyinin follikül sıvısı progesteron ve hCG düzeyleriyle doğru orantılı olduğu; östrojen ve testosteron düzeyleriyle korelasyon göstermediğini bulmuşlardır. Ito ve ark (21) ise HGF'nin insan granüloza hücrelerinden progesteron sentezini arttırdığını ve hCG'nin progesteron sentezini arttırıcı etkisini değiştirmedığını göstermişlerdir. Buradan hareketle HGF ve hCG'nin progesteron sentezini aynı yolak üzerinden arttırabileceğini öne sürmüşlerdir. Follikül sıvısı içerisindeki HGF düzeyleri ile oosit maturasyonu ilişkisini gösteren literatürdeki tek çalışma sonucu, HGF'nin matür oositlerde immatür oositlere kıyasla belirgin artmış olduğu tespit edilmiştir (22).

Polikistik over sendromu (PCOS) artmış LH salgılanması, insülin direnci sonucu gelişen hiperinsülinemi, ovarian hiperandrojenizm, polikistik over ve azalmış fekundite ile karakterize heterojen bir sendromdur (23). Hiperandrojenizm ve hiperinsülinemi folliküler mikroçevreyi etkileyerek oosit gelişimini bozmaktadır ve immatür oosit gelişimine yol açmaktadır (24). Folliküler sıvı HGF düzeylerinin matür oositlerde immatür oositlere kıyasla daha yüksek bulunduğu ve PCOS'lu hastalarda immatür oositlerin daha fazla oranda bulunduğu bilinmektedir. Biz de bu çalışma ile IVF-ICSI sikluslarında PCOS'lu hastalarla normal over yapısına sahip olan hastaların folliküler sıvıda mevcut HGF düzeyleriyle oosit ve embriyo kalitelerini karşılaştırmayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE VE YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ

İnfertilite, çiftlerin bir yıl süre ile korunmaksızın düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen gebelik elde edememesidir (25). Üreme çağındaki çiftlerin %10-15'inde infertiliteye rastlanır. Çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde ise kadın infertilitesi mevcuttur. Ancak %10-15 çift ise günümüzdeki mevcut standart tanısal testler ile izah edilemeyen (açıklanamayan) infertiliteye sahiptir (26). İnfertil çiftlerin yaklaşık %20'si ise gebelik elde etmek için yardımcı üreme tekniklerine (ART) ihtiyaç duyar.

İn vitro fertilizasyon (IVF) bir ART yöntemi olup, ovarian folliküllerden aspire edilen oositler ile ejakulattan veya cerrahi olarak elde edilen spermelerin laboratuvar ortamında bir araya getirilmesi, fertilizasyonu ve in vitro kültür şartlarında gelişimini takiben embriyoların intrauterin kaviteye transferi şeklinde özetlenebilecek bir tedavi sürecidir.

İn vitro fertilizasyon (IVF) sonucu ilk bebek 1978 yılında dünyaya gelmiştir. Erkek infertilitesinde bir devrim olarak görülen İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ilk kez 1992'de uygulanmıştır. Pek çok yenilik ve gelişmelere rağmen ART sikluslarında ovarian hiperstimulasyon sendromu (OHSS) ve çoğul gebeliklerle buna ait komplikasyonlar temel problemler olarak devam etmektedir. Hastaya ait özelliklerdeki farklılıklar, ART'ye verdikleri farklı yanıtlar nedeni ile tedaviler kişiselleştirilmelidir (27).

2.1.1. Kadın İnfertilitesi

İnfertilite problemleri içerisinde en sık neden kadın infertilitesidir. Ovulatuvar fonksiyon bozukluğu, servikal, tubal ve uterin anormallikler belli başlı nedenleri oluşturur.

2.1.1.1 Ovulatuvar Fonksiyon Bozuklukları

Kadın infertilitesinin en sık nedenidir (%40). Ovulatuvar fonksiyon bozukluğu kendini anovulasyon ve oligo-ovulasyon şeklinde göstermektedir. Menstural sikluslarda ovulasyon varlığı bazı bulgu ve testlerle gösterilir.

Menstrual siklusların düzeni: Düzenli (25-35 gün arası) menstrual sikluslar, meme hassasiyeti ya da dismenore genellikle ovulasyonu indirekt olarak gösterse de kesin bulgular değildir.

Bazal vücut ısı ölçümü: Bazal vücut ısı (BBT) dinlenme halinde bazal durumdaki vücut ısıdır. Luteal fazda progesteronun termojenik etkisinden dolayı vücut sıcaklığında 0,2-0,3°C artış olur. Ancak yapılan çalışmalar BBT'nin ovulasyonu değerlendirmede güvenilir olmadığını göstermektedir (28).

Serum progesteron ölçümü: Orta luteal fazda yapılmalıdır. Menstruasyon döngüleri 28 gün olan kişilerde menstruasyonun 21. gününde ölçülür. Ortalama zamanı menstruasyon başlangıcından yedi gün öncedir. Düzensiz adet gören kadınlarda serum progesteron düzeyi sonraki siklus başlayana kadar haftalık olarak ölçülür. Orta luteal dönemde 10 ng/ml'nin üzerinde olması beklenir. Progesteronun pulsatil salınımından dolayı siklusun 20-24. günleri arasında üç serum örneğinin incelenmesi ile luteal faz defekti tanısı konur (25).

Üriner LH ölçümü: İdrar LH kitleri %90 olasılıkla 24-48 saat içerisinde ovulasyonu gösterebilmektedir. LH artışını doğru olarak saptamak için beklenen artıştan 2-3 gün önce başlamak üzere tüm siklus boyunca günlük yapılmalı, ilk pozitif testten sonra devam edilmemelidir. Genellikle ovulasyon, idrar LH artımından 14-26 saat sonra olmaktadır. Fertilitenin en yüksek olduğu dönem, LH artımının olduğu gün ve takip eden iki gündür (29) Ancak kitlerin pahalı olması ve ilişki gününü belirlemedeki psikolojik baskısı nedeni ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından üriner LH kitlerinin kullanımı önerilmemektedir (30).

Endometrial biyopsi: Progesteronun histolojik etkisini göstermek amacı ile endometrial biyopsi uygulanır. Luteal faz yetersizliği veya bozukluğu tanısının konulmasında kullanılmıştır. Ancak günümüzde geleneksel endometrial histolojik gün saptanmasının geçerli bir tanısal yöntem olmadığı gösterilmiştir. Kronik anovuluar kadınlarda endometrial hiperplazinin gösterilmesi amacı ile kullanılmaktadır (31).

Trans-vaginal ultrasonografi (TV-USG): Preovuluar folliküllerin büyüme ve gelişmelerinin seri USG takipleri ile izlenmesidir. Ovulasyon zamanını tahminde en iyi yöntemdir (32).

Anovülasyon ve infertilite ile giden hastalıklar gelişimin nedenlerine göre 3 kategoride incelenmektedir:

- a) Hipogonadotropik anovülasyon (kilo ve vücut kompozisyonunda değişiklikler, stres, aşırı egzersiz, hipotalamusun infiltran hastalıkları, prolaktinoma, boş sella sendromu, Sheehan sendromu, Cushing hastalığı, akromegali vb.)
- b) Normogonadotropik anovülasyon (PCOS)
- c) Hipergonadotropik anovülasyon (prematür ovarian yetmezlik) (26)

2.1.1.2. Servikal Faktör

Servikal mukus, vagina ve ejakulattan spermleri yakalayarak diğer seminal proteinleri ayırır, anormal morfolojili spermleri filtre eder, biyokimyasal olarak hazır hale getirir ve sperm için rezervuar görevi yapar (32).

Postkoital Test: Cinsel ilişkiden 2-12 saat sonra alınan servikal mukus örneğinin özelliklerinin incelenmesine dayanır. Fakat günümüzde testin prediktif değerinin düşük olması, anormal sonuçların ve tedavinin gebelik sonuçlarını etkilememesi nedeniyle terk edilmiştir (33).

2.1.1.3 Uterin Faktör

Konjenital uterin anomaliler, kazanılmış uterin lezyonlar (polip, myom, adezyonlar), enfeksiyonlar ve sistemik hastalıklar (Trombofililer, endokrin patolojiler, immunolojik hastalıklar) uterin fonksiyonları etkileyerek implantasyonu azaltmaktadır.

Konjenital Uterin Anomaliler: Embriyogenezde müllerian kanal gelişim ve füzyon defektlerini içerir. En sık görülen anomali septat uterusur (%1). Komplet ya da parsiyel olabilir. Tanısında histerosalpingografi (HSG) kullanılabilir ancak bikornuat uterusu ayırt edilemeyebilir. TV-USG %100 sensitivite ve %80 spesifiteye sahiptir. Manyetik rezonans görüntüleme tüm uterin anomalilerde tercih edilebilecek bir yöntemdir. Ancak septat uterus tanısında histeroskopi ve laparoskopi altın standarttır. Uterin histeroskopik septoplasti tedavide temel seçenektir. Tekrarlayan gebelik kayıpları olan hastalarda gebelik sonuçlarını iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu operasyon, septat uterusu ek açıklanmayan infertilite ya da tekrarlayan gebelik kaybı olan kişilere uygulanmalıdır. Diğer uterin anomaliler ise gebelik kayıpları ve obstetrik komplikasyonlarla ilişkilidir kişinin gebe kalma potansiyelini etkilemez (34).

Leiomyomlar: Myomların fertilitiyi azaltması ile ilgili sonuçlar tartışmalıdır. Ancak bunu destekleyen çalışmalar yerleşim yerine göre myomların sperm, ovum geçisine ya da embriyo implantasyonuna engel olabileceğini göstermişlerdir. Bununla birlikte myomu olan ve olmayan infertil kadınların IVF sonuçları karşılaştırıldığında gebelik ve implantasyon oranları submükoz yerleşimli myomlarda düşükken; kaviteye bası yapmayan intramural ve subseröz myomlarda normaldir (35). Submükoz myomların histeroskopik rezeksiyonu gebelik ve implantasyon oranlarını arttırmaktadır. Diğer myomların tedavileri ise hastaya göre planlanmalıdır (36).

İntrauterin Adezyonlar (Asherman Sendromu): İntrauterin adezyonlar en sık geçirilmiş küretaj, daha nadir olarak da metroplasti operasyonları ve histeroskopik myomektomi sonrası görülmektedir. Menstrual bozukluklara ve infertiliteye yol açarlar. Histeroskopi tanı ve tedavide etkin biçimde kullanılmaktadır. Histeroskopik cerrahiye yardımcı ek tedavi yöntemleri tanımlanmıştır. İşlem sonrası endometriumun iki tabakasının tekrar birleşmemesi için rahim içi araç (RIA) ve balon kateter önerilmiştir. Ayrıca yine işlem sonrası ekzojen östrojen kullanımının endometrial epitelizasyonu hızlandırdığı ve adezyonların tekrarını önlediği iddia edilmektedir. Ancak bu konuda karşılaştırmalı bir çalışma yoktur.(32)

2.1.1.4 Tubal Faktör

Tubal patolojiler infertilite nedenlerinin %14'ünü oluşturmaktadır. Geçirilmiş pelvik enfeksiyonlar, rüptüre apandisit, tubal cerrahi ve ektopik gebelik öyküsü belli başlı risk faktörleridir. Histerosalpingografi tubal patoloji riski düşük olan hastalarda bir problem olmadığını göstermek ve tubal yıkamanın faydalı etkilerinden dolayı önerilmektedir. Ayrıca tubal patoloji açısından yüksek riskli hastalarla düşük riskli hastaların ayırımında Chlamydia trochomatis immunglobulin G serolojisi taraması tavsiye edilmektedir. Chlamydia serolojisi pozitif çıkan ya da HSG'de bilateral tubal tıkanıklık tesbit edilen hastalara laparoskopi önerilmektedir (37).

2.1.2. Erkek İnfertilitesi

Semen analizi kriterlerine göre erkek infertilite nedenleri şunlardır:

a) Ejakülasyon yokluğu: ilaçlar, cerrahi, vasküler oklüzyon, diyabet, psikolojik bozukluklar

b) Azoospermi: Seminifer túbüler skleroz (Kleinfelter sendromu), germinal aplazi (idiopatik, ilaç, radyasyon, mozaik Kleinfelter sendromu, XYY sendromu), matürasyon arresti (idiopatik, XYY sendromu, varikosel), duktal obstrüksiyon, endokrinopati

c) Oligospermi: İdiopatik, kriptoorşidizm, varikosel, ilaçlar, sistemik enfeksiyonlar, endokrinopati

d) Sperm yapısal defekti: uzamış cinsel perhiz, idiopatik, genital enfeksiyonlar, antisperm antikor (38).

2.1.3. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite tanısı, infertilite araştırmasındaki tüm standart testlerin normal çıkması neticesinde konulmaktadır. Merkezler ve çalışmalar arasında değişkenlik olmakla beraber başvuran çiftlerin ortalama %10-30'u açıklanamayan infertilite tanısı almaktadır.

Açıklanamayan infertilite, standart değerlendirme metodlarıyla tanısı konulamayan sperm veya oosit fonksiyon anormallikleri, fertilizasyon, implantasyon veya pre-embriyo gelişim bozukluklarını içermektedir. Siklus başına gebelik oranı %2-4 kadardır. Tedaviden bağımsız gebelik oranları artan kadın yaşı ve infertilite süresi ile ters orantılıdır (39).

2.2. İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ

2.2.1. Öykü ve Fizik Muayene

İnfertil bir çiftin değerlendirilmesinde detaylı bir öykü, fizik ve pelvik muayene önemli basamaklardır. Öyküde önem taşıyan bilgiler:

- 1) Kadın ve erkeğin yaşı
- 2) Evlilik ve infertilite süresi
- 3) Daha öncesine ait gebelik, düşük ve erken doğum öyküsü
- 4) Menstrasyon bilgileri
- 5) Dismenore, galaktore, hirsutizm
- 6) Sistemik hastalık ve ilaç kullanımı
- 7) Soygeçmiş
- 8) Sigara ve alkol kullanımı
- 9) Alerji

Öykü alındıktan sonra hastanın fizik ve jinekolojik muayenesi yapılır. Herhangi bir patolojik bulgu varsa kaydedilir. Jinekolojik muayenenin bazal USG tetkiki ile tamamlanması her zaman tercih edilen bir husustur. Fizik ve jinekolojik muayene aşağıdaki esaslara göre yapılmalıdır;

- 1) Kilo ve vücut kitle indeksi
- 2) Tiroid bezinde genişleme, nodül, hassasiyet
- 3) Memede sekresyon ve özellikleri
- 4) Artmış androjenizasyon bulguları
- 5) Pelvik veya abdominal hassasiyet, organ büyümesi veya kitle
- 6) Vajinal veya servikal anormallik, sekresyonlar veya akıntı
- 7) Adneksler veya cul-de-sac'da kitle hassasiyet veya nodularite (32)

2.2.2. Laboratuvar

İnfertil hastalarda laboratuvar testlerinin amacı ovulasyon varlığını, fallop tüplerinin açık olduğunu ve erkeğin normal bir semen analizine sahip olduğunu göstermektir. Bunun dışında kullanılan diğer testleri yapmayı bu testin bizim tedavi yönetimimizi ne kadar etkileyeceğini düşünerek karar vermeliyiz. Normal ovulasyon varlığında tubal yapışıklıklara yol açmayan hafif endometriyozis, luteal yetmezlik, antisperm antikorlar, prolaktin yüksekliği, tiroid fonksiyon bozukluğunun tedavisinin gebelik oranını arttırmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle bu taramaların rutin olarak kullanımı önerilmemektedir (40).

Folikül uyarıcı hormon (FSH): Menstrasyonun üçüncü günü ölçülen bazal FSH değerleri over rezervinin tesbitinde en sık kullanılan yöntemdir. Ölçüm değerinin 10-15 IU/L'nin altında olması beklenir. Bu değer 15-24.9 IU/L'e olması yarı yarıya azalmış fekundite ile ilişkilidir (41).

Estradiol (E2): Menstrasyonun üçüncü günü ölçülen E2 değerinin 80 pg/ml'den fazla olması azalmış fekundite ile ilişkilidir. Erken E2 artışı FSH'yı baskılayarak, artmış FSH değerini maskeleyebileceğinden dolayı FSH ve E2'nin beraber değerlendirilmesi önerilmektedir (41).

2.2.3. Pelvik Ultrasonografi

Pelvik organ ve yapıların değerlendirilmesinde ultrasonografi (USG) kullanılabilir non-invazif bir yöntemdir. Bazal USG ile Müller sistemine ait konjenital anomaliler, intramural ve submüköz myomlar, hidrosalpinks, endometrial polipler, endometrioma, over kistleri ve

polikistik over yapısı görülebilir. Transvaginal ultrasonografide (TV-USG) polikistik over yapısı en az 15 adet follikül kistinin görülmesi ile konur. Bazal USG’de çok kalın bir endometrium submukozal myom ya da endometrial polip açısından uyarıcı olmalıdır. Salin infüzyon sonografi (SİS) kullanılarak bu ayırım yapılabilir. Distansiyonun olmadığı ince endometriumda intrauterin adezyonlar akla gelmelidir (40).

2.2.4. Histerosalpingografi (HSG)

Histerosalpingografi, uterin kavitenin boyutu ve şekli hakkında bilgi vermektedir. Uterin kavite defektine neden olan myom, polip veya sineşi varlığını gösterebilir. Menstrual kanamadan 2-5 gün sonra yapılarak, erken gebelik riskini elimine etmek gerekir. İşlemden 1-2 saat önce prostaglandin inhibitörleri kullanımı işleme bağlı rahatsızlığı giderecektir. Bu işlem sonrası %1 enfeksiyon komplikasyonu mevcuttur. Tubal hastalıktan şüpheleniliyorsa ve HSG’de distal tıkanıklık mevcutsa yüksek enfeksiyon riskinden dolayı antibiyoterapi uygulanmalıdır. Akut pelvik enfeksiyon atağından en az altı hafta sonra uygulanmalıdır. İşlem serviksten girilerek uterus içerisine radyoopak bir maddenin verilmesi şeklinde yapılır. Opak madde buradan fallop tüplerine geçer. Fluoroskopi altında görüntüler kaydedilir. İki film alınması hastayı sadece 500mRad radyasyona maruz bırakır.

Tubal tıkanıklıkların tanısında HSG %65 duyarlılık ve %83 seçiciliğe sahiptir. Yanlış negatif sonuçlar sık görülür. Kontrast madde enjeksiyonu kornual spazm yaparak yanlışlıkla proksimal tubal tıkanıklık tanısı koydurabilir. Yanlış pozitif sonuçlar ise kontrastın genişlemiş hidosalpinkse girmesi sonucu görülebilir (32).

2.2.5. Laparoskopi

Tubal ve peritoneal hastalıkların tanısında “altın standart” laparoskopidir. Laparoskopi sırasında bütün pelvik organlar, subseröz ve intramural myomlar, peritubal ve periovarian adezyonlar ve endometriozis varlığı görülebilir. Histerosalpingografideki anormal bulguların doğruluğunun saptanması için laparoskopi uygulanabilir. Laparoskopi sırasında metilen mavisi veya indigo karmen gibi bir boya maddesi serviksten verilip, fimbrial geçişine bakılarak tubal açıklık değerlendirilir. Bu sırada tüpler ve fimbriyal yapılar fonksiyonel açıdan daha iyi olarak değerlendirilir. Tubal tıkanıklık, pelvik yapışıklıklar ve endometriozis tanısı konulup, aynı anda tedavi edilebilir. Klasik infertilite araştırmasında kadında önerilen

en son uygulanacak tetkik laparoskopi ile endometriozisin ve diğerk pelvik patolojilerin araştırılmasıdır (40).

