



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

**FOLİKÜLER SIVI GDF9 VE BMP15
DÜZEYLERİNİN OOSİT VE EMBRYO
KALİTESİNE ETKİSİ**

DR. FUNDA GÖDE

**UZMANLIK TEZİ
İZMİR-2010**



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

**FOLİKÜLER SIVI GDF-9 VE BMP-15
DÜZEYLERİNİN OOSİT VE EMBRYO
KALİTESİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR.FUNDA GÖDE

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr BÜLENT GÜLEKLİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	III
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	VI
GRAFİK LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VII
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İn Vitro Fertilizasyon	5
2.1.1. Tanımı ve endikasyonları	5
2.1.2. IVF başarısını etkileyen faktörler	5
2.1.3. Kontrollü Ovaryen Hiperstimulasyon	6
2.1.4. Folikül Aspirasyonu ve Fertilizasyon	7
2.1.5. Embryo Kültürü ve Transfer	8
2.2. Foliküler Gelişim	9
2.3. Oosit Maturasyonu	11
2.4. Oosit ve Embryo Kalitesi	12
2.5. Foliküler Gelişim ve TGF- β ailesi ilişkisi	15
2.6. BMP-15 ve GDF-9	17
3. Gereç ve Yöntemler	25
3.1. Kontrollü Ovaryen Hiperstimülasyon	25
3.2. Oosit Toplanması	25
3.3. Oositlerin Elde Edilmesi ve ICSI	26
3.4. Oosit Grade Sistemi	27
3.5. Fertilizasyon, Klivaj ve Embryo Değerlendirmesi	28
3.6. Foliküler Sıvı GDF9 ve BMP15 Düzeylerinin Belirlenmesi	28
3.6.1. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	28

3.6.2. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi	29
3.7. Foliküler Sıvı FSH, Progesteron ve Östradiol Düzeylerinin Belirlenmesi	30
3.8. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	50
7. KAYNAKLAR	52

ÖNSÖZ

Kadın Hastalıkları ve Doğum alanındaki uzmanlık eğitimim süresince, değerli bilgi ve deneyimleri ile bu uzmanlık alanını sevmemde ve yetişmemde katkıları bulunan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri, çok sevdiğim sayın hocalarım; Prof. Dr. Oktay Erten, Prof. Dr. Ata Önvural, Prof. Dr. Berrin Acar, Prof. Dr. Namık Demir, Prof. Dr. Turhan Uslu, Prof. Dr. Bülent Gülekli, Prof. Dr. Cemal Posacı, Prof. Dr. Yakup Erata, Prof. Dr. Murat Celiloğlu, Prof. Dr. Uğur Saygılı, Doç. Dr. Sabahattin Altunyurt, Doç. Dr. Serkan Güçlü, Doç. Dr. Erbil Doğan, Uzm. Dr. Bahadır Saatlı, Uzm. Dr. Emre Okyay ve birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı sayın hocalarım Prof. Dr. Bülent Gülekli, Doç. Dr. Erbil Doğan, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Neşe Atabey, Dr. Peyda Korhan, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Dilek Çımrın, Tıbbi Biyolog Tevfik Uslu, Tüp Bebek Merkezinden Uzm. Dr. Elvan Ok, Embryolog Seda Doğan, Embryolog Müge Kovalı ve tüm merkez çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemi sağlayan annem, babam ve kardeşime, bana her zaman destek olan eşim Uzm. Dr. Sercan Göde'ye ve canım oğlum Gediz'e sonsuz teşekkürler..

Dr. Funda Göde

TABLO LİSTESİ

Tablo-I: Metafaz II oosit skorlaması (MOMS)

Tablo-II: Hastaların infertilite nedenleri

Tablo-III: Hastaların infertilite nedenlerine göre klinik özellikleri ve tedavi sonuçları

Tablo-IV: Grade A sistemine göre oosit gradeleri

Tablo-V: Grade B sistemine göre oosit gradeleri

Tablo-VI: 2. gün embryo kalitesine göre embryo gradeleri

Tablo-VII: 3. gün embryo kalitesine göre embryo gradeleri

Tablo-VIII: Foliküler sıvı ortalama±standart hata (sh) GDF9 proform, BMP15 proform, GDF9 matur, BMP15 matur, FSH, P, E2 düzeyleri

Tablo-IX: İnfertilite nedenine göre foliküler sıvı GDF9, BMP15 proform, matur, FSH, E2, P düzeyleri

Tablo-X: Oositlerin nükleer maturasyonları ile GDF-9 ve BMP-15 proform ve matur düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XI: Oositlerin sitoplazması ve GDF-9 ve BMP-15 proform ve matur düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XII: Oosit gradeleri (A) ile GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XIII: Oosit gradeleri (B) ile GDF-9 ve BMP-15 proform ve matur düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XIV: Fertilizasyon ile GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XV: Klivaja ile GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XVI: 2. gün embryo kalitesi ile GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XVII: 2. gün embryo kalitesi ile GDF-9 ve BMP-15 matur formlarının karşılaştırılması

Tablo-XVIII: 3. gün embryo kalitesi ile GDF-9 ve BMP-15 matur formlarının karşılaştırılması

Tablo-XIX: Klinik gebelik sonuçlarına göre GDF9 ve BMP15 düzeyleri

Tablo-XX: Oosit morfolojisi ile embryo kalitesi arasındaki ilişki

Tablo-XXI: MOMS ile embryo kalitesi arasındaki ilişki

Tablo-XXII: Nükleer maturasyon, fertilizasyon ile foliküler sıvı FSH, P, E2 düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XXIII: Klivaj ile foliküler sıvı FSH, P, E2 düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XXIV: Embryo kalitesi ile FSH, E2, P düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo-XXV: Klinik gebelik sonuçlarına göre foliküler sıvı FSH, P ve E2 düzeyleri

Tablo-XXVI: Polikistik overi olmasına göre foliküler sıvı FSH, E2 ve P düzeyleri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1: Fertilize olmuş oosit ve 2 adet pronükleus

Şekil-2: İki hücreli embryo

Şekil-3: Nükleer maturasyonunu tamamlamış oosit

Şekil-4: Sitoplazmik yapılarına göre oositler

Şekil-5: Oositgradeleri

Şekil-6: 8 hücreli embryolar

Şekil-7:Foliküler gelişimin gonadotropin bağımlı ve bağımsız evreleri

Şekil-8: BMP15 ve GDF9'un