2.2.6. Histeroskopi

Histeroskopi, fertiliteye olumsuz etkisi olan intrauterin adezyonların tedavisi, submukozal myom ve endometrial polip ayırımında ve tedavisinde kesin sonuç veren bir yöntemdir. Eđer HSG veya sonohisterografide bir patoloji görölmüş ise tanısalk ve operatif histeroskopi yapılabilir. Kadında histeroskopi genellikle ileri evre bir tetkik yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle tekrarlayan ART başarısızlıklarında, zor intrauterin inseminasyon ve zor embriyo transferi olan hastalara uygulanması önerilir (40).

2.2.7. Sonohisterografi

Tubal açıklığı değerlendiren bir başka yöntem ise sonohisterografi'dir. İşlem tubal açıklığı gösteren Douglasta sıvı birikiminin görölməsi esasına dayanır. Uterus kavitesini değerlendirmede faydalıdır, fakat tubaların durumu hakkında değerı sınırlıdır (32).

2.2.8. Erkek Hastanın Değerlendirilmesi

Hastanın öyküsü ayrıntılı olarak alınmalıdır. İnfertilite öyküsü, cinsel yaşam öyküsü, çocukluk çağı hastalıkları ve gelişim öyküsü, enfeksiyonlar, geçirilmiş operasyonlar, gonadal toksinlere maruziyet, sistemik hastalıklar, kullanılan ilaçlar ve aile öyküsü sorgulanmalıdır.

Erkek infertilitesi değerlendirilirken öykünün yanında bir ürolog tarafından yapılmış fizik muayene ve en azından iki semen analizi gereklidir. İnfertilitenin etiyolojisine göre ek testler istenebilir. Bu testler; ek semen analizi, endokrin değerlendirme, USG, semen ve spermle ilgili özel testler ve genetik taramadır.

2.2.8.1. Klasik semen analizi

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasındaki ilk adım en az dört hafta ara ile uygun yapılmış iki semen analizi olmalıdır. Bu konu WHO tarafından bir kitap halinde hazırlanmış ve dünyada en çok kullanılan referans kitap haline gelmiştir (Tablo.1).

Tablo.1. Klasik semen analizi (42)

Görünüm:	Homojen, gri-opak
Viskozite:	<2 cm
Likefaksiyon süresi:	>60 dakika
Volüm:	>2 ml
pH:	7,2-8,0
Sperm sayısı:	>20 milyon/ml
Total sperm sayısı:	>40 milyon/ml
Total motilite:	>%50
(a)Hızlı ileri hareket:	>%25
Morfoloji:	>%30 WHO kriteri (>%14 Kruger)
Vitalite:	>%75
Beyaz küre:	<1 milyon/ml
İmmunobead test:	<%50 immün taneciklere bağlı motil spermatozoolar
MAR Testi:	<%50 motil spermatozoolarda partiküller yapışık
Bioasseyler	
Hemizona İndeks	>%35
HOS Test	>%60
Sperm penetrasyon assay	>%10

Bazı semen değişkenleri için terminoloji şu şekildedir:

- **Normospermi:** Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat
- **Oligospermi:** Referans değerden düşük sperm konsantrasyonu
- **Astenospermi:** Hareketlilik için referans değerden daha düşük değer
- **Teratospermi:** Morfoloji için referans değerden daha düşük değer
- **Oligoasthenoteratospermi:** Her üç değişkenin de bozukluğuna işaret eder
- **Azospermi:** Ejakülatta hiç spermatozoa bulunmaması
- **Aspermi:** Hiç ejakülat elde edilememesi (42)

Klasik semen analizi için incelenecek ejakülat en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrasında mastürbasyon ile steril bir kaba alınmalı ve cinsel perhiz yedi günü geçmemelidir. Örnek en geç 30 dakika içerisinde tetkik yapılacak laboratuara getirilmiş olmalıdır. Ejakülatın makroskopik muayenesinde görünümü, miktarı, likefaksiyon zamanı, viskozitesi ve pH'ı değerlendirilir. İlk değerlendirme için iki örnek alınmalıdır. İki örnek arasında geçen zaman

yedi günden az, üç haftadan çok olmamalıdır. Mikroskopik incelemede sperm sayısı, hareketliliği, yuvarlak hücre sayısı ve sınıflandırılması, aglütinasyonun varsa derecelendirilmesi ve morfoloji incelenir.

Sayı: Güvenilir bir değerlendirme için ideal olan 100 karedeki spermleri saymaktır. Kullanılan alete bağımlı olarak, tek karedeki ortalama sperm sayısı temel alınıp sayım milyon/ml olarak ifade edilir.

Hareketlilik: WHO hareketliliği dört sınıfta değerlendirilmektedir;

- a) Hızlı doğrusal progresif hareket
- b) Yavaş doğrusal ya da doğrusal olmayan hareket
- c) Progresif olmayan hareketlilik
- d) Hareketsiz (42)

Morfoloji: Kruger ve ark. (43) tarafından 'Strict' kriterleri ile morfoloji değerlendirilmesinin tanımlanmasıyla bu parametre giderek artan bir önem kazanmıştır. Bu yöntem ilk kez 1986 yılında yayınlanmış ve 1990 yılında Menkveld ve ark. (44) tarafından modifiye edilmiştir. Kısa süre içerisinde rutin incelemede yerini alan bu yöntemin, WHO kriterlerine göre morfoloji değerlendirilmesi yöntemine olan üstünlüğü de gösterilmiştir. Kruger'e göre morfoloji %4'den az, %4-14 ve %14'den fazla olarak sınıflandırılmaktadır. Normal morfoloji %14'den az olduğunda IVF ile her oosit başına fertilizasyon oranı %37 iken, %14'den büyük olanlarda oran %91'e yükselmektedir (38).

2.3. OVARIAN STİMULASYON REJİMLERİ

In vitro fertilizasyonda ideal ovarian stimülasyon modeli hastaya göre bireyselleştirilmiş, düşük siklus iptal oranı, düşük ilaç maliyeti, düşük risk ve yan etki, en az ilaç kullanımı ve tekiz gebelikle sonuçlanan bir tedavidir. Böyle bir tedavi modeli henüz elde edilmiş değildir. Ovarian stimülasyon modeli hastanın yaşı, over rezervi, varsa önceki stimülasyon yanıtlarına göre seçilmelidir (45).

2.3.1. Uzun Protokoller

Sıradan bir siklusta, GnRH agonist tedavisi mid-luteal aşamada ovulasyondan yaklaşık bir hafta sonra başlar. Bu dönemde endojen gonadotropin düzeyleri düşüktür ve agonistlerin sahip oldukları alev (flare) etkileri yeni bir folliküler gelişimi uyarmak anlamında en düşük

seviyededir. Tedavi aynı zamanda erken folliküler dönemde de başlayabilir ancak hipofizer baskılanma için ihtiyaç duyulan süre daha uzundur. Analog tedavisi oluşacak mensturasyonun üçüncü gününe kadar tam dozda verilir. Üçüncü gün yapılan USG’de 10 mm’den büyük follikül olmaması ve serum E2’nin 50 pg/ml’den az olması yeterli supresyon elde ettiğimizin göstergeleridir. Mensturasyonun üçüncü gününden itibaren tedaviye gonadotropinler eklenir ve analog dozu yarıya düşürülür. Gonadotropin dozu hastanın yaşı, over kapasitesi ve daha önce indüksiyon almışsa o tedavideki yanıtlarına göre başlanır. Gonadotropin dozları basamaklı artış veya azalma şeklinde follikül gelişimine göre değiştirilir. Seri serum E2 tayini ve over folliküllerinin TV-USG ile değerlendirilmesi ile uyarıya cevap değerlendirilir. Genelde hedef 17-18 mm çapta en az iki follikül elde etmektir ve ideal olarak birkaç tane 14-16 mm arasında follikül olabilir. Serum E2 düzeyi ise 14 mm ve üstü folliküller için follikül başına 200 pg/ml’dir. Bu hedefe ulaşıldığında 5000-10000 IU hCG uygulanır ve 34-36 saat sonra oosit toplama işlemi yapılır.

Uzun protokoller ART sikluslarında en çok tercih edilen protokollerdir. Luteal fazda ya da folliküler fazda başlansın uzun protokolün istenmeyen bir yan etkisi fonksiyonel kist oluşumudur. Tedavi öncesi oral kontraseptif kullanımı bu yan etkiyi azaltmaktadır. Oral kontraseptifin bir başka yararı ise GnRH analog kullanımı sırasında erken gebelik olasılığını engellemesidir (46).

Bazen stimülasyon aşırı artmış folliküler cevap, artmış masif ovarian genişleme, bütün folliküllerde artış ve yüksek serum E2 düzeyleri (3000 pg/ml’den fazla) ile sonuçlanabilir. Bu durumda OHSS riski belirgin olarak artmıştır. Bu hastalarda siklus iptal edilebilir; ‘coasting’ denilen analoga devam edilirken 1-3 gün gonadotropin dozu kesilip serum E2 normale gelince hCG verilebilir; embriyo transfer günü 5.güne geciktirilebilir ya da embriyolar dondurulabilir (45).

2.3.2. Kısa Protokoller

Over rezervinin kısıtlı olduğu (poor responder) olgularda kullanılır;

- a) Kadın yaşı >40
- b) Günlük ortalama gonadotropin dozu >300 IU
- c) hCG günü follikül sayısı <5
- d) Elde edilen matür oosit sayısı <5
- e) Erken folliküler faz FSH >15 mIU/ml

f) hCG günü E2<600 pg/ml (47)

Kısa protokolde GnRH analogu mensturasyonun 2-4. gününde verilir, daha sonra dozu azaltılır ve gonadotropin enjeksiyonuna mensturasyonun 3. günü başlanır. Follikül gelişimi TV-USG ile takip edilerek gerekirse gonadotropin dozları değiştirilir. Genelde hedef 17-18 mm çapta en az iki follikül elde etmektir ve ideal olarak birkaç tane 14-16 mm arasında follikül olabilir. Bu hedefe ulaşıldığında 5000-10000 IU hCG uygulanır ve 34-36 saat sonra oosit toplama işlemi yapılır.

Ultra-kısa protokol ise alev (flare) etkiyi uyarmak için agonist tedavi üç gün süre ile verilir, daha sonra kesilir; tedavi sadece gonadotropinle devam eder. Ancak erken LH artışları diğer protokollere göre daha sıktır çünkü endojen gonadotropin salgılanmasını baskılamak için daha uzun süre analog tedavisi gerekmektedir. Düşük başarı oranları nedeni ile nadiren uygulanır (45).

Mikrodoz protokolünde, tedavi öncesinde oral kontraseptif kullanımı ile folliküler faz başlangıcında verilen GnRH-a etkisi ile gelişecek korpus luteumun kurtarılması problemi ortadan kaldırılmaktadır. GnRH-a dozunun düşük tutulması (80 µg/gün leuprolide asetat) ile ekzojen gonadotropinlere endojen hormonlar destek vermektedir (45).

Flare etkinin dozu, klasik ko-flare protokollerinde görülen erken LH yükselmesine neden olacak düzeye ulaşamamaktadır. Bu protokolde 21 gün süre ile oral kontraseptif kullanılır, ilaç bitiminde üç gün ara verilir. Ardından iki gün GnRH-a başlanır ve 3.günden itibaren rFSH ve HMG eklenir. Diğer takipler önceden belirtildiği gibi yapılır (45).

2.3.3. Antagonist Protokoller

GnRH antagonistleri doz bağımlı şekilde GnRH reseptörlerini bloke eder ve hızlı şekilde gonadotropin salınımını inhibe ederler. Antagonist tedaviye genellikle gonadotropin tedavisi başlandıktan 5-6 gün sonra ya da en büyük follikül 13-14 mm çapına ulaştığında başlanır. Antagonist ve gonadotropinler hCG gününe kadar birlikte verilir. Alternatif olarak tek ve yüksek doz antagonist kullanılabilir. Tek doz antagonist siklusun 8.günü verilir. Tek doz antagonist erken LH artışını 96 saat kadar geciktirecektir. Yavaş cevap verenlerde ise 2.doz antagonist gerekebilir. Genelde hedef 17-18 mm çapta en az iki follikül elde etmektir ve ideal olarak birkaç tane 14-16 mm arasında follikül olabilir. Bu hedefe ulaşıldığında 5000-10000 IU hCG uygulanır ve 34-36 saat sonra oosit toplama işlemi yapılır.

Antagonist protokollerde kullanılan toplam gonadotropin dozunun daha az olması nedeni ile maliyeti daha azdır. Önemli bir komplikasyon olan OHSS riski analog protokollere göre daha düşüktür. Ancak elde edilen oosit ve embriyo sayısı ve klinik gebelik oranı da antagonist sikluslarda daha düşüktür (48).

2.4. OVULASYON İNDÜKSİYON MONİTORİZASYONU

Hastaların takibinde E2 ve TV-USG kullanılır. Follikül boyutunun takibinde ve hCG gününün belirlenmesinde ultrason kullanılır. Ortalama follikül boyutu 16-18 mm'ye ulaşan iki adet follikül görüldüğünde hCG yapılır. Ayrıca follikülometrinin son aşamasında endometrium kalınlığı da ölçülür. Endometrium kalınlığı 7 mm'nin altında olduğu olgularda gebelik oranı anlamlı düşüktür (49). Normal giden bir siklusta geç foliküler fazda E2'nin birgün önceki değerine oranla %50 civarında artması, folliküllerin ise 1-3mm/gün büyümeleri beklenir.

Ovulasyon indüksiyonunda gonadotropin başlanan günden hCG gününe kadar geçen süre 10-12 gündür. hCG yapıldıktan 34-36 saat sonra yumurta toplama işlemi (oocyte pick-up, OPU) yapılır.

2.5. FOLLİKÜL ASPİRASYONU VE LABORATUAR İŞLEMLERİ

İntravenöz sedasyon altında TV-USG eşliğinde 16-18G çift ya da tek lümenli follikül aspirasyon iğnesiyle aspirasyon/irrigasyon şeklinde OPU gerçekleştirilir. OPU işleminde elde edilen folikül sıvısı hemen laboratuara iletilerek inverted mikroskop altında incelenir ve bulunan oositler oosit kültür sıvısının içine konularak inkübatöre kaldırılır. Matür oositler 4-6 saat sonra fertilizasyon için hazır hale gelir.

Matür olan MII oositlerde kümülüs korona hücreleri oositin çevresinde homojen bir dağılım gösterirken, germinal vezikül parçalanmış ve birinci polar cisimcik atılmıştır.

Kadından oosit toplandığı sırada eşinden de sperm örneği alınmaktadır. Elde edilen motil spermeler yıkandıktan sonra yoğunlaşma ve motilite tekrar değerlendirilerek 37°C'de %5 CO₂'li enkübatörde 30 dakika bekletilir. IVF yapılacaksa oosit başına 100-150 bin sperm ile inseminasyon yapılır. Fertilizasyon klasik IVF'de inseminasyondan 16-18 saat sonra; ICSI'de ise 14-16 saat sonra 2 adet pronükleus oluşumu ile tesbit edilir. Fertilize oositler uygun kültür

ortamına aktarılarak embriyo kalitesi açısından günlük takip edilir. İyi kalitede embriyolar 48-72 saat sonra uygun görülen sayıda hastaların uteruslarına transfer edilir (50).

2.6. OOGENEZİS

Overlerin iki önemli fonksiyonu gametogenez ve steroidogenezdir. Oositlerin periyodik olarak oluşum ve atılımları geniş anlamda follikülogenezdir. İntrauterin hayatta 6-8.haftalarda germ hücrelerinde hızlı mitotik bölünmelerle ilk işaretlerini veren ovarian başkalaşım ile 16-20.haftalarda 6-7 milyon oogoniaya ulaşılır. Bu gonadın en yüksek oogonal seviyesidir. Doğum sırasında overler 1-2 milyon germ hücresi içerir. Pubertede bu sayı 300.000-500.000'e düşer. 35-40 yıl süren reprodaktif dönemde 400-500 germ hücresi ovulasyon için seçilmekte diğerleri atreziye uğramaktadır (51).

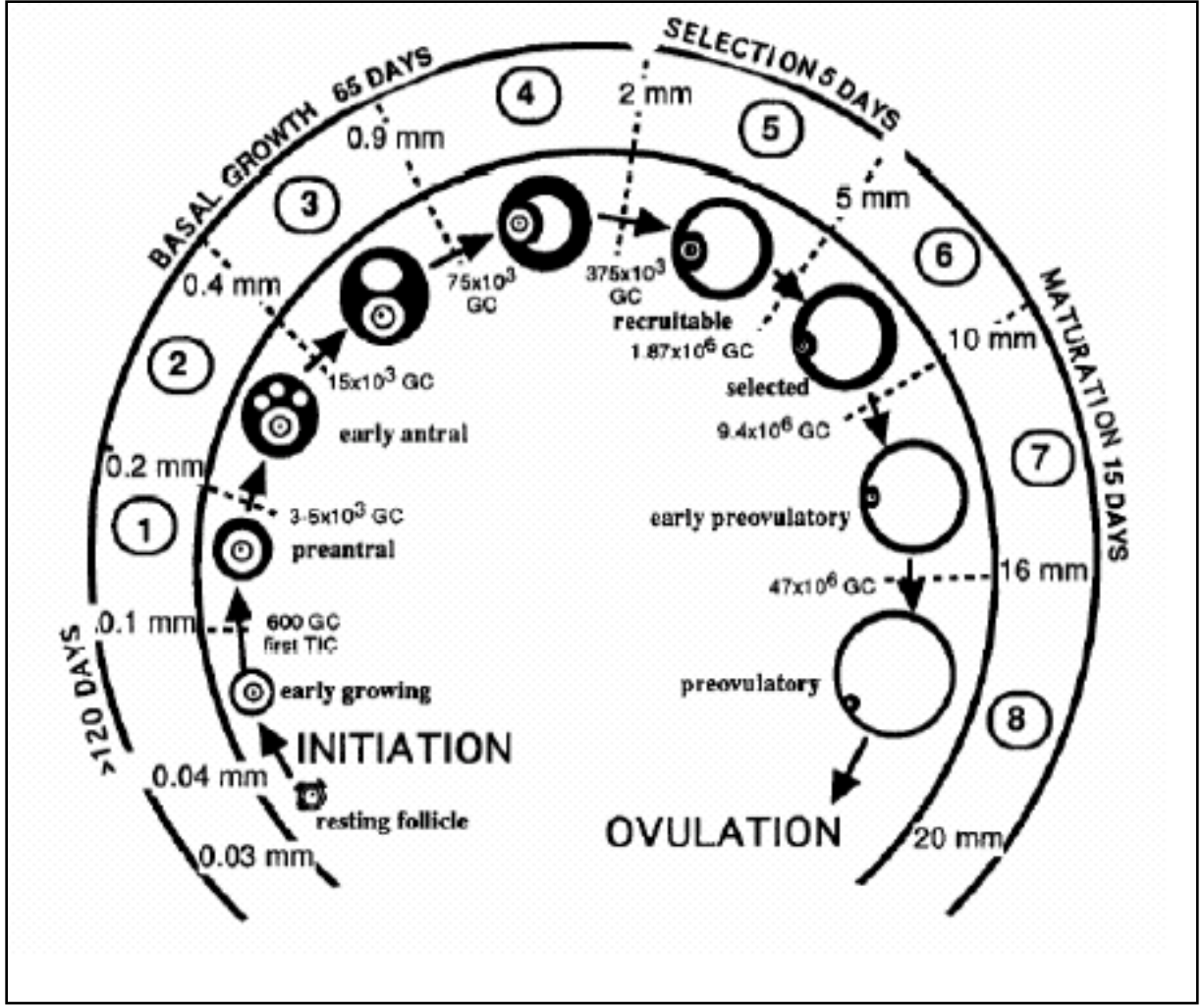
2.6.1. Follikülogenez

Overlerde folliküler gelişim primordial follikülden, primer follikül, sekonder follikül, pre-antral ve antral follikül gelişimine kadar devam eden histolojik ve morfolojik değişimleri içermektedir. Bu süreç genel anlamda iki temel fazdan oluşmaktadır;

- a) Tonik büyüme fazı: genel anlamda gonadotropinden bağımsız faz
- b) Exponential büyüme fazı: gonadotropin bağımlı faz.

Bu ikinci aşama recruitment (atrezi sürecinden kurtulmayı başarıp ovulasyona gidecek potansiyel hücrelerin bir araya toplanması) ve seleksiyon-dominans (dominant folliküle gidecek hücrenin seçimi ve gelişimi) basamaklarını içerir.

Follikülogenezin tümü değerlendirildiğinde bu basamaklar yaklaşık 85 günlük bir sürecin yani düzenli sıklularda üç menstrüasyonun geçmesini gerektirmektedir (52).



Şekil .1: Overdeki follüküllerin gelişimi (Gougeon, 1996)

Primordial follükül (30-60 mm çaplı): Oositin 1.mayoz bölünmesinin geç diploten evresinde arresti ve etrafında tek tabaka düzleşmiş granüloza hücresinden oluşmuş formuna verilen isimdir. Gelişimin bu safhasında follüküller gonadotropinlerden bağımsızdır. Primer follükül (>60 mm) etrafını çevreleyen bir sıra küboidal granüloza hücresi ile karakterizedir. Antral follükül ise tam oluşmuş zona pellisuda etrafında gelişmiş birçok kat granüloza hücresi ve follüküler sıvı içeren antrum boşluğu mevcut yapıdır. Antrum ve sıvısı ovulasyon sırasında kumulus-oosit salınımını desteklerken besin maddelerinin değişimi ve zararlı maddelerin avasküler kompartmana atılmasına aracılık eder. Ovulasyondan 5-6 gün önce follükül hızlı bir büyüme sürecine girer, granüloza hücre proliferasyonu ve antral sıvı birikimi ile over yüzeyine doğru hareket eder. Follükül büyüme evresini tamamladıktan sonra Graaf follükülü olarak adlandırılır ve ovulasyona hazırdır (53).

2.7. OOSİT MATURASYONU

Oosit hücresi, kadın vücudunda mayoz bölünmeye uğrayarak kromozom sayısının diploidden haploide döndüğü tek hücredir. Oosit maturasyonu, nükleer maturasyon ve sitoplazmik maturasyon olarak adlandırılan birbiri ile ilişkili iki süreçten oluşmaktadır ve en basit tanımlama ile 1.mayoz bölünmenin profazında arreste uğrayan oositin metafaz 2 evresine ilerlemesidir.

2.7.1. Nükleer Maturasyon

Nükleer maturasyon temelde oositin mayoz 1 diploten evrede arreste uğramış bölünmesini 2.mayoz bölünmenin metafazına kadar ilerletmesi ve fertilizasyona hazır hale gelmesi olarak tanımlanır. Oositler tam bir maturasyon için siklus ortası LH pikine ihtiyaç duyarlar. LH reseptörlerinin uyarılması cAMP üretimine yol açar (53).

Oosit mikroskop altında birinci polar cisim içeren metafaz 2 (MII); birinci polar cisim ya da germinal vezikül içermeyen metafaz 1 (MI); germinal vezikül içeren profaz 1 (PI) olarak gruplandırılır. MII oositlerin fertilizasyon oranları belirgin olarak fazladır (54).



Şekil.2.Matür oosit ve polar cisim

Ovulasyonda atılan oosit matür oosit ya da MII oosit olarak isimlendirilir. Ovulasyondan önce oosit intakt bir germinal vezikül içerir. Oosit 6 basamakta nükleer maturasyonunu tamamlar.

- a) Mayozun yeniden başlaması ve germinal vezikül yıkımı (GVBD)
- b) Kromatin kondensasyonu
- c) Mayotik spindle halkasının oluşumu
- d) Homolog kromozomların ayrılması
- e) Orantısız sitoplazmik bölünme 1.kutup cisimciğinin oluşumu
- f) Mayozun tekrar durması

2.mayoz bölünme fertilizasyon sırasında spermin oosite girmesi ile tamamlanır (55).

2.7.2. Sitoplazma Maturasyonu

Sitoplazmik maturasyon oosit gelişiminde en az nükleer maturasyon kadar önemlidir. Protein- mRNA sentez ve modifikasyonu, başarılı bir fertilizasyon ve embriyo gelişimi için gerekli biyokimyasal olayların gerçekleşmesi, enerji ve besin maddelerinin üretilmesi ve taşınması gibi süreçleri içerir.

Sitoplazmik ve nükleer maturasyon, nükleer içeriğin germinal vezikülün yıkılması sonucu sitoplazmaya salınması ile birbiri ile koordineli hale gelir. Ancak sitoplazmik maturasyon bazı durumlarda nükleer olaylardan bağımsızdır. Bu durum oositin nükleer olarak matür (MII) olduğu halde fertilizasyon ve embriyo gelişimi için yetersiz olabilmesini açıklar (56).

2.8. EMBRİYONEL GELİŞİM

2.8.1. Erken Embriyonel Gelişim

İnseminasyondan 17-20 saat sonra pronükleus kontrolü yapılıdır. Normal şartlar altında döllenmiş oositlerin 2 pronükleusu, iki kutup cisimciği, intakt zona pellicuda ile düzenli bir şekli ve belirgin sağlıklı bir sitoplazmasının olması gerekir. İnseminasyondan 20-34 saat sonra pronükleuslar birleşir yani 'singami' oluşur. Bunu takiben 35,6. saatte sitoplazma ikiye bölünür ve 2 diploid blastomer (zigot) oluşur.



Şekil.3.Fertilize olmuş oosit.

İnseminasyondan 40-46 saat sonra embriyolar 4 hücreli, 66-72 saat sonra yani 3.günde 8 hücreli safhaya gelir. Embriyo ilk 48 saat maternal mRNA etkisiyle protein sentez ederken, 48.saatten sonra embriyonik genom (maternal+paternal) aktivasyonu ile gelişmeye devam eder.

Erken bölünme inseminasyondan 25-27 saat sonra bölünme meydana gelmesidir. Erken bölünen embriyoların erken bölünmeye uğramayanlara kıyasla implantasyon oranlarının daha yüksek olduğu iddia edilmiştir (57).

2.8.2. Morula Ve Blastokist Gelişimi

Embriyo transferi, oositlerin toplanmasından 2,3 veya 5 gün sonra gerçekleştirilir. 3.günde blastomerin sitoplazmasında granüler yapılanma ve küçük çukurlaşmalar görülür. Ardından 4.günde embriyo kompaktlaşmaya başlar ve “MORULA” olarak adlandırılır. Bu aşamada blastomerler arasında iletişimi ve bariyer oluşumunu sağlayan sıkı ve gevşek bağlar oluşmuştur.



Şekil.4. Üçüncü günde 7 hücreli embriyo

Morula evresindeki hücreler arasında kavite oluştuğunda ise embriyo “BLASTOKİST” adını alır. Kavitasyon ilerledikçe blastomerler kutuplaşır ve trofektoderm (ekstraembriyonik dokuyu oluşturur) ve iç hücre kitlesini (embriyo ve fetüsün gelişimini devam ettirecek) oluşturur. Blastokist oluşumu in-vitro 5-7. günlerde gerçekleşir.

Zona pellusida blastomerlerin intraselüler bağları oluşmadan önce onları birarada tutan ve blastokist hacim olarak arttıkça incelen glikoprotein yapıda bir tabakadır. Zona pellusidanın delinmesi ile blastokistin fitikleşmesine ve dışarı çıkmasına “hatch olmuş blastokist” denir (58).

2.8.3. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi:

Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinin temel amacı gebelik oranlarını öngörmeye, anne yaşı ve transfer edilen embriyo sayısına göre daha iyi bir belirteç bulmaktır. Böyle bir belirtecin tanımlanması yüksek oranda başarı, tek embriyo transfer edebilmek böylece çoğul gebelik riskini azaltmaktır (59,60).

İlk tanımlamalar 1986 yılında hücre sayısı, blastomer büyüklüğü ve fragmantasyon oranını içeren 2.gün embriyo gelişimi değerlendiren skor sistemi ile başlamıştır (61). Devam eden çalışmalar 3.gün embriyo değerlendirmesinin 2.gün değerlendirmeye göre gebelik

başarısı, implantasyon oranı ve canlı doğum oranlarını belirlemede daha etkili olduğunu göstermiştir (62).

1988 yılında Veeck'in (54) yaptığı embriyo kalitesi sınıflandırma sistemi halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna göre;

Grade 1: Eşit büyüklükte blastomerler ve sitoplazmik fragmantasyon yok

Grade 2: Eşit büyüklükte blastomerler ve sitoplazmik fragmantasyon minimal

Grade 3: Farklı büyüklükte blastomerler ve sitoplazmik fragmantasyon yok

Grade 4: Farklı büyüklükte blastomerler ve major sitoplazmik fragmantasyon

Grade 5: Az ya da tanımlanamayan blastomerler ve major sitoplazmik fragmantasyon

Desai ve ark. (63) 2000 yılında embriyo kalitesini belirlemek için 3.gün embriyo değerlendirmesinde kullandıkları parametreleri hücre sayısı, fragmantasyon paterni, blastomer büyüklüğü, eşitliği ve ekspansiyonu, sitoplazmik pitting, sitoplazmanın vakuol içermemesi olarak tanımlamışlardır. Yüksek kaliteli embriyoların ekspansiyonu, zonaya değen ve az bir perivitellin boşluk içeren blastomerlerden oluştuğunu göstermişlerdir. Bu parametreler içinden en anlamlısının hücre sayısı olduğunu tespit etmişlerdir.

Terriou ve ark. (59) 2001'de 10.000 embriyo ile tanımladıkları kümülatif embriyo skoru; klivaj embriyo (1 puan), fragmantasyon (yok 1 puan), bölünme durumu (4 hücre 1 puan), irregüler hücre varlığı (yok 1 puan) alt başlıklarına göre hesaplanmaktadır. Multivariable analizde kümülatif embriyo skoru gebelik oranları üzerinde en etkili parametre olarak tespit edilmiştir.

2003 yılında Fisch ve ark. (64) dereceli embriyo skoru tanımlamış bu da inseminasyondan 16-18 saat sonra pronükleer morfoloji, 25-27 saat sonra erken klivaj ve 64-67 saat sonra 3.gün embriyo morfolojisi değerlendirilmesini içermektedir. Yalnızca 3.gün değerlendirmesine göre gebelik sonuçlarını tespitinde daha anlamlı bulunmuştur.

2008 yılında Loi ve ark. (65) ICSI sikluslarında 5 parametre içeren kümülatif embriyo skoru tanımlamışlar. Bölünen hücre sayısı (44.saatte 4, 68.saatte 6-8 hücre), fragmantasyon varlığı, hücre şekil ve boyutu, sitoplazma durumunu değerlendirmişlerdir. Kümülatif embriyo skoru arttıkça implantasyon oranı, gebelik oranı ve canlı doğum oranlarının arttığını göstermişlerdir.

Embriyo kalitesine ilave olarak pro-nükleer skorlamanın kullanılması (nükleolus büyüklüğü, sayısı, skorlaması) bazı araştırmacılar tarafından faydalı bulunmuştur (66,67).

Bir başka çalışmada inseminasyondan 16-18 saat sonra zigot morfolojisi incelenmiş, 3.gün embriyo morfolojisi kadar değerli olmadığını gösterilmiştir (68).

2.9. ANJİYOGENEZİS

Anjiyogenezis, endotelial hücre çoğalması ile mevcut damarlardan gelişen yeni kan damarlarının oluşumudur. Anjiyogenezis, bir seri büyüme faktörünün uyarım ve engellemeleri içeren birbirleri ile olan iletişimi neticesinde oluşmaktadır. Kadın üreme sisteminde korpus luteum ve endometriumda anjiyogenetik değişiklikler her menstrual siklusta görülmektedir (69).

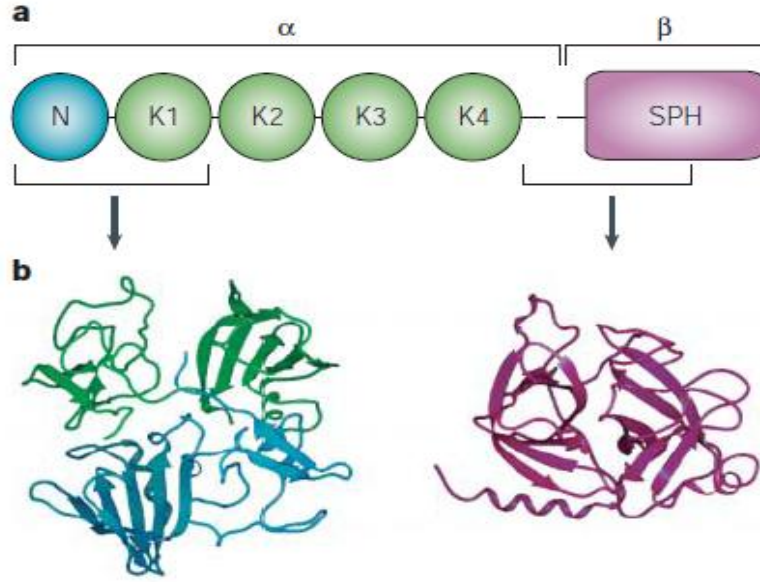
Foliküler anjiyogenezis, follikül antral folliküle doğru matüre olurken başlar. Bu sırada tekal hücre tabakasında ve kan damarlarının sayısı ve boyutunda artış olur. Ancak bu damar yapısı granüloza hücre tabakasına penetre olmaz, bazal membran tabakası intaktır (70). Ovulasyon sırasında bazal membran bağlantılarını kaybederken tekal kan damarları granüloza hücre tabakasına ilerler (71). Anjiyogenezisin doğal inhibitörleri endostatin ve anjiyostatindir. Yapılan hayvan deneylerinde tekal kapiller endotelial hücre proliferasyonunda azalma ile kendini gösteren tekal vaskülaritede azalma atreziye giden follikülde ilk meydana gelen durumlardan biri olduğu bulunmuştur (72,73).

Korpus luteum, mid-luteal fazda vücuttaki tüm dokular içerisinde en fazla kan akımına sahip yapıdır. Sıçan overlerinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) pre-ovulatuvar foliküllerden ve korpus luteumda hormon üreten hücrelerden eksprese edilir. Anjiopoetin-2 (Ang-2) ise preovulatuvar foliküllerde teka hücrelerinde bulunur ve anjiyogeneziste VEGF ile birlikte çalışır (74). Vasküler endotelial büyüme faktörü mRNA düzeylerinin korpus luteumun erken gelişim döneminde en yüksek düzeyde tesbit edilmesi, VEGF in luteal vasküler gelişimde ana rol oynadığını göstermektedir (75).

2.10. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF)

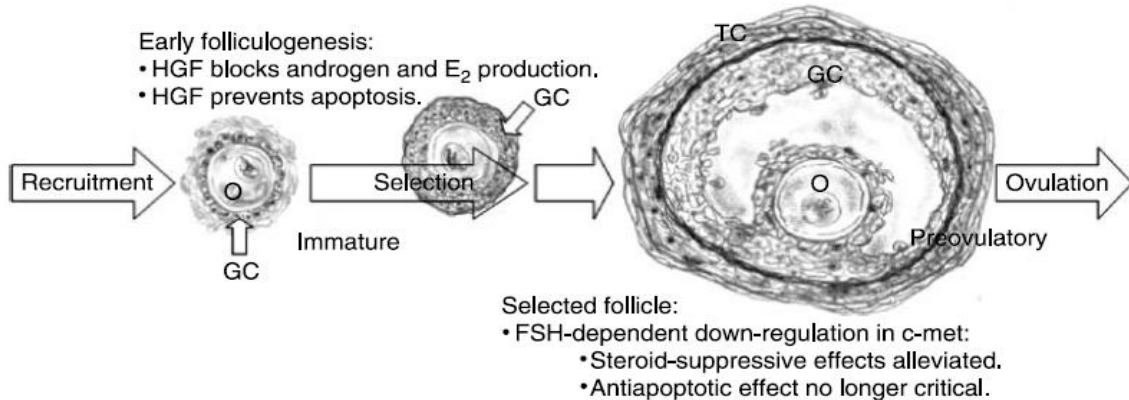
Hepatosit büyüme faktörü, mezenseşimal hücrelerden sentez edilen ve etkisini epitel hücrelerinde bulunan spesifik reseptörü c-MET üzerinden gösteren bir büyüme faktörüdür (76). Hepatosit büyüme faktörü 55-65 kDa ağırlığında alfa subünitesi ve 32-36 kDa ağırlığında beta subünitesi arasında disülfid bağı ile oluşmuş 87 kDa ağırlığında heterodimer bir proteindir (77). Overde mezenseşimal kökenli teka hücrelerinde üretilir ve follikülogenezde

epitelyal kökenli granüloza hücrelerinin çoğalmasını uyarır (78). Hepatosit büyüme faktörü lüteinize olmamış granüloza hücrelerinde mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolu üzerinden progesteron sentezini inhibe eder. Böylelikle folliküler fazda LH piki öncesi erken progesteron yükselmesini (prematür lüteinizasyonu) önler (79).



Şekil.5. Hepatosit Büyüme Faktörü (Birchmeier ve ark, 2003)

Erken androjen üretiminin ovarian folliküllerde apoptoze yol açması nedeniyle teka intersitisyel hücrelerinde androjen üretimi çok hassas bir şekilde düzenlenmektedir. Hepatosit büyüme faktörü teka hücrelerinde LH bağımlı androjen sentezini geri dönüşümlü olarak baskılamak, LH bağımlı progesteron sentezini uyarılmaktadır. Granüloza hücrelerinden artan E2 salınımı intrafolliküler HGF üretimini baskılar böylece androjenler üzerindeki HGF etkisi bloke edilmiş olur (18).



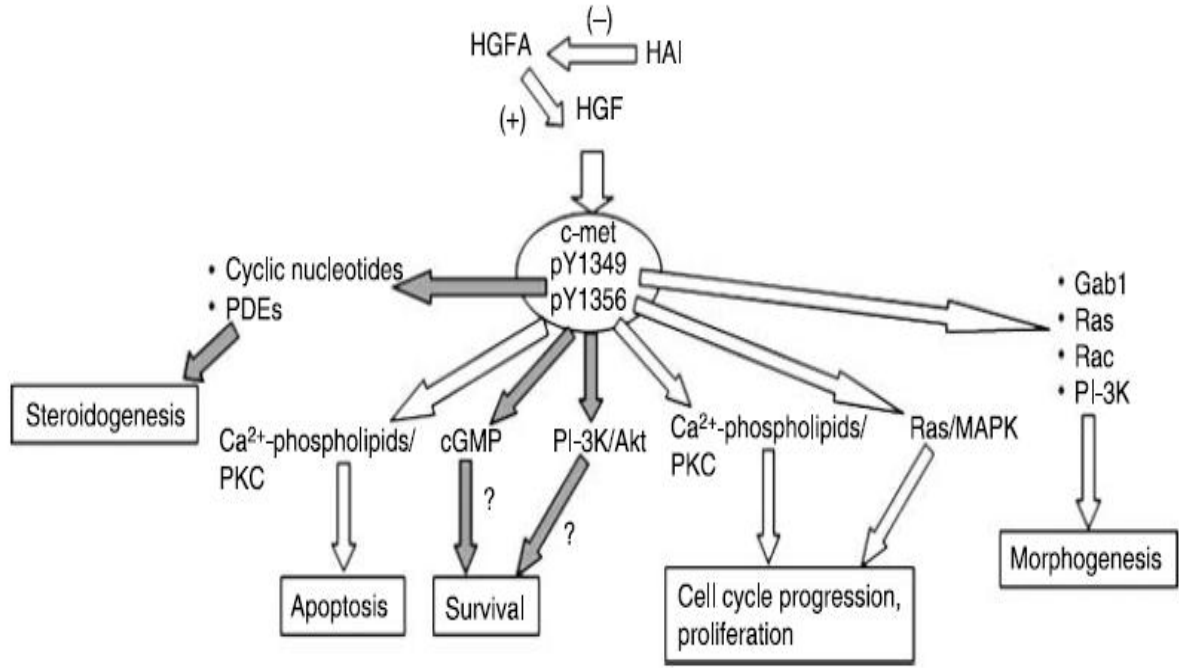
Şekil.6. HGF'nin Follikülogenezdeki Etkisi (Zachow ve ark, 2007)

Overde üretilen sitokinler ve büyüme faktörleri, granüloza hücre büyümesini ve steroid sentezini düzenleyerek E2 üretimini kontrol etmektedir (80). Yapılan çalışmalar sonucu HGF'nin follikülogenezin tüm ana basamaklarını; teka ve granüloza hücrelerindeki steroid sentezini; teka ve granüloza hücre büyüme ve farklılaşmasını ve granüloza hücre apoptozisini kontrol ettiği gösterilmiştir. Hepatosit büyüme faktörü E2 üretimi üzerindeki baskılayıcı etkisini immatür oositlerde gösterirken, büyük antral foliküllerde böyle bir etki göstermemektedir. Hepatosit büyüme faktörünün FSH bağımlı E2 üretimi üzerindeki baskılayıcı etkisinin granüloza hücrelerinin maturasyonuna bağımlı olduğu düşünülmektedir (81, Şekil.6).

İn vivo E2 ve LH gibi hormonların folliküler gelişimi uyardığı bilinmektedir. Ancak in vitro çalışmalarda bu hormonların proliferatif etkisi gösterilememiştir (78). Bu sonuç LH ve diğer hormonların follikül gelişimini büyüme faktörleri üzerinden dolaylı olarak uyardığı hipotezini doğrulamıştır. Buna yönelik çalışmalarda, sığır teka hücrelerinde hCG'nin HGF mRNA'yı uyarırken E2'nin HGF'ye etki etmediği gösterilmiştir. Bu çalışma gonadotropinlerin HGF regülasyonunu sağladığını gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışmayla LH gibi hormonların follikül gelişimini HGF gibi büyüme faktörlerini arttırarak dolaylı olarak sağladığını göstermiştir (19).

Uzumcu ve ark. (82) LH'nin sıçan teka hücrelerinde HGF reseptörü olan c-MET miktarını arttırdığını, granüloza hücrelerinde ise c-MET miktarını azalttığını göstermişlerdir. Böylelikle LH teka hücrelerinden HGF sentezini arttırmaktadır. Gonadotropinlerin c-MET düzeylerini değiştirerek preovuluar granüloza hücreleri üzerindeki HGF etkisini düzenlediği öne sürülmüştür. Bu çalışmada HGF sisteminin folliküler seçim ve apoptozis arasındaki dengenin kontrolünde yeni bir bakış açısı sağladığını iddia etmişlerdir.

Hepatosit büyüme faktörünün progesteron sentezi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda ilk kez Zachov ve ark (18) tarafından sıçan teka intersitisyel hücre kültürlerinde HGF'nin progesteron sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Daha sonra insan over folliküllerinde yapılan bir çalışmada folliküler sıvı HGF düzeyleri ile progesteron düzeylerinin doğru orantılı olduğu izlenmiştir (20). Ito ve ark (21) ise HGF'nin insan granüloza hücrelerinden progesteron sentezini arttırdığını ve hCG'nin progesteron sentezini arttırıcı etkisini değiştirmediğini bulmuşlardır. Bunun sonucunda HGF ve hCG'nin progesteron sentezini aynı yolak üzerinden arttırabileceğini öne sürmüşlerdir.



Şekil.7. HGF bağımlı sinyal iletim şeması (81)

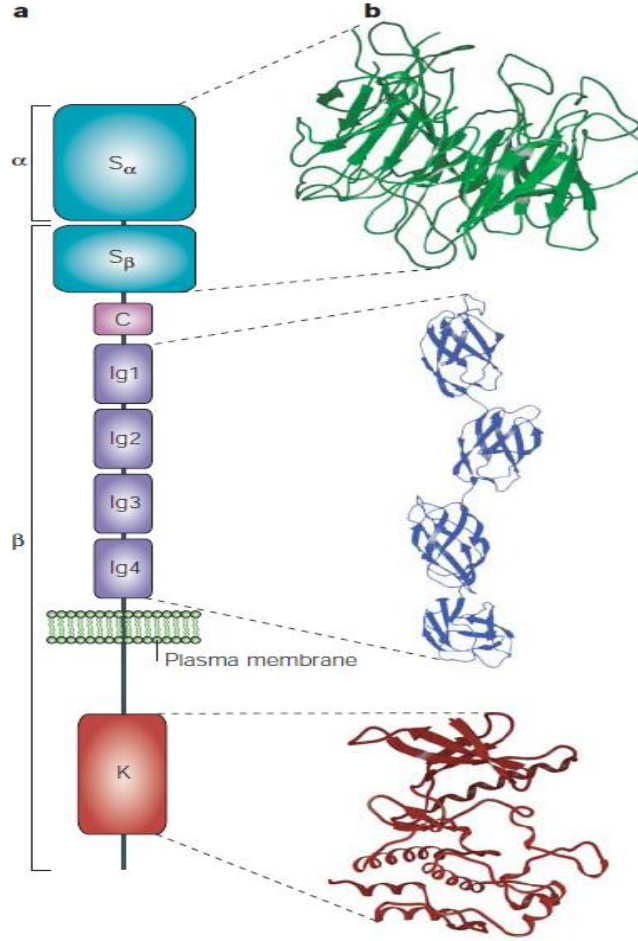
Yapılan çalışmalar sonucu HGF'nin sıçan overinde steroid sentezini 2 kritik noktada baskıladığı gösterilmiştir. Hepatosit büyüme faktörü; a) teka hücrelerinde androjen sentezini baskılar (18), b) granüloza hücrelerinde androjenlerin (androstenodion) E2'ye dönüşümünü engeller (83). Böylelikle E2'nin erken dönemde yükselmesini önleyerek follikülleri atreziden koruduğu iddia edilmiştir.

Follikül sıvısında HGF düzeyleri ile oosit maturasyonu arasındaki ilişkinin araştırıldığı ilk çalışma 2003 yılında Kawano ve ark (22) tarafından yapılmıştır. Buna göre, follikül sıvısı HGF düzeylerinin matür oositlerde belirgin artmış olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada follikül sıvısı VEGF düzeylerinin matür oositlerde belirgin düşük olduğu bulunmuştur

2.11. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRÜ: c-MET

Hepatosit büyüme faktörü reseptörü c-MET tirozin kinaz ailesindedir ve bu reseptör teka, granüloza ve ovarian stroma hücrelerinde tesbit edilmiştir (21). Hepatosit büyüme faktörünün c-MET reseptörü üzerinden kendi proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir (84). Hepatosit büyüme faktörü ve c-MET reseptörü folliküler gelişim sırasında küçük, orta ve büyük boy folliküllerden eksprese edilmektedir. Teka hücrelerindeki HGF mRNA düzeyleri ve granüloza hücrelerindeki c-MET düzeylerinin büyük boy folliküllerde, küçük ve orta boy

folliküllere göre daha yüksek olduğu izlenmiştir. Bu sonuçlar HGF'nin ve c-MET reseptör ekspresyonunun folliküler gelişim basamaklarına bağlı olarak düzenlendiğini göstermektedir (19).



Şekil.8.Hepatosit Büyüme Faktör Reseptörü. c-MET (tirozin kinaz ailesinden)

a)MET reseptörünün ana şekli b)Üç boyutlu modeli (Birchmeier ve ark. MCB, 2003)

2.12. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ ve ANJİYOGENEZİS:

Hepatosit büyüme faktörünün anjiyogenetik özelliği ile ilgili yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. Hepatosit büyüme faktörünün insan mikrovasküler endotel hücrelerinde büyümeyi uyardığı ve kemotaktik aktiveye sahip olduğu ilk kez 1991 yılında Morimoto ve ark tarafından gösterilmiştir (85). Daha sonra tavşan korneasına HGF uygulaması ile yeni kapiller oluşumu in vivo değerlendirilmiş, HGF'nin basit fibroblast büyüme faktörü'ne (bFGF) eşit anjiyogenetik etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma HGF'nin endotelial hücre proliferasyon ve migrasyonunu arttırarak etki eden güçlü bir anjiyogenetik faktör olduğunu göstermiştir (86). Hepatosit büyüme faktör ve reseptörü sinyal yolağının aktive olması anjiyonezisi

doğrudan ve VEGF üzerinden dolaylı olarak uyarır (87). Domuzlarda yapılan bir çalışmada equine koryonik gonadotropin (eCG) uygulaması sonrası her boyuttaki follikülde kapiller yoğunlukta belirgin artış izlenmiş, HGF mRNA düzeyi farklı follikül boyutlarında değişmezken sadece küçük folliküllerde eCG sonrası belirgin artış gösterilmiştir. Bu çalışmada anjiyopoetinin VEGF ile kordineli işlev gördüğü de gösterilmiştir (88,16).

2.13. POLİKİSTİK OVER SENDROMU

2.13.1. Tanım

Polikistik over sendromu (PCOS) androjen fazlalığı ve ovulatuvar fonksiyon bozukluğunu içeren, reproduktif dönem kadınlarda %5-10 sıklıkla görülen endokrin bir hastalıktır. LH aşırı üretimi, ovaryan hiperandrojenizm, polikistik görünümlü overler, insülin direncinde artış ve fekunditede azalma ile karakterizedir (23).

Polikistik over sendromu ilk kez 1935'te Stein ve Leventhal tarafından amenore, obezite ve hirsutizm triadı olarak tanımlanmıştır. Günümüzdeki mevcut tanı kriterlerine göre bu tanım ancak hastaların bir kısmını kapsar. 1990 yılında National Institutes of Child Health and Human Development (NICHD) tarafından bu sendromun tanı kriterleri tanımlanmış (89);

- a) Hiperandrojenemi ve/veya klinik hiperandrojenizm
- b) Oligo-ovulasyon
- c) İlgili diğer tanıların dışlanması (Cushing sendromu, hiperprolaktinemi, non-klasik adrenal hiperplazi)

2003 yılında ESHRE/ASRM Rotterdam konsensus toplantısında alınan kararla (90);

- a) Anovulasyon
- b) Hiperandrojenizm (klinik ya da laboratuvar)
- c) USG'de polikistik over morfolojisi (2-8 mm çaplı 10'un üzerinde palizadik dizilimli follikül)

kriterlerinden herhangi ikisine sahip kişi polikistik over sendromlu kabul edilmiştir.

Daha sonra 2006 yılında Androjen Excess Society PCOS için güncel bir tanımlama yapmış, klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm ile ovarian işlev bozukluğunun bir arada bulunması şeklinde tanımlamışlardır (91).

PCOS üreme, metabolik ve kardiyovasküler sistem üzerinde uzun dönem etkileri belirgin olan bir hastalıktır (92). PCOS anovulasyon nedenli infertilitelerin %75 sebebidir.

İnfertilite tedavisinde kilo kaybı, klomifen sitrat, aromataz inhibitörleri, gonadotropinler, GnRH agonist ve antagonistleri belli başlı seçeneklerdir (93).

2.13.2. PCOS ve Androjen Yüksekliği

Polikistik over sendromu tanısında serum LH, FSH ve andrositenodion düzeyleri değerlendirilmektedir. Pek çok PCOS'lu hastada artmış LH/FSH oranı ve yüksek andrositenodion düzeyleri tesbit edilmektedir (94). Hiperandrojenizm oluşumu ile ilgili çeşitli mekanizmalar vardır. LH/hCG artışına aşırı yanıt, granüloza hücrelerinde FSH uyarımlı androjen üretiminde artış, hiperinsülinemi sonucu karaciğerden seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) sentezinin azalması sonucu serbest testosteronda artış, insülinin ACTH'yı uyarak adrenal androjen üretimini arttırması belli başlı mekanizmalardır (95, 96, 97). Ovulatuar ve anovulatuar PCOS gruplarının serum hormon düzeylerini karşılaştıran bir çalışmada androjen ve LH yüksekliği her iki grupta da görülürken, hiperinsülinemi ve insülin direnci sadece anovulatuar grupta gösterilmiştir (98).

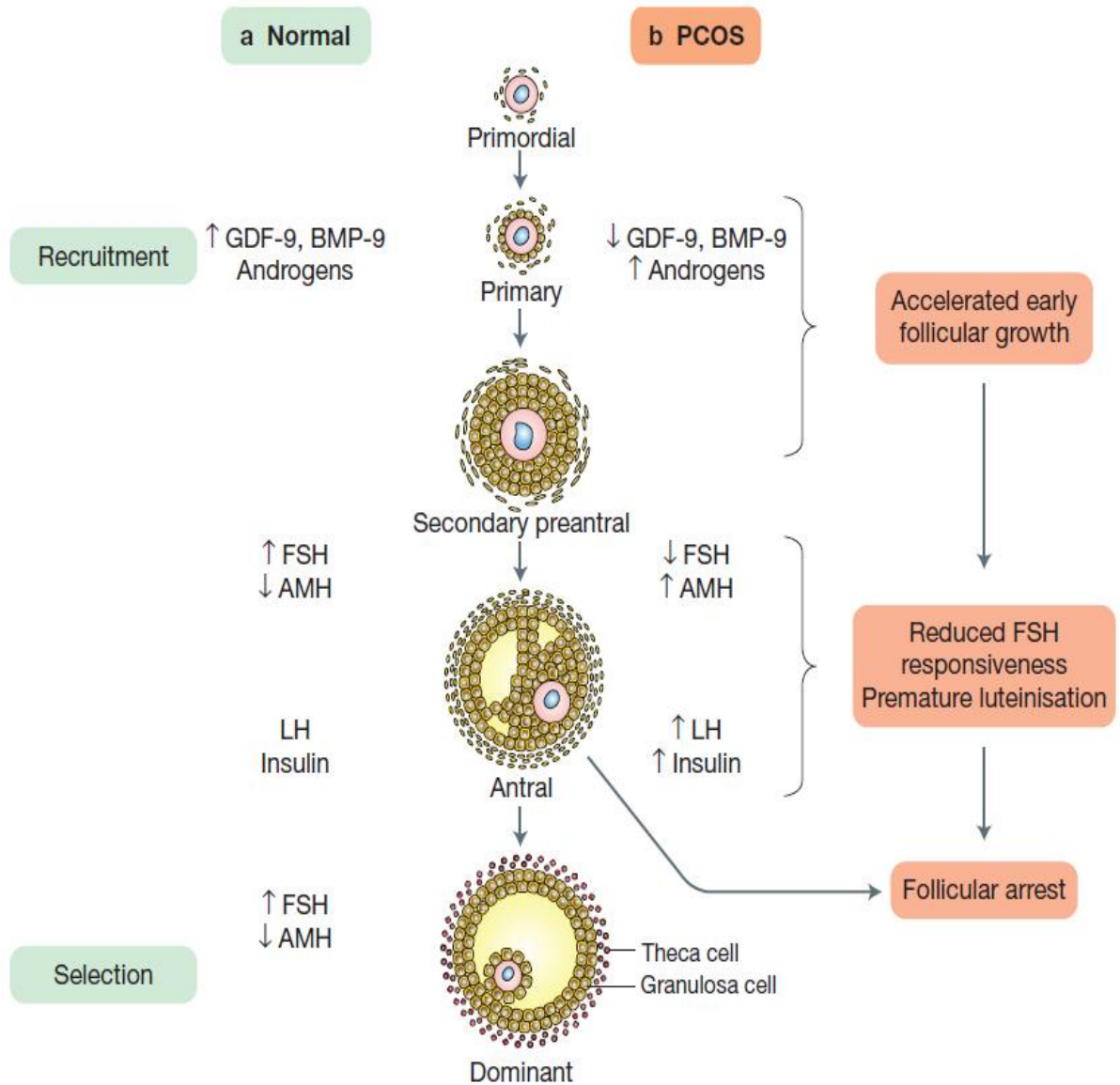
2.13.3. PCOS ve Follikül Gelişimi

Normal follikülogenezde FSH bağımsız dönemde büyüyecek folliküllerin seçiminde bazı büyüme faktörleri etki gösterir. Daha sonra FSH bağımlı dönemde geç folliküler fazın ortalarında büyüyen bu folliküllere LH etkisi başlar. Antimüllerian hormon (AMH) ve FSH arasındaki hassas denge aromataz aktivitesi için kritiktir ve dominant follikül seçimini sağlar (99). Folliküller gelişimlerinin erken döneminde androjen reseptörü kazanırlar. Böylelikle FSH bağımsız fazda androjenler, PCOS'lu hastalarda erken dönemde çok sayıda follikülün büyümesine katkı sağlarlar (100). Daha ileri follikülogenez aşamalarında ise androjenler, LH ve insülin ile sinerjistik etki göstererek granüloza hücre çoğalmasını ve gonadotropinlerin uyardığı östrojen ve progesteron sentezini engellerler. Böylelikle folliküler maturasyonu bozarlar (92, Şekil.9).

Polikistik over sendromlu hastalarda artmış androjen düzeyleri 2-5 mm çaptaki follikül sayısı ile doğru orantılı bulunmuştur. İnsülin rezistansı sonucu oluşan hiperinsülinemi androjen düzeylerinin artışına katkıda bulunur. Böylelikle PCOS'lu hastalarda küçük antral folliküllerde artmış LH reseptör ekspresyonu ve artmış progesteron sentezi erken granüloza hücre lüteinizasyonuna yol açarak hücre çoğalmasını ve follikül büyümesini engellemektedir (24). Polikistik over sendromunda FSH ve LH'ya artmış anormal bir yanıt vardır. Böylelikle

folliküller erken dönemde matüre olmakta, fazla miktarda östrojen salgılanmakta ve artmış E2 FSH'yi baskılayarak sağlıklı folliküllerin gelişimine engel olmaktadır (101).

Serum andrositenodion düzeyleri bazal antral follikül sayısını ve IVF'de toplanan oosit sayısını öngörmeye kullanılmıştır (102). Klinik hiperandrojenizmin IVF tedavisi altındaki PCOS hastalarında gebelik oranlarını azalttığı gösterilmiştir. Klomifen sitrata dirençli PCOS'lu hastalarda IVF başarısının en iyi belirtecinin androjenlerin normal düzeyde olması olduğu iddia edilmiştir (103).



Şekil.9. Normal Follikülogenez ve PCOS'da Follikülogenez (Nisenblat ve ark. 2009)

Büyüyen follüküllerde artmış ovarian kan akımı anjiyogenezis ve artmış metabolizmanın göstergesidir. PCOS'lu ve normal ovarian yapıya sahip hastalara yapılan ovarian ve uterin arter doppler incelemede PCOS'lu hastaların overlerinde erken follüküler fazda artmış hacim, belirgin artmış kan akımı, artmış damar oluşumu izlenmiştir. Uterin arter doppler ölçümleri arasında fark saptanmamıştır. Aynı çalışmada pre-ovulatuvar follüküllerin ve korpus luteumun da doppler akımları ölçülmüş ve PCOS'lu overlerde belirgin artmış kan akımı ve anjiyogenez gösterilmiştir. Artmış ovarian pik-sistolik velosite ile artmış LH düzeyleri uyumlu bulunmuştur (104).

PCOS'lu hastalarla normal overli hastalar kıyaslandığında PCOS'lu hastalarda artmış serum VEGF düzeyleri ile buna uyumlu artmış ovarian stromal kan akımı bulunmuştur. Böylelikle PCOS'lu hastalarda artmış serum VEGF düzeyleri, VEGF'ün anjiyogenetik özelliğini tanımlamaktadır (105). Yapılan bir çalışmada, PCOS'lu IVF hastalarında artmış serum ve follüküler sıvı VEGF düzeyleri tesbit edilmiştir. Ayrıca hCG uygulaması sonrası VEGF düzeyleri belirgin yükselmiştir ve bu değerler östrojen düzeyleri ile uyumludur (105,106).

2.13.4. PCOS ile İlişkili İnfertilite Tedavisi

Polikistik over sendromlu hastaların IVF stimülasyon protokollerinde temelde iki amaç bulunmaktadır: a) Yüksek LH ve androjen düzeylerinin baskılanması b) Ovaryan hiperstimülasyonun önlenmesi. Tüm dünyada ART kliniklerinde hipofiz bezini baskılamak için en çok GnRH analogları tercih edilmektedir. Polikistik over sendromlu hastalarda GnRH analoglarıyla endojen yüksek LH düzeylerinin baskılanması ile yüksek LH'nin oosit gelişimi üzerine olan zararlı etkililerinden korunulur. Bu sonucu GnRH analog tedavisi alan PCOS'lu hastalarda oosit fertilizasyon oranlarının GnRH analog ilave edilmeyen hastalardan daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar desteklemektedir. Gonadotropin seçimi ile ilgili çalışmalar göstermiştir ki uzun GnRH analog protokolünde üriner FSH ya da hMG kullanımının birbirine üstünlüğü yoktur. Ancak gonadotropin dozlarının normal hastalarda başlanılan dozlardan %25-30 daha az olması ve stimülasyonun sekizinci gününden itibaren günlük TV-USG ile follükül gelişiminin ve serum E2 düzeylerinin yakın takibi önerilmektedir (107).

Hipofiz bezinin baskılanması amacıyla kullanılacak bir diğer ilaç GnRH antagonistleridir. Antagonist ilaçlar da yüksek LH seviyelerini hızlı bir şekilde baskılar ancak yüksek LH seviyeleri antagonistin uygulanmaya başlandığı siklus gününe kadar (en büyük

follikül 14 mm oluncaya kadar) devam etmektedir. Böylelikle erken follikül gelişim sırasında yüksek LH maruziyeti olur ve bu düşük gebelik sonuçlarına yol açabilir. Teorik olarak bir oral kontraseptif ile beraber önceden tedavi vermek uyarım başlamadan önce LH ve androjen seviyelerini baskılayacak erken dönemde yüksek LH seviyeleri engellenebilecektir. Antagonist ilaçlar kullanıldığında folliküler kohort daha küçük olduğundan dolayı OHSS riski daha azdır. Bununla beraber antagonist sikluslarda hCG yerine GnRH analogunun kullanılabilmesinin OHSS riskini azaltabileceği iddia edilmektedir (45).

Selanik konsensus toplantısı sonuçlarına göre PCOS tek başına IVF için endikasyon değildir. PCOS'a ek olarak erkek faktör, tubal faktör, inseminasyonda başarısızlık gibi problemler varsa kişi IVF tedavisine yönlendirilir. Birçok tedavi protokolü alternatifi mevcuttur, ancak en standart protokol uzun protokol ve rFSH kullanımınıdır (108). IVF başarımlı değerlendiren bir metaanalizde PCOS'lu hastalarda siklus iptal oranları %12,8'dir. Stimulasyon süresi ortalama 1,2 gün daha uzundur. Toplanan oosit sayısı fazla ancak fertilizasyon ve gebelik oranları benzerdir (109).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu prospektif çalışma Ağustos 2009 ile Şubat 2010 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, IVF Merkezinde ICSI uygulanan hastalardan elde edilen serum ve follüküler sıvılarda gerçekleştirildi. Çalışmaya Üniversite Etik Kurulu onayı alındıktan sonra başlandı. Hastalar çalışmaya alınmadan önce yazılı ve sözlü onamları alındı. Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklendi.

Çalışmaya, kliniğimize IVF/ICSI için başvuran hastalardan Rotterdam kriterlerine göre PCOS tanısı alan 21 hasta ve normal over yapısına sahip (tubal faktör, erkek faktör ve açıklanamayan infertilite) 41 hasta alındı. Geniş hidrosalpinksisi, endometriosisi, pelvik enflamatuar hastalık nedeniyle yoğun pelvik yapışıklıkları bulunan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya 62 hasta ile başlandı ancak iki hastada fertilizasyon gerçekleşmediği ve bir hastanın eşinde testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) sırasında sperm bulunamadığı için 3 hasta çıkarıldıktan sonra kalan 59 hasta ile çalışma tamamlandı. Çalışmada hastaların serum örnekleri ve follüküler sıvıları kullanıldı.

3.1. Ovaryan Stimulasyon Protokolleri

Çalışmaya katılan 59 hastadan 37'sinde GnRH analogu (Lucrin; Abbott, Türkiye veya Suprefact; Sanofi Aventis, Türkiye) ile bir önceki siklusun luteal fazının ortasından başlayarak uzun protokol ile hipofizer down regülasyon yapıldı. Optimum down regülasyon sağladıktan sonra bireyselleştirilmiş dozlarda rekombinant FSH (Gonal-F; Serona, Türkiye veya Puregon; Organon, Türkiye) veya Human menopozal gonadotropin (Menogon; Erkim, Türkiye veya Menopur; Erkim, Türkiye) ile indüksiyon başlandı. Analog kullanılmayan hastalara (n=22) gonadotropin tedavisi başladıktan beş ile altı gün sonra GnRH antagonist (Orgalutron; Organon, Türkiye veya Cetrotide; Serona, Türkiye) tedavisi eklenerek ekzojen gonadotropin uyarısına devam edildi. Follüküler büyüme düzenli olarak ultrason ölçümleri ile takip edildi. En az iki follükül çapı 18 mm olunca 10.000 IU hCG (Pregnyl; Organon, Türkiye) uygulandı.

3.2. Oosit ve Folliküler Sıvı Toplama İşlemi

Oosit toplama işlemi hCG yapıldıktan ortalama 36 saat sonra gerçekleştirildi. Oosit toplama öncesi hastalardan idrarlarını yapmaları istendi. Hastalara intravenöz sedasyon için midazolam (dormicum ampul 5mg/5ml, Roche, Türkiye) 0,02mg/kg, fentanyl (fentanyl citrate ampul, Abbot, Türkiye) 1mcg/kg ve propofol (propofol flakon 500mg/ml, Abbot, Türkiye) 1mg/kg dozlarında kullanıldı. Oosit toplama işlemi öncesi vajen steril salin solüsyonuyla yıkandı. Steril bir kılıf içindeki transvajinal USG probu (7,5 MHZ Endovaginal Probe, Siemens, Japonya) ve beraberinde tutturulmuş aspirasyon iğnesi (Gynetics, Hamont-Archel, Belçika) overleri görmek ve follikülleri aspire etmek için kullanıldı. Çalışmaya dâhil edilen hastalardan alınan folliküler sıvılar, 16 G'lik iğneler ile 15–20 mm büyüklüğündeki ve proba en yakın folliküllere keskin olarak girildikten sonra, 125 mmHg vakum basıncında aspire edilerek elde edildi. Her bir follikül ayrı ayrı aspire edildi. Her aspirasyondan sonra bir sonraki follikül sıvısının kontaminasyonunu önlemek için set temizlendi ve yeni toplama tüpü kullanıldı. Her bir hastadan çalışma için 3 follikül aspire edildi. Her follikülden ortalama 2–7 ml sıvı alındı. Çalışma için yapılan follikül aspirasyon işleminden sonra standart yöntemlerle hastanın yumurta toplama işlemi tamamlandı. Yıkama sıvısı ve kan ile kontamine olmuş follikül sıvıları ve oositleri çalışmaya dâhil edilmedi. Aspire edilen her follikül sıvısı 26 ml'lik dibi yuvarlak yapıda polisteren tüplere (Sarstedt AG&Co, Almanya) ayrı ayrı kondu. Tek oosit elde edilen sıvı, içerisindeki oosit alındıktan sonra steril pipetle ayrı steril, ajirojen, polipropilen konik tabanlı 15 ml hacimli tüplere (BD Falcon, Biosciences, ABD) kondu. Ayrılan oositler dört kuyucuklu petri kabı içerisine ayrı ayrı takip edilmek üzere işaretlenerek yerleştirildi. Alınan follikül sıvı örneği, 2000 devir/dk hızda, 4°C'de, 10 dakika santrifüj edildikten sonra granüloza hücre pelleti 1 ml RNA later solüsyonu eklenerek -80°C'de saklandı. Süpernatant 2 ayrı steril polipropilen tüpe en az 1 ml sıvı içerecek şekilde her bir follikül için ayrı steril pipet kullanılarak eşit miktarlarda bölündü. Materyaller -80°C'de analiz gününe kadar saklandı.

Ayrıca hastalardan indüksiyon tedavisine başlanmadan önce menstruasyonun 2-3.gününde, hCG uygulanan günde ve OPU gününde 10 cc kan örneği alındı. Alınan kan 3000 devir/dk hızda, 4°C'de, 10 dakika santrifüj edildi. Her bir örnek ayrı steril polipropilen tüpe 2 ml sıvı içerecek şekilde kondu. Analiz gününe kadar -80°C'de saklandı.

3.3. Oositlerin Elde Edilmesi, Takibi, Morfolojik Değerlendirilmesi ve ICSI

Aspirasyon işlemi ile tüp içerisine alınan her bir follikül sıvısı, kültür kabınınin içerisindeki petri tabaklarına (BD Falcon. 353003; 100x20mm, Biosciences) döküldükten sonra stereo-mikroskop altında folikül sıvısındaki oositler bulundu. Yumurta toplama günü hazırlanan Falcon 353037 (60x15 mm) center well dish dışına 2 ml iç kısmına 1 ml HEPES ile desteklenmiş Quinn's Advantage medyum (SAGE Biopharma, Bedminster, NJ, ABD) konularak hazırlanan tabağın dışında yıkanıp bulunan oositler Pasteur pipet yardımı ile alındı. OPU'dan bir gün önce hazırlanan Quinn's Advantage Protein Plus Fertilization (HTF) Medyumlu tabağa (NUNC four well dish,176740, Thermo Fisher Scientific, ABD) tek tek numaralandırılarak aktarıldı ve bu tabakta 2 saat inkübe edilerek oosit denüstasyon zamanına kadar bekletildiler.

Folliküllerden çalışma için elde edilen oositler ICSI işlemi öncesi mekanik ve kimyasal olarak denüstasyon edildikten sonra invert mikroskopla (Olympus IX70, Olympus, Viyana, Avusturya) morfolojik olarak değerlendirildi. Nükleer maturasyonlarına göre oositler üç gruba ayrıldı. Grup 1: matür, metafaz II (MII) oositler; Grup 2: immatür, metafaz I (MI) veya germinal vezikül (GV) olan oositler; Grup 3: dejenere olan oositler olarak belirlendi. Sitoplazmik maturasyonlarına göre oositler iki gruba ayrıldı. Grup 1; sitoplazması normal yani şeffaf olanlar, Grup 2; sitoplazması granüler, koyu granüler, vokal ve/veya refraktif cisim içeren oositler olarak belirlendi.

Oosit toplama işleminden sonra hastaların eşlerinden masturbasyon ile semen örneği alındı. Bu semen örneğinde sperm bulunamayan erkeklere TESE uygulandı. Spermier swim-up ve yoğunluk gradiyenti santrifügasyon yöntemi ile hazırlandı. Ayrılan spermier kapasitasyon amacıyla 0,5–4 saat protein içeren mediumda (Quinn's Sperm Washing Medium, Sage Media, A.B.D) 37°C'de, %5'lik CO₂'li ve %95'lik nemli ortamda inkübasyona (Heraus inkübatör, Almanya) bırakıldı. Mikroenjeksiyon prosedürü Van Steirteghem ve ark. (110) tanımlamalarına göre yapıldı.

3.4. Fertilizasyon, Embriyo Kalitesi

Fertilizasyon, ICSI işleminden 16–20 saat sonra mikroskop altında iki ayrı pronükleusun görülmesi ile tespit edildi. Oositler fertilize olmalarına göre iki gruba ayrıldı Grup 1: fertilize olanlar; Grup 2: olmayanlar olarak tanımlandı. .

Embriyo transferi ICSI işleminden yaklaşık 48–72 saat sonra yapıldı. Transfer günü embriyolar kalitelerine göre derecelendirildi. Embriyo kalitesi; hücre sayısı, simetri, blastomerlerin şekli, perivitellin aralıktaki sitoplazmik fragmantasyonların büyüklüğü ve klivaj oranı dâhil edilerek morfolojik özelliklere dayanarak modifiye Veeck (54) kıstasları kullanılarak hesaplandı. Grade 1 embriyo (en üst kalite embriyo): blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte, % 0 fragmantasyon; Grade 2 embriyo: blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte %0–25 arası fragmantasyon; Grade 3 embriyo: blastomerler eşit büyüklükte değil ve %25–50 arası fragmantasyon; Grade 4 embriyo: blastomerler eşit büyüklükte veya değil ancak %50’den fazla fragmantasyon oranı olarak tanımlandı. Kalitelerine göre değerlendirilen embriyolar iki gruba ayrıldı. Grup 1: grade 1 (en üst kalite embriyolar), Grup 2: grade 2-4 embriyolar olarak tanımlandı.

Embriyo transferi öncesinde vajen steril salin solüsyonuyla yıkandı. Transabdominal ultrasonografi (Sonoline Adara, Siemens, Almanya) rehberliğinde transfer kateterinin (Wallace, Smiths, İngiltere veya Labotect, Almanya) ucu fundusa dokunmadan yaklaşık 1–1,5 cm altında iken midkaviteye embriyo transferi yapıldı. Transfer kateterinde embriyo kalıp kalmadığı kontrol edildikten sonra işleme son verildi. Hasta embriyo transferi sonrası 20 dakika istirahat ettikten sonra taburcu edildi. Luteal faz desteği doğal progesteron (Progestan kapsül, 100mg, Koçak, Türkiye) 600 mg/gün, intravaginal uygulama ile sağlandı. Biyokimyasal gebelik embriyo transferi sonrası 14. günde serum β -hCG ölçümü 25 mIU/ml’den fazla ise ve klinik gebelik embriyo transferinden üç hafta sonra transvaginal USG’de bir veya daha fazla gebelik kesesi görülmesi ile tanındı.

3.5. Serum ve Follikül Sıvısında HGF Tayini

Serum ve follikül sıvılarındaki HGF protein miktarının kantitatif olarak saptanması amacı ile solid faz sandviç Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi kullanıldı. Her bir örnek üçer kez çalışıldı. İnsan HGF proteinine spesifik monoklonal antikor ile kaplı 96 kuyulu mikrolakalar içine HGF protein kontrol örnekleri ve hastalardan elde edilen serum ve follikül sıvıları eklendi. Böylece kontrol ve hasta örneklerindeki HGF proteini mikrolakalar yüzeyine sabitlendi. Bağlanmayan proteinlerin yıkılarak uzaklaştırılması sonrasında ikincil HGF spesifik biyotinli monoklonal antikor eklendi. Bağlanmayan antikorlar yıkamayla uzaklaştırılıp streptavidin-peroksidaz enzimi eklendi. İkincil antikorun peroksidaz enzimi ile işaretlenmesini takiben enzim substratı olan boyalı reaktif eklenerek renk değişimi sağlandı. Mikrolaka içinde oluşan renk değişimleri 450 nm

dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. HGF standartları ile elde edilen eğri kullanılarak hasta örneklerindeki HGF miktarı belirlendi.

3.6. Granüloza Hücrelerinde c-MET mRNA Miktar Tayini

RNA later eklenerek -80°C'de saklanan granüloza hücreleri oda sıcaklığında çözüldü. Eşit hacimde fosfat tamponlu tuz (PBS) eklenip 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. RNA later uzaklaştırılıp hücre pelletinden RNA izolasyon kiti (NucleoSpin RNA II, MN GmbH) kullanılarak total RNA izole edildi. Elde edilen RNA miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi. Total RNA kalıp olarak kullanılarak reverse transkriptaz enzimi aracılığıyla cDNA sentezi (First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) yapıldı.

İnsan c-MET genine özgül primerleriyle (c-MET ileri 5'GCT TTG TAA GTG CCC GA 3', c-MET geri 5'TGC CCT CTT CCT ATG AC3'. Referans sekans no: NM 000245) kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirildi (Roche LC 480 1.5 system). 18S geni (18S ileri: 5'AGATCAAACCAACCCGGTGA3', 18S geri: 5'GGCGACTACCATCGAAAGTT3'. Referans sekans no: NR 003286) referans olarak kullanıldı. c-MET ve 18S primerlerinin etkinliği ve hasta örneklerindeki c-MET ve 18S CT değerleri Relative Expression Software Tool - version 2 (REST) programı kullanılarak analiz edildi. c-MET mRNA değişimi 18S RNA miktarına göre normalize edildi. c-MET dCT değerleri istatistiksel olarak incelendi.

3.7. Serum Hormon Tayini

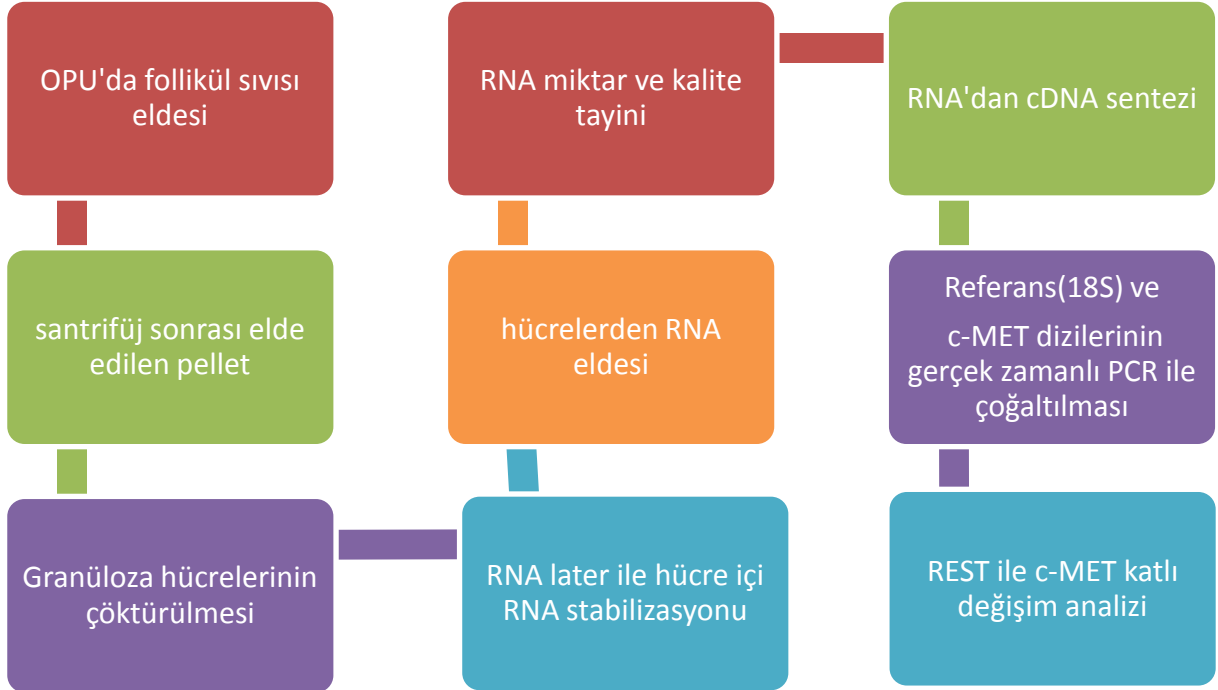
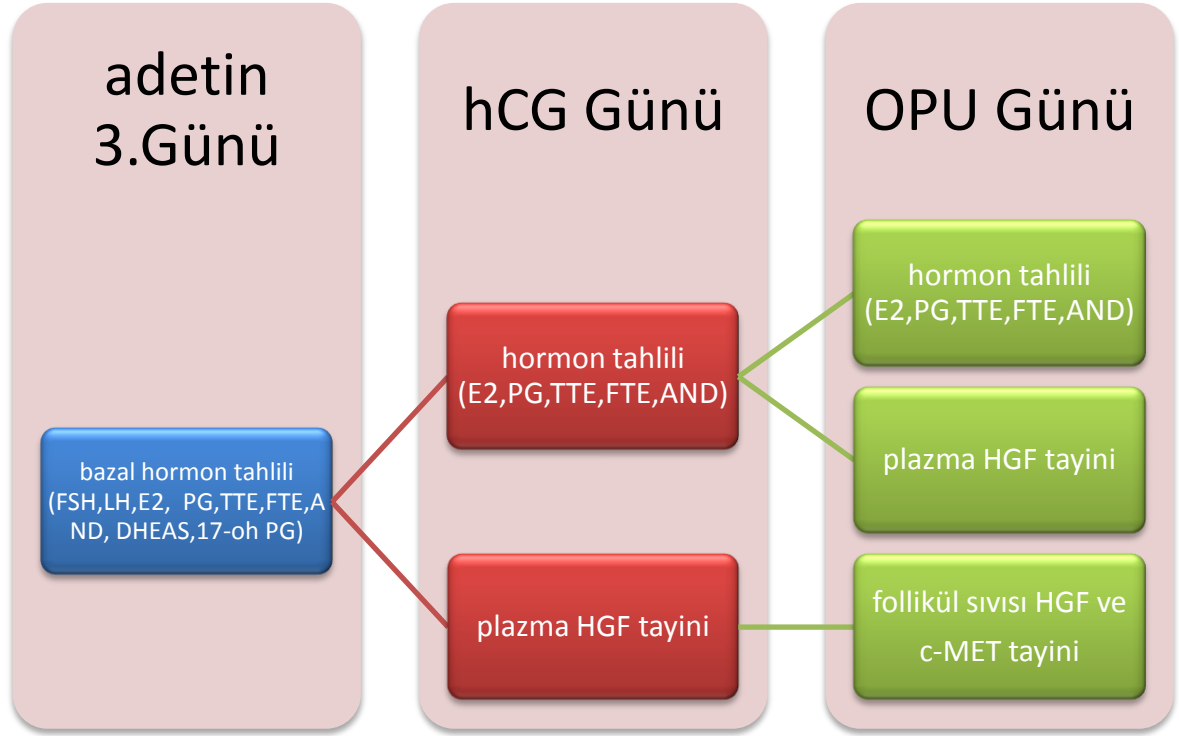
Hastalardan gonadotropin başlanmadan önce bazal, hCG ve OPU günü alınan kandan elde edilen serum örnekleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji laboratuvarında incelendi. Bazal kan örneklerinden serum FSH, LH, progesteron (PG), E2, Total Testosteron (TTE), Dihidro epiandrositenodion sülfat (DHEAS) değerleri solid faz karşılaştırmalı chemiluminescent enzim immune assay yöntemi ile İmmulite 2500 (Simens, Almanya) cihazında çalışıldı. İnter-assay değişim katsayıları (coefficient of variations) FSH %3, LH % 5.4, PG % 6.7, E2 % 6.4, TTE % 3.42, DHEAS % 6.5. İnter-assay değişim katsayıları ise FSH %4.6, LH %8, PG % 9.5, E2 %7.8, TTE %7.16, DHEAS % 9.3. 17 hidroksi progesteron (17-OHPG) ve Serbest Testosteron (FTE) radyoimmunoassay (RIA)

yöntemi ile çalışılıp gama counter ile CPS değerleri okundu. İnter-assay değişim katsayıları 17-OHPG % 8.3, FTE %3.7. İnter-assay değişim 17-OHPG % 12, FTE %7.9 idi. hCG ve OPU günü alınan kan örneklerinden serum E2, PG, TTE ve andrositenodion değerleri solid faz karşılaştırmalı chemiluminescent enzim immune assay yöntemi ile İmmulite 2500 (Simens, Almanya) cihazında çalışıldı. Andrositenodion için İnter-assay değişim katsayısı % 4.3, inter-assay değişim katsayısı ise % 6.3 idi. Serum FTE ise radyoimmunoassay (RIA) yöntemi ile çalışılıp gama counter ile CPS değerleri okundu.

3.8. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistikler “SPSS for Windows 13.0” istatistik programı ile yapıldı. Katagorik değerler Ki-kare, kategorik olmayan değerler Mann Whitney U ile gruplar arasında analiz edildi. Eşdeğer verilerin süreklilik analizi Paired-T test ve korelasyon analizi ile yapıldı. P değeri 0.05’den düşük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Çalışma Dizaynı Özeti



4. BULGULAR

Yirmibir hasta PCOS ve 38 hasta kontrol olmak üzere toplam 59 hastayla çalışma grubu oluşturuldu. Kontrol grubu 18 erkek faktör, 18 açıklanamayan infertilite ve 2 tubal faktör tanıli hastadan oluşmaktaydı.

Oosit toplama işlemi sırasında her hastadan bir ile üç arasında follikül sıvısı alındı. Toplam 168 follikül sıvısı ve oositleri ayrı ayrı toplandı. Bu 168 follikül sıvısının 40 tanesi PCR ile DNA elde edilememesi ve/veya HGF analizinin sonuç vermemesi nedeni ile çalışma dışı bırakıldı. Toplam 128 follikül sıvısının sonuçları değerlendirmeye alındı.

Ellidokuz hastadan 37 tanesi GnRH agonist uzun protokolle ve 22 tanesi GnRH antagonist protokolle tedavi edildi. 59 hastadan 32 tanesinde gebelik oluştu, 27 tanesinde ise oluşmadı (%54 biyokimyasal gebelik oranı).

Hastaların yaş ortalaması 30.83, vücut kitle indeksleri (BMI) 24.41, infertilite süreleri 6.48 yıl idi. Toplam indüksiyon süresi ortalama 12.4 gün, hCG günü endometrium kalınlığı 10.76 mm, fertilizasyon oranı %76.19, transfer edilen ortalama embriyo sayısı 3, klinik gebelik oranı %50.2'dir. Bu sonuçların gruplar arasında dağılımı Tablo-2 ve Tablo-3'de gösterilmiştir.

Bazal plazma (ilaç kullanmadan önce menstrasyonun 3.günü sabah alınan kan örnekleri) FSH, LH, E2, FTE, DHEAS, 17-OHPG düzeyleri, infertilite süreleri gruplar arasında fark göstermemektedir. Bazal serum total testosteron, androstenodion değerleri (p:0.012 ve p<0.001) ve LH/FSH oranı (p:0.055) PCOS'lu hastalarda kontrol grubuna göre yüksektir (Tablo.2).

Tablo.2. Hastaların Klinik ve Hormonal Sonuçlarının Karşılaştırılması

	PCOS (n:21) Ort ± SD	Kontrol (n:38) Ort ± SD	P değeri
Yaş	29.33±4.08	31.68±4.89	0.069
BMI (kg/m2)	24.47±3.35	24.37±3.23	0.911
İnfertilite süresi (yıl)	6.19±3,58	6.65±4.45	0.689
FSH (mIU/ml)	6.11±2.15	7.26±2.53	0.085
LH (mIU/ml)	5,21±3.51	4.465±2.12	0.317
LH/FSH oranı	0.86±0,54	0.63±0,34	0.055
Estradiol (pg/ml)	54.71±28,83	58.20±37,85	0.715
Total Testosteron (ng/dl)	49.29±33,01	31.32±19,40	0.012*
Serbest testosteron (pg/ml)	2.29±0.86	1.95±0.67	0.097
Androstenodion (ng/ml)	3.47±1.23	2.21±0.93	<0.001*
DHEAS (ug/dl)	209.50±76.57	175.79±55.94	0.063
17-OH PG (ng/ml)	1.91±0.79	1.64±0.81	0.241

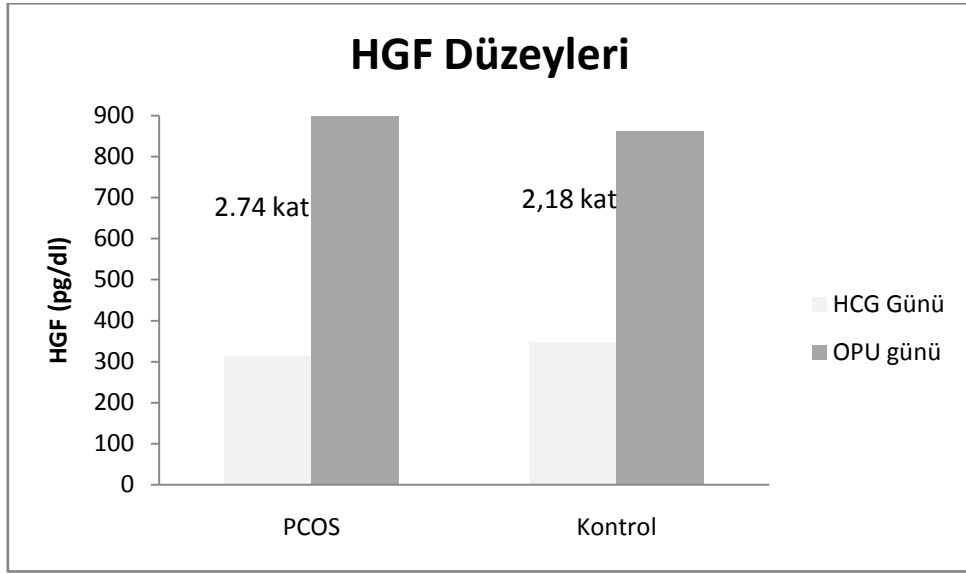
Mann-Whitney U analizlerine göre

Tablo.3. PCOS ve Kontrol Grubu Genel Özellikleri

	PCOS (n:21) Ort ± SD	Kontrol (n:38) Ort ± SD	P değeri
İndüksiyon süresi (gün)	12.00±1.58	12.38±1.67	0.402
Endometrium kalınlığı (mm)	10.98±2.52	10.63±2.76	0.623
Toplam gonadotropin dozu (IU)	1804.40±770.64	2843.24±1015.26	<0.001*
Toplam oosit sayısı	16.67±8.05	8.65±4.66	<0.001*
Toplam follikül sayısı	16.43±6.35	10.57±7.67	0.004*
Matür oosit sayısı	13.76±6.83	7.35±4.47	<0.001*
Fertilizasyon oranı (%)	30/38 (78.94)	50/67 (74.62)	0.676
Transfer edilen embriyo sayısı	3.19±0.75	2.89±0.69	0.133
Klinik gebelik oranı (%)	57.1	48.6	0.542

Mann-Whitney U analizlerine göre

Toplam gonadotropin dozu PCOS grubunda anlamlı düşük; ortalama oosit, follikül ve matür oosit sayısı PCOS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti (Tablo.3).



Şekil.10. hCG ve OPU Günü Serum HGF Düzeylerinin Karşılaştırılması

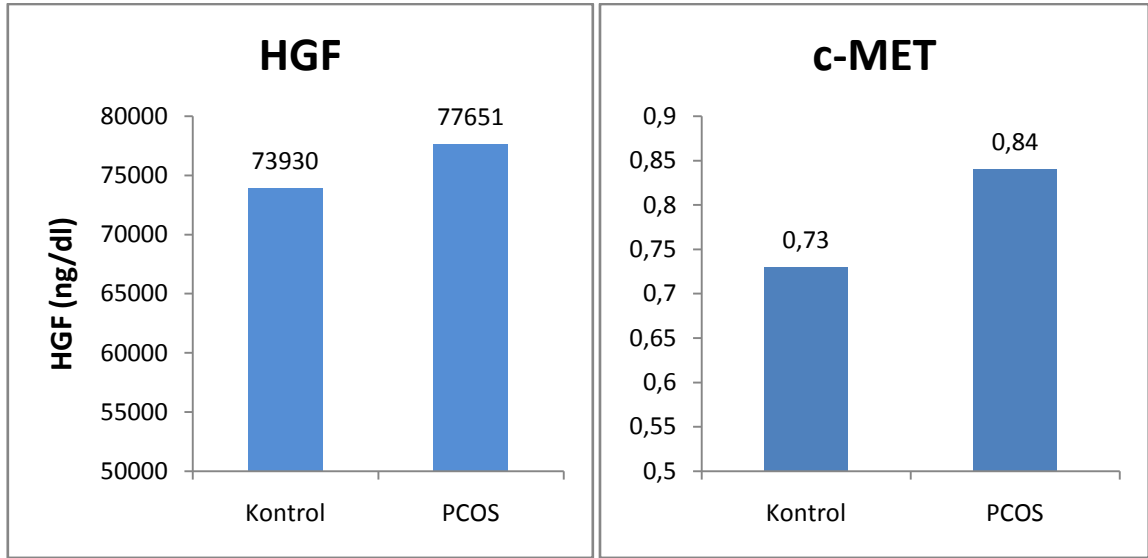
Serum HGF düzeyleri, PCOS grubunda OPU gününde hCG gününe göre ortalama 2.74 kat arttığı saptandı. Kontrol grubunda ise bu artış ortalama 2.18 kat bulundu. Bu artış oranları gruplar arasında farklılık göstermedi (Şekil.10).

Tablo.4. hCG ve OPU Günü Gruplar Arası Serum Hormon ve HGF Düzeylerinin Karşılaştırılması

	hCG GÜNÜ			OPU GÜNÜ		
	PCOS (n=21) Ort ± SD	KONTROL (n=38) Ort ± SD	P değeri	PCOS (n=21) Ort ± SD	KONTROL (n=38) Ort ± SD	P değeri
E2 (pg/ml)	3134.50±1733.95	1825.13±1490.52	0.001*	1700.52±987.35	1061.05±642.88	<0.001*
PG (ng/ml)	0.96±0.40	1.10±0.95	0.650	11.70±5.41	6.79±6.00	<0.001*
TTE (ng/dl)	82.10±39.83	61.18±36.84	0.037*	143.96±55.89	100.39±53.57	0.004*
FTE (pg/ml)	2.37±0.87	2.00±0.60	0.147	2.50±1.03	2.04±0.85	0.070
A4 (ng/ml)	5.11±2.71	3.52±1.66	0.038*	7.16±2.71	4.10±1.89	<0.001*
HGF (pg/ml)	313.72±228.01	347.26±177.80	0.613	898.85±461.06	861.10±410.22	0.749

Mann-Whitney U analizlerine göre

Sadece serum TTE ve A4 değerleri siklus öncesi bazal, hCG günü ve OPU günü PCOS grubunda anlamlı yüksek idi (Tablo.2-4).



HGF düzeyleri p:0.371; c-MET düzeyleri p:0.480

Şekil.11. Folliküler Sıvı Ortalama HGF ve c-MET Değerleri

PCOS grubunda ortalama folliküler sıvı HGF düzeyleri kontrol grubundan daha yüksek bulundu. Ancak bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi (p:0.371). c-MET reseptör ekspresyonu açısından gruplar arasında bir fark bulunmadı (p:0.480, Şekil.11).

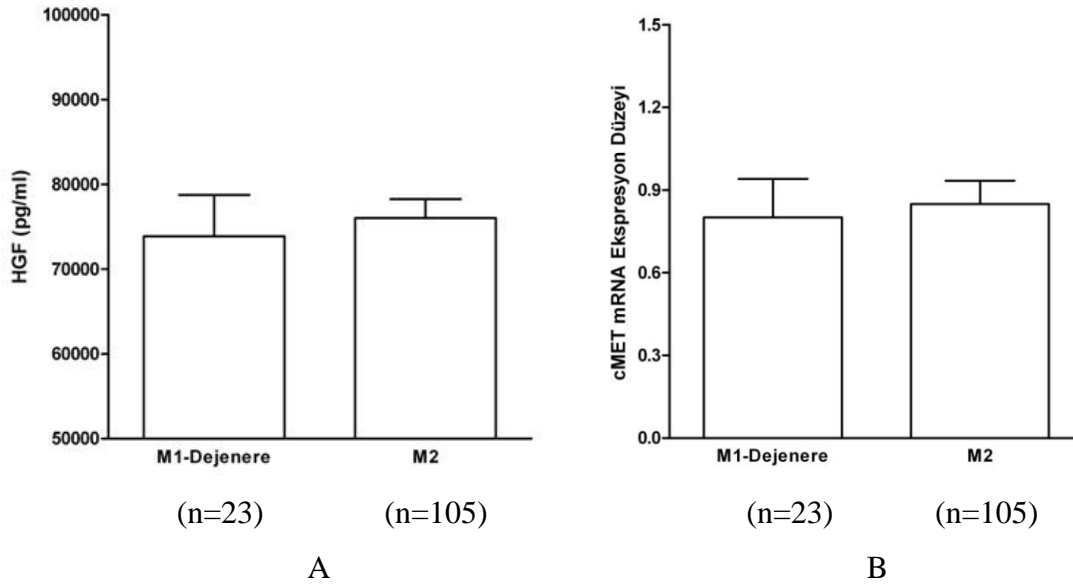
Tablo.5. Serum ve Follikül Sıvısı HGF Düzeylerinin Karşılaştırması

	HGF Serum* (pg/ml) Ort ± SD	HGF follikül sıvısı (pg/ml) Ort ± SD	Folikül HGF / Serum HGF	P Değeri
PCOS (n=21)	898.85± 461.06	77651±18968	86	<0.001
Kontrol (n=38)	861.10± 410.42	73930±25353	85	<0.001

Pair T Test analizine göre; * OPU günü

Foliküler sıvı ortalama HGF değerleri aynı gün alınan serum HGF değerlerinden PCOS grubunda yaklaşık 86 kat, kontrol grubunda ise 85 kat fazla bulunmuştur ve bu fark anlamlıdır (Tablo.5).

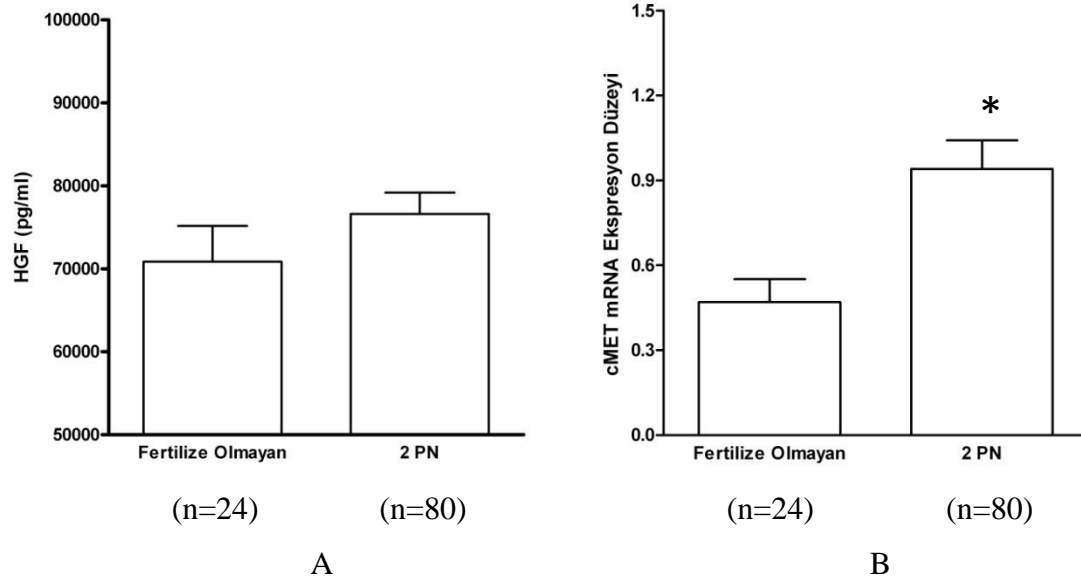
Elde edilen 128 oositin 105 tanesi mayotik maturiteye ulaşmış (MII), 6 tanesi immatür (MI veya GV) ve 17 oosit dejenere olmuştur. 105 matür oosite ICSI uygulanmış ve 80 tanesi iki pronükleus içeren (2PN) zigot haline gelmiştir. Bir tanesi anormal fertilizasyon göstermiş (1PN), 24 oosit ise fertilize olmamıştır. Seksen tane 2PN zigottan 4 tanesi bölünmeye devam etmemiştir. Embriyo morfolojisine göre 42 tanesi Grade-1 embriyo ve 34 tanesi Grade2-4 embriyo olarak değerlendirilmiştir.



Şekil.12. Maturasyona Göre Folliküler Sıvı HGF(A) ve c-MET Ekspresyon Düzeyleri(B) Değişimi

Matür oositlerde (MII) folliküler sıvı ortalama HGF düzeyleri 75788 pg/ml, immatür (MI ve GV) oositlerde 63623 pg/ml ve dejenere oositlerde ise 77514 pg/ml olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil.12.A).

c-MET mRNA ekspresyon düzeyi açısından matür oosit (MII) elde edilen follikülerdeki ortalama c-MET düzeyi 0.83, immatür oosit elde edilen folliküllerin ortalama c-MET düzeyi 0.63 ve dejenere olanlarda ise c-MET düzeyi 0.77'dir. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil.12.B).

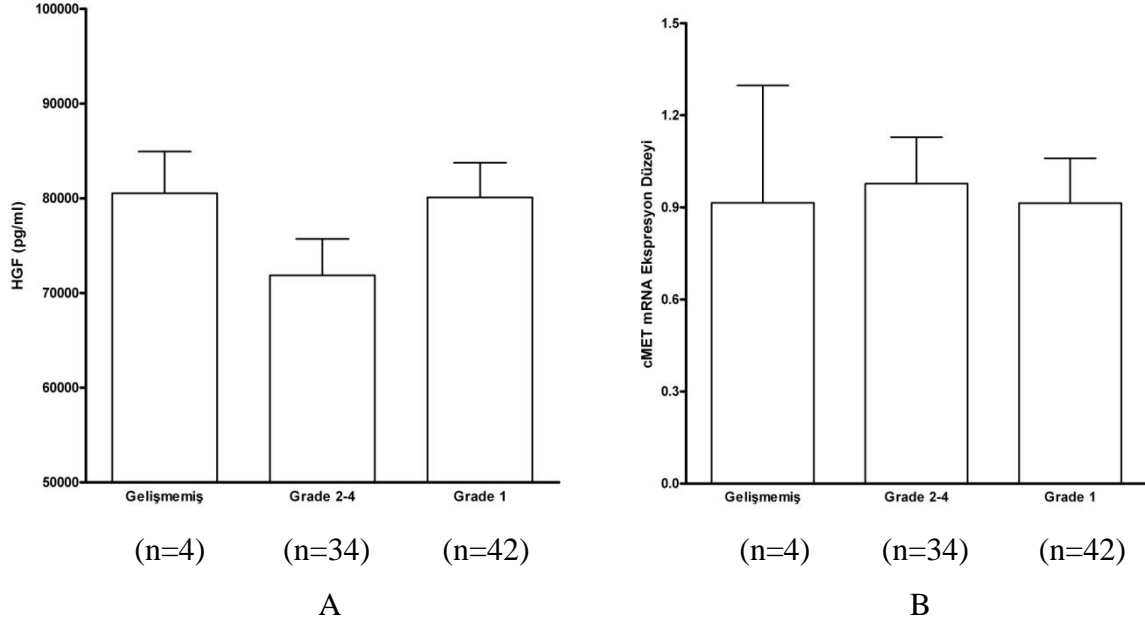


Şekil.13.Fertilizasyona Göre Folliküler Sıvı

HGF(A) ve c-MET Ekspresyon Düzeyleri(B) Değişimi (*:p=0.034)

Fertilizasyon durumlarına göre yapılan değerlendirmede ise normal fertilize olan (2PN) grupta folliküler sıvı ortalama HGF düzeyleri 76629 pg/ml, fertilize olmayanlarda ise 70865 pg/ml olarak tesbit edildi (Şekil.13.A)

Fertilizasyon açısından c-MET ekspresyon düzeylerini incelediğimizde fertilize olmuş 2 hücreli zigotlarda (2PN) follikül ortalama c-MET değeri 0.94, fertilize olmayanlarda ise 0.47'dir. Bu iki grup ortalamaları karşılaştırıldığında birbirinden farkı istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.034, Şekil.13.B) Anormal fertilize olan bir adet oosit olduğu için ona ait sonuç değerlendirme dışı bırakılmıştır.



Şekil.14. Embriyo Kalitesine Göre Folliküler Sıvı HGF(A) ve c-MET Ekspresyon Düzeyleri(B) Değişimi

Embriyo kalitesi baz alındığında grade 1 embriyoların geliştiği oositlerin follikül sıvılarının ortalama HGF düzeyi 80103 pg/ml, Grade 2-4 embriyo gelişen oositlerin follikül sıvılarının ortalama HGF düzeyleri 71879 pg/ml olarak ölçüldü (Şekil.14.A).

Embriyo kalitesi açısından c-MET ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde ise grade 1 embriyolarda follikül c-MET ekspresyon düzeyi 0.91, grade 2-4 embriyolarda c-MET ekspresyon düzeyi 0.97, embriyo gelişmeyenlerde ise 0.91 bulunmuştur. Gruplar arasındaki bu değerlerin birbirinden farklı olmadığı gözlemlendi (Şekil.14.B).

Kontrol grubunda dejenere oosit sayısı 7, immatür oosit sayısı 4; PCOS grubunda dejenere oosit sayısı 10, immatür oosit sayısı 2 idi. Yani PCOS grubunda % 4 immatür oosit ve kontrol grubunda % 5 immatür oosit mevcuttu. Hastaların tüm oositlerini göz önüne aldığımızda PCOS grubunda %6.11 immatür oosit, kontrol grubunda %6.8 immatür oosit mevcuttu. Aldığımız örnek grubu tüm hasta sonuçları ile uyumluydu. Dejenere oositlerin ortalama HGF düzeyi PCOS grubunda 75788 ± 18620 ve kontrol grubunda 79979 ± 35235 bulundu. Dejenere oositlerin ortalama c-MET ekspresyon düzeyleri kendi PCOS grubunda 0.60 ± 0.47 ve kontrol grubunda 0.84 ± 0.83 olarak tesbit edildi. Kontrol ve PCOS grubunda matür ve immatür oositlerin follikül sıvısı ortalama HGF ve c-MET ekspresyon düzeyleri Tablo-6 'da gösterilmiştir.

Tablo.6. Folikül Sıvısı HGF ve cMET Düzeylerinin Maturasyona Göre Karşılaştırması (PCOS ve Kontrol grubunun kendi içinde)

		MII Ort ± SD	MI-GV Ort ± SD	P Değeri
PCOS (n:40)	HGF (pg/ml)	78612.50±18778	56099±13675.44	0.090
	c-MET	0.96±0.94	0.53±0.45	0.607
Kontrol (n:71)	HGF (pg/ml)	72902.18±24399.82	67386±6342.81	0.606
	c-MET	0.74±0.73	0.68±0.46	0.539

Mann-Whitney U analizlerine göre

Grupları fertilizasyona göre değerlendirdiğimizde PCOS ve kontrol gruplarında fertilize olan oositlerde fertilize olmamış oositlere göre 2 kat artmış c-MET ekspresyonu saptanmıştır. Her iki grup değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır (Tablo.7).

Tablo.7. Folikül Sıvısı HGF ve cMET Düzeylerinin Fertilizasyona Göre Karşılaştırması (PCOS ve Kontrol grubunun kendi içinde)

		2PN Ort ± SD	Fertilize olmayan Ort ± SD	P Değeri
PCOS (n:38)	HGF (pg/ml)	79455.77±19536.94	74878±15690	0.567
	c-MET	1.07±0.99	0.51±0.47	0.037*
Kontrol (n:67)	HGF (pg/ml)	74156.48±24937.16	69213.06±23065.01	0.475
	c-MET	0.84±0.82	0.45±0.37	0.031*

Mann-Whitney U analizlerine göre

Tablo.8. Folikül Sıvısı HGF ve cMET Düzeylerinin Embriyo Kalitesine Göre Karşılaştırması (PCOS ve Kontrol grubunun kendi içinde)

		Grade 1 Ort ± SD	Grade 2-4 Ort ± SD	P Değeri
PCOS (n:28)	HGF (pg/ml)	78395.14±20301.8	80567.60±20632	0.715
	c-MET	1.05±0.99	1.11±0.99	0.949
Kontrol (n:48)	HGF (pg/ml)	80957.57±25576.4	63797.15±21894.49	0.03*
	c-MET	0.84±0.88	0.84±0.77	0.834

Mann-Whitney U analizlerine göre

Kontrol grubunu embriyo kalitesine göre değerlendirdiğimizde follikül sıvısı ortalama HGF düzeyi Grade 1 embriyo gelişen folliküllerde 80957 pg/ml iken Grade 2-4 embriyo gelişen folliküllerde 63797 pg/ml'dir. Grade 1'lerde bulunan yüksek HGF düzeyi istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.03, Tablo.8).

5. TARTIŞMA

Yardımcı üreme teknikleri son 30 yıldır yaygınlığı giderek artan biçimde uygulanmaktadır. Gebelik ve canlı doğum oranlarının artırılması amacı ile üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. ART başarısı en çok anne yaşı ve elde edilen oosit ve embriyonun kalitesine bağlıdır.

Artmış çoğul gebelik ve buna bağlı artmış perinatal morbidite ve mortalite nedeni ile araştırmalar en iyi, en kaliteli ve sağlıklı tek bir embriyoyu bulmak ve bunu transfer etmek fikri üzerinde yoğunlaşmıştır.

Oosit ve embriyo kalitesi değerlendirme parametrelerine ek olarak ovarian mikroçevrede yer alan hormon ve büyüme faktörlerinin oosit gelişimi ve olgunlaşması üzerine olan etkileri araştırılmaktadır.

Ovarian folliküler gelişimin son aşamasında oosit, granüloza hücreleri ile çevrilidir ve içeriği kan plazma düzeylerinden farklı olan folliküler sıvıya maruz kalmaktadır. Oositin nükleer ve sitoplazmik maturasyonunda birçok parakrin, otokrin ve endokrin kontrol mekanizmalarının karmaşık ilişkisi söz konusudur. Follikül sıvısında mevcut bu hormon ve büyüme faktörlerinin düzeyleri gebelik başarısı üzerine etkisini araştıran birçok çalışma yapılmaktadır (111).

Yapılan pek çok çalışmada ICSI sonrası fertilizasyon ve gebelik sonuçları üzerine sperm örneğinin (konsantrasyon, motilite, morfoloji, DNA fragmantasyon yüzdesi) bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Fertilizasyon sonuçları temelde oosit kalitesine ve mikroçevresine bağlıdır. Böylelikle intrafolliküler hormon ve büyüme faktör düzeyleriyle fertilizasyon sonuçları kıyaslanabilir (112,113).

Bu çalışmada PCOS'lu hastalar ile normal over yapısına sahip hastaların hormonal değerleri ve HGF'nin serum/follikül sıvısı düzeyleri ile IVF sonuçlarını karşılaştırdık. Beklendiği üzere serum bazal LH/FSH oranını PCOS'lu hastalarda daha yüksek bulduk. Bu istatistiksel olarak anlamlılığa yakındı ($p:0.055$). PCOS grubunda serum bazal androstenodion, total testosteron düzeyleri anlamlı yüksek bulundu.

PCOS grubunda kullanılan gonadotropin dozu belirgin azdı. Elde edilen oosit sayısı ise belirgin yüksekti. PCOS'lu hastaların granüloza hücrelerinde gonadotropinlere artmış yanıtla bağlı artmış E2 üretimi hCG günü kontrol grubuna kıyasla yüksek E2 düzeylerini açıklamaktadır. MacDougall ve ark. (114) PCOS'lu hastalar ile normal over yapısına sahip hastaları kıyaslamışlardır. PCOS'lu hastalarda ovarian hiperstimulasyon rejimlerinde

kullanılan gonadotropin düzeylerini normal hastalara kıyasla belirgin az bulmuşlardır. hCG günü estradiol düzeylerini ve gelişen follikül sayısını ise belirgin yüksek tesbit etmişlerdir. Fertilizasyon oranlarını normal hastalardan düşük, gebelik oranlarını ise her iki grupta benzer bulmuşlardır.

Orvieto ve ark. (115) yaptıkları çalışmada, bazal, hCG ve OPU günleri alınan kan örneklerinden hormon düzeylerini tesbit etmişlerdir. Buna göre OPU günü serum E2 ve progesteron düzeyleri indüksiyon öncesi bazal değerlere kıyasla belirgin yüksek olduğu tesbit edilmiştir. İnsan koryonik gonadotropini uygulanan gün alınan serumda mevcut E2 düzeyi OPU günündeki E2 düzeyinden yüksek bulunmuş, progesteron düzeyi ise hCG günü daha düşük bulunmuştur. Estradiol düzeyindeki bu düşmeyi hCG'nin aromataz aktivitesini baskılayıcı etkisi olabileceği sonucuna bağlamışlardır. Bu her iki çalışmanın sonucu da bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur. Bunun nedeni hCG ile elde edilen LH pikidir. Bilindiği üzere LH piki mayoz I'in tamamlanması, oositin salınması ve korpus luteum gelişimi için gereklidir. LH piki granüloza hücrelerinden E2 üretiminin azalmasına, teka hücrelerinde androjen ve progesteron sentezinin artmasına neden olmaktadır (111).

Vücutta total testosteronun %70'i ve androstenodionun %50'si overlerde üretilmektedir. Androjenler vücuttan iki temel yolak ile temizlenmektedir. Birincisi 5- α -redüktaz aracılığı ile testosteronun dihidrotestosterona ve andrositenodionun 5- α -andrositenodiona dönüşmesidir. İkinci yol ise andrositenodion ve testosteronun aromataz ile estron ve estradiole dönüşmesidir. Aromataz enzimi granüloza hücrelerinde yer alır ve FSH ile aktivesi değişir.

Slater CC ve ark. (116) HMG sikluslarında yaptıkları bir çalışmada, ilaçsız dönemden OPU gününe kadar SHBG, testosteron ve andrositenodion düzeylerinin sürekli arttığını, artmış androjen düzeylerinin SHBG üretimini azaltırken, aromataz aktivitesini arttırarak östrojen üretimini arttırdığını göstermişlerdir. Sonuçta artmış SHBG'nin serbest testosteron düzeylerinin azalmasına neden olduğu söylenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise serum total-serbest testosteron ve androstenodion düzeylerinin gonadotropin tedavisi süresince arttığı özellikle bu artışın hCG sonrası belirginleştiği gösterilmiştir (115). Bazal ve hCG günleri arası E2 artışının serum total testosteron ve androstenodion artışı ile uyumlu iken serbest testosteron artışı ile uyumlu olmadığını bulmuşlardır. Bu sonucu E2'nin SHBG sentezini arttırıcı etkisinin, androjenlerin SHBG sentezini azaltıcı etkisinden daha baskın olmasına bağlamışlardır. Bu bulgular ile bizim bulduğumuz sonuçlar da benzerlik göstermektedir.

Yapmış olduğum literatür taramasına göre bu çalışma PCOS'lu hastalarda serum ve folliküler sıvı HGF düzeylerini gösteren ve HGF reseptörü c-MET ekspresyonunu gerçek zamanlı PCR ile tesbit eden ilk çalışmadır. Yine PCOS dışı ART sikluslarında hCG günü ve OPU günü serum HGF düzeylerini inceleyen ve kıyaslayan ilk çalışmadır.

Çalışmamızda serum HGF düzeyleri, OPU günü hCG gününe göre PCOS grubunda 2.74 kat, kontrol grubunda ise 2.18 kat artış göstermiştir. İnsan serumunda bu karşılaştırma ve ölçümün yapıldığı başka bir çalışma yoktur. Ancak Parrott ve ark. (19) sığır over follikülerinden elde ettiği teka hücre kültürlerinde hCG uygulaması sonrası HGF mRNA düzeylerinin arttığını bildirmiştir. Ayrıca bir başka çalışmada (20), follikül sıvısı HGF düzeylerinin follikül sıvısı hCG düzeyleri ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda hCG uygulaması sonrası serum HGF düzeylerinde belirgin artış tesbit ettik. Buradan hareketle hCG'nin preovulatuvar folliküllerde HGF üretimini teka hücrelerini direk ya da granüloza hücreleri üzerinden dolaylı olarak uyararak arttırdığını öne sürebiliriz.

Osuga ve ark. (20) IVF sikluslarında tubal faktör ve erkek infertilitesi tanısı alan 11 hastanın follikül sıvısında HGF düzeylerini ilk kez ölçmüşler ve aynı gün alınan serum örnekleri ile kıyaslamışlardır. Follikül sıvısı HGF düzeylerinin aynı gün alınan serum örneklerindeki HGF düzeylerinden yaklaşık 90 kat yüksek olduğunu bulmuşlardır. Biz de çalışmamızda tüm hastalarda (PCOS ve kontrol gruplarında) follikül sıvısı HGF düzeylerinin serum düzeylerinden yaklaşık 85 kat yüksek olduğunu bulduk. Follikül sıvısındaki bu yüksek değerler HGF'nin teka hücrelerinde lokal üretiminin bir sonucu olduğunu düşünüyoruz. Bizim verilerimiz de literatürdeki bu tek çalışmanın sonuçları ile uyumludur.

Kawano ve ark. (22) IVF-ET programına dahil hastaların follikül sıvılarında anjiyogenetik maddeleri (VEGF, HGF ve anjiyogenin) ve bu maddelerin mRNA ekspresyonlarını göstermişler, oosit maturasyonlarına göre bu değerleri karşılaştırmışlardır. OPU sırasında elde ettikleri oositleri büyüklükleri ile kümülüs ve korona yapısına göre sınıflandırmışlardır. Matür olarak sınıflandırdıkları oositlerin follikül sıvılarında HGF düzeylerini anlamlı yüksek bulmuşlardır. Biz de yapmış olduğumuz çalışmada matür oositlerin ortalama HGF düzeylerini immatür oositlerden daha yüksek bulduk. Grupları kendi içerisinde kıyasladığımızda da bu farklılık devam etmekteydi. Ancak immatür oosit sayımız (n:6) az olduğu için bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olabilir. Dejenere oositlerin ortalama HGF düzeyleri matür oositlerin ortalama HGF düzeyleri ile benzerdi. Takip ettiğimiz her bir oosit ayrı ayrı bölmelerde işlem gördüğü için laboratuvar kaynaklı problemler (işlem süresinin uzaması, enzimatik solüsyonlara maruziyetin artması) oositlerin

dejenerasyon oranını arttırmış olabilir. Yani, normal gelişim gösterebilecek oositlerin bir kısmı laboratuvar kaynaklı problemler sebebiyle dejenere olmuş olabilir. Bu durum dejenere oositlerde matür oositlere benzer HGF düzeyleri bulunmasını açıklayabilir.

Folikül sıvısında ortalama HGF düzeylerini kontrol grubundaki grade 1 embriyolarda grade 2-4 embriyolara kıyasla anlamlı yüksek bulduk. Bu sonucun, insan embriyo kalitesini öngörmeye follikül sıvısı HGF düzeylerinin anlamlı olabileceğini gösterdiğine inanmaktayız. Endometrial reseptivitenin optimal olduğu dönemde iyi kalitedeki embriyoların transferi implantasyon başarısını belirleyen ana etkenlerdir. Fertilize oositlerdeki yüksek c-MET reseptör ekspresyon düzeyleri ile birlikte yüksek HGF düzeylerinin devamının iyi kalitedeki embriyo gelişimi ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Bu iyi kalitedeki embriyolarda yüksek HGF düzeyleri HGF'nin anjiyogenez ve proliferasyon üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu implantasyon başarısını arttırmada rol oynayabilir. Gelecekte çeşitli hormon ve büyüme faktörlerinin implantasyon başarısındaki rolleri anlaşıldıkça, endometrial reseptivite ve embriyo kalitesini değerlendirirken bu belirteçlerin de kullanılabilmesi ön görülmektedir (117).

HGF'nin teka hücrelerinden salgılandığını ve c-MET reseptörünün granüloza hücrelerinde eksprese olduğunu 1994 yılında Parrott ve ark. (78) göstermiştir. 1997 yılında Zachow (18) teka hücrelerinin de c-MET eksprese ettiğini bulmuştur. Üzümcü ve ark. (82) rat over granüloza hücrelerinde in vitro olarak HGF'nin steroid yapımını düzenleyerek ve apoptozisi engelleyerek follikülogenezi desteklediği hipotezini ortaya atmışlardır. HGF'nin apoptozisi erken follikülogenezde engellediğini HGF, c-MET sisteminin aktivasyonunu göstererek açıklamışlardır. c-MET ekspresyonunun en yüksek düzeyde pre-antral folliküllerde bulunduğunu ve gonadotropin uygulaması sonrası büyük antral folliküllerde HGF'nin arttığını göstermişlerdir. Biz de c-MET ekspresyon değeri ortalamasının fertilize olan oositlerde, fertilize olmayan oositlerin ekspresyon düzeyinden yaklaşık 2 kat fazla olduğunu gösterdik (p:0.03). Bu anlamlı sonuç PCOS ve kontrol grubunu ayrı ayrı değerlendirdiğimizde de devam etmektedir. Oosit fertilizasyonu ve HGF ekspresyonu ile ilgili yapılmış bir çalışma yoktur. Ancak HGF gibi anjiyogenetik bir büyüme faktörü olan VEGF ile yapılmış çalışmalarda artmış damarlanma ve oksijenlenme sonucu artmış fertilizasyon potansiyeli gösterilmiştir (118). Bunun aksine artmış VEGF düzeylerinin düşük fertilizasyon ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (119). HGF ve reseptörü c-MET ekspresyonu ile maturasyon, fertilizasyon ve embriyo kalitesini inceleyen daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Matür oositlerin %76'sının fertilize olabildiğini göz önüne aldığımızda oositler matür bile olsalar fertilizasyon için HGF reseptörü olan c-MET mRNA ekspresyon düzeyinin belli bir eşik değerin üzerinde olması halinde fertilize olabildiklerini düşündürmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma PCOS'lu hastalarda serum ve folliküler sıvı HGF düzeylerini gösteren ve HGF reseptörü c-MET ekspresyonunu gerçek zamanlı PCR ile tesbit eden ilk çalışmadır. OPU günü HGF düzeylerinin hCG gününün iki katına çıkması HGF sentezinin artışında LH'nin rolü olduğunu düşündürmektedir.

Kontrol grubunda follikül sıvısı ortalama HGF düzeyleri daha yüksek olan oositlerden Grade I embriyo gelişme olasılığının daha yüksek olduğunu bulduk. Bu sonuç follikül sıvısı HGF düzeyinin insan embriyo kalitesini öngörmeye anlamlı olduğunu göstermesi açısından önemli bir ilktir.

HGF reseptörü c-MET mRNA ekspresyon düzeyinin fertilize olan oositlerde belirgin yüksek olması HGF'nin diğer bilinen sitokin sistemleri ile sinerjistik etki göstererek fertilizasyon başarısında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu yüksek c-MET ekspresyon düzeyleri ile fertilizasyon başarısı arasındaki ilişkiyi gösterecek başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. 2005 Assisted reproductive technology ART report. www.cdc.gov/ART/ART 2005.
2. Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, et al. The European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum reprod* 2008; 23: 756-771.
3. Creus M, Penarrubia J, Fabregues F, et al. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcomes. *Hum Reprod* 2000; 15: 2341-2346.
4. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 685-718.
5. Jedrzejczak P, Rzepczynska I, Taszarek-Hauke G and Pawelczyk L. Effect of sperm subpopulation's kinetics on human fertilization in vitro. *Arch Androl* 2005; 51: 185-193.
6. Linsten AME, Eijkemans MJC, Hunault CC, et al. Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: a national prospective study. *Hum Reprod* 2007; 22: 2455-2462.
7. Costa LOB, Mendes MC, Ferriani RA, et al. Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1747-1755.
8. Hill MJ, Uyehara CFT, Hashiro GM, Frattarelli JL. The utility of serum leptin and follicular fluid leptin, estradiol, and progesterone levels during an in vitro fertilization cycle. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 183-188.
9. Cupisti S, Dittrich R, Mueller A, et al. Correlations between anti-müllerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *Eur J Med Res* 2007; 12: 604-608.
10. Wu YT, Tang L, Cai J, et al. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod* 2007; 22: 1526-1531.
11. Gherardi E, Gray J, Stoker M, et al. Purification of scatter factor, a fibroblast-derive basic protein that modulates epithelial intractions and movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5844-5848.

12. Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, et al. Human hepatocyte growth factor in plasma from patients with fulminant hepatic failure. *Exp Cell Res* 1986;166:139-150.
13. Nakamura T, Hishizawa T, Hagiya M, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989; 342: 440-443.
14. Nakamura T, Matsumoto K, Mizuno S, et al. Hepatocyte growth factor prevents tissue fibrosis, remodeling, and dysfunction in cardiomyopathic hamster hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: 2131-2139.
15. Moor RM, Seamark RF. Cell signaling, permeability, and microvasculatory changes during antral follicle development in mammals. *J Dairy Sci* 1986; 69: 927-943.
16. Shimizu T, Jiang JY, Sasada H, et al. Changes of mRNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biol Reprod* 2002; 67: 1846-1852.
17. Rosen EM, Lamszus K, Laterra J, et al. HGF/SF in angiogenesis. *Ciba Found Symp* 1997; 212: 215-229.
18. Zachow RJ, Weitsman SR, Magoffin DA. Hepatocyte growth factor regulates ovarian theca-interstitial cell differentiation and androgen production. *Endocrinol* 1997; 138: 691-697.
19. Parrott JA, Skinner MK. Developmental and hormonal regulation of hepatocyte growth factor expression and action in the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod* 1998; 59: 553-560.
20. Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, et al. Evidence for the presence of hepatocyte growth factor expression in human ovarian follicles. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 702-707.
21. Ito M, Harada T, Tanikawa M, et al. Hepatocyte growth factor and stem cell factor involvement in paracrine interplays of theca and granulosa cells in the human ovary. *Fertil Steril* 2001; 75: 973-979.
22. Kawano Y, Zeineh HK, Fukuda J, et al. Production of vascular endothelial growth factor and angiogenic factor in human follicular fluid. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202: 19-23.
23. Dumesic DA, Schramm RD, Abbott DH. Early origins of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 349-360.
24. Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv* 2007; 63: 39-48.

25. Crosignani PG, Rubin BL. Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. The ESHRE Capri Workshop Group. Hum Reprod 2000; 15: 723-32.
26. Forti G, Krausz C. Evaluation and treatment of the infertile couple. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 4177-4188.
27. Fauser BC, Diedrich K, Devroey P, et al. Predictors of ovarian response: progress toward individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. Hum Reprod Update 2008; 14: 1-14.
28. National Institute for Health and Clinical Excellence. Fertility: assesment and treatment for people with fertility problems 2004. www.nice.org.uk
29. Miller PB, Soules MR. The usefulness of a urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. Obstet Gynecol 1996; 87: 13-16.
30. WHO manual for standardized investigation and diagnosis of the infertile couples. Cambridge, New York, Malbourne: Cambridge Universty Press, 1993
31. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. Fertil Steril 2004; 81: 1333-1343.
32. Demirtürk F, Çalışkan AC. Kadın İnfertilitesi. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite. Erk A, Günalp S. çeviri editörü. 7. Baskı. 2007. p: 1013-1223.
33. Devroey P, Fauser BC, Diedrich K. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. Hum Reprod Update 2009; 15: 391-408.
34. Taylor E, Gomel V. The uterus and fertility. Fertil Steril 2008; 89: 1-16.
35. Eldar-Geva T, Meagher S, Healy DL, et al. Effects of intramural, subserosal and submucosal uterine fibroids on the outcome of IVF treatment. Fertil Steril 1998; 70: 687-691.
36. Somigliana E, Vercellini P, Daugati R, et al. Fibroids and female reproduction: a critical analysis of the evidence. Hum Reprod Update 2007; 13: 465-476.
37. den Hartog JE, Lardenoije CM, Severens JL, et al. Screening strategies for tubal factor subfertility. Hum Reprod 2008; 23: 1840-1848.
38. Aydos K. Erkek infertilitesi. Temel Üroloji. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. editör. 3. baskı. 2007. p: 986-993.
39. Practice Committee ASRM. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. Fertil Steril 2006; 86: 111-115.

40. Gulekli B, Child TJ. Initial investigations of the patients (female and male). Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. editor. 2001. p: 401-412.
41. Sills ES, Alper MM Walsh AP. Ovarian reserve screening in infertility: Practical applications and theoretical directions for research. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 146: 30-36.
42. WHO laboratuvar el kitabı: insan semeni ve sperm servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi. Günalp S, Aktan E, Yücel A .editör. 4. baskı. 2002: p: 60-62.
43. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118-1123.
44. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW,et al. The evaluation of morphological characteristic of human spermatozoa according the strict criteria. Hum Reprod 1990; 5: 586-592.
45. Bozdağ G, Gürgan T. Yardımcı üreme teknolojileri. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite. Erk A, Günalp S. çeviri editörü. 7.Baskı. 2007. p: 1215-1274.
46. Schats R, Schoemaker J. The use of GnRH agonists. Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. editor. 2001. p: 483-491.
47. Urman B, Yakın K. Yardımcı üreme teknikleri. . Reprodüktif endokrinoloji ve İnfertilite. Çolgar U. editör. 1. baskı. 2006. p: 171-175.
48. Tarlatzis BC, Bili H. Antagonistic analogs of GnRH: preferable stimulating protocol. Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. editor. 2001. p: 493-500.
49. Kovacs P, Matyas S, Boda K. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. Hum Reprod 2003; 18: 2337-2341.
50. Devrim K. Klasik in vitro fertilizasyon. İn vitro fertilizasyon labratuar yöntemleri (Yeni uygulama ve güncel yaklaşımlar). Delilbaşı L.editör. 1.baskı. 2008. p:127-142.
51. Taner MZ, Sengül N. Over embriyoloji ve gelişim. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite Erk A, Günalp S. Çeviri Editörü. 7.Baskı. 2007. p:97-111.
52. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. Hum Reprod 1988; 1: 81-87.
53. Tavmergen E, Akdogan A. Overde yaşam siklusu. Yen&Jaffe üreme endokrinolojisi. Günalp S.Çeviri editörü. 5. baskı. 2006. p:223-231.

54. Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 541: 259-274.
55. Swain EJ, Smith GD. Mechanism of oocyte maturation. *In vitro* maturation of human oocytes. 2007. p:83-101.
56. Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, et al. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1994; 164:1-9.
57. Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, et al. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003; 18: 821-825
58. Özcan C. Embriyoner gelişim. *İn vitro* fertilizasyon laboratuvar yöntemleri (Yeni uygulama ve güncel yaklaşımlar). Delilbaşı L. editör. 1.baskı. 2008. p:117-125
59. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, et al. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril* 2001; 75: 525-532.
60. Combelles CMK, Cekleniak NA, Racowsky C, et al. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod* 2002; 17: 1006-1016.
61. Cummins JM, Breen TM, Harrison KM, et al. A Formula for scoring human embryo growth rates in IVF: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986; 3: 284-295.
62. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836-842.
63. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, et al. Morphological evaluation of human embryos and a derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod* 2000; 15: 2190-2196
64. Fisch JD, Sher G, Adamowicz M, et al. The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril* 2003; 80: 1352-1358.
65. Loi K, Prasath EB, Huang ZW. A cumulative embryo scoring system for the prediction of pregnancy outcome following ICSI. *Singapore Med J*. 2008; 49: 221-228.
66. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318-1323.

67. Scott L, Alvero R, Leondires M, et al. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2394-2403.
68. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, et al. Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes. *Fertil Steril* 2005; 84: 900-910.
69. Fraser HM, Lunn SF. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *Br Med Bull* 2000; 56: 787-797.
70. Redmer DA, Reynolds LP. Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod* 1996; 1: 182-192.
71. Suzuki T, Sasano H, Takaya R, et al. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum Reprod* 1998; 13: 953-959.
72. Fricke PM, Ford JJ, Reynolds LP, et al. Growth and cellular proliferation of antral follicles throughout the follicular phase of the estrous cycles in Meishan gilts. *Biol Reprod* 1996; 54: 879-887.
73. Jablonka-Shariff A, Reynolds LP, Redmer DA. Effects of gonadotrophin treatment and withdrawal on follicular growth, cell proliferation and atresia in ewes. *Biol Reprod*.1996; 55: 693-702.
74. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Anjiopietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
75. Redmer DA, Dai Y, Li J, et al. Characterization and expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1996; 108: 157-165.
76. Gherardi E, Stoker M. Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen and met. *Cancer Cells* 1991; 3: 227-232.
77. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, et al. Purification and subunit structure of Hepatocyte Growth Factor from rat platelets. *FEBS Lett* 1987; 224: 311-318.
78. Parrott JA, Vigne JL, Chu BZ. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve Keratinocyte and Hepatocyte Growth Hormon production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology* 1994; 135: 569-575.
79. Taniguchi F, Harada T, Deura I, et al. Hepatocyte Growth Factor promotes cell proliferation and inhibits progesterone secretion via PKA and MAPK pathways in a human granulosa cell line. *Mol Reprod Dev* 2004; 68: 335-344.
80. Terranova PF, Rice MV. Cytokine involvement in ovarian processes. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 50-63.

81. Zachow R, Uzumcu M. The HGF system as a regulator of female and male gonadal function. *J Endocrinol* 2007; 195: 359-371.
82. Uzumcu M, Pan Z, Chu Y, et al. Immunolocalization of the hepatocyte growth factor (HGF) system in the rat ovary and the anti-apoptotic effect of HGF in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Reproduction* 2006; 132: 291-299.
83. Zachow R, Ramski BE, Lee H. Modulation of estrogen production and 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase type1, cytochrome p450 aromatase, c-met, and protein kinase b alfa mRNA content in rat ovarian granulosa cells by HGF and FSH. *Biol Reprod* 2000; 62:1851-1857.
84. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, et al. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J* 1991; 10: 2867-2878
85. Morimoto A, Okamura K, Hamanaka R. Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 1042-1049
86. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992; 119: 629-641.
87. Horiguchi N, Takayama H, Toyoda M, et al. Hepatocyte growth factor promotes hepatocarcinogenesis through c-MET autocrine activation and enhanced angiogenesis in transgenic mice treated diethylnitrosamine. *Oncogene* 2002; 21: 1791-1799.
88. Shimizu T, Lijima K, Sasada H, et al. Messenger ribonucleic acid expressions of hepatocyte growth factor, angiopoietins and their receptors during follicular development in gilts. *J Reprod Dev* 2003; 49: 203-211.
89. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for PCOS; toward a rational approach in: Dunaif A, Givens JR. *PCOS*. Boston: Blackwell Scientific; 1992:377-384
90. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus Workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2004; 19: 41-47.
91. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: An androgen excess society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4237-4245.
92. Nisenblatt V, Norman RJ. Androgens and polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009; 16: 224-231.

93. Homburg R. The management of infertility associated with PCOS. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 109-118.
94. Koskinen P, Penttila TA, Anttila L, et al. Optimal use of hormone determinations in the biochemical diagnosis of the PCOS. *Fertil Steril* 1996; 65: 517-522.
95. Hendricks ML, Brouwer J, Hompes PG, et al. LH as a diagnostic criterion for PCOS in patient with WHO II oligo/amenorrhoea. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 765-771
96. Wachs DS, Coffler MS, Malcom PJ, et al. Increased androgen response to follicle-stimulating hormone administration in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab.*2008; 93: 1827-1833.
97. Qu J, Wang Y, Wu X, et al. Insulin resistance directly contributes to androgenic potential within ovarian theca cells. *Fertil Steril* 2009; 91: 1990-1997.
98. Barber TM, Wass JA, McCarthy MI, et al. Metabolic characteristics of women with polycystic ovaries and oligo-amenorrhoea but normal androgen levels: implications for the management of PCOS. *Clin Endocrinol* 2007; 66: 513-517.
99. Kandarakis ED. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert reviews in molecular medicine*. Cambridge University Press. 2008;10:1-19 (www.expertreviews.org)
100. Rice S, Ojha K, Whitehead S, et al. Stage specific expression of androgen receptor, FSH receptor and AMH type2 receptor in single, isolated human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries. *J Endocrinol Metab* 2007; 92: 1034-1040
101. Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle Dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 367-378.
102. Dumesic DA, Damario MA, Session DR, et al. Ovarian morphology and serum hormone markers as predictors of ovarian follicle recruitment by gonadotropins for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2538-2543.
103. Van Wely M, Bayram N, van der Veen S, et al. Predicting ongoing pregnancy following ovulation induction with rFSH in women with PCOS. *Hum Reprod* 2005; 20: 1827-1832.
104. Aleem FA, Predanic M. Transvaginal color Doppler determination of the ovarian and uterine blood flow characteristics in PCOS. *Fertil Steril* 1996; 65: 510-516.
105. Agrawal R, Sladkevicius P, Engmann L, et al. Serum VEGF concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 1998; 13: 651-655.

106. Artini PG, Monti M, Matteucci C, et al. VEGF and b-FGF in PCOS during controlled ovarian hyperstimulation. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22: 465-470.
107. Jacobs HS, Balen AH. Polycystic ovaries and ART. The textbook of Assisted Reproductive Techniques. Gardner D, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. editor. 2001. p:637-644.
108. The Thessaloniki ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008; 89: 505-522.
109. Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, et al. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2006; 12:13-21
110. Van Steirteghem A, Liu J, Nagy Z, et al. Use of assisted fertilization. *Hum Reprod* 1993; 11: 1784-1785.
111. Gougeon A. Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17: 121-155.
112. Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, et al. Special applications of ICSI: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod* 1998; 13: 143-154.
113. Abu-Hassan D, Koester F, Shoepfer B, et al. Comet assay of cumulus cells and spermatozoa DNA status, and the relationship to oocytes fertilization and embryo quality following ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 447-452.
114. MacDougall MJ, Tan SL, Balen A, et al. A controlled study comparing patients with or without polycystic ovaries undergoing IVF and the ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1993; 8: 233-237.
115. Orvieto R, Roll VY, La Marca A, et al. Serum androgen levels in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization cycles. *Gynecol Endocrinol* 2005; 21: 218-222.
116. Slater CC, Chang L, Stanczyk FZ, et al. Altered balance between the 5 alpha reductase and aromatase pathways of androgen metabolism during controlled ovarian hyperstimulation with human menopausal gonadotropins. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 527-533.
117. Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, et al. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 365-377.

- 118.** Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The development potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997; 12: 1047–1055.
- 119.** Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Baka SG, et al. Concentrations of angiogenic factors in follicular fluid and oocyte-cumulus complex culture medium from women undergoing in vitro fertilization: association with oocyte maturity and fertilization. *Fertil Steril* 2001; 76: 98-101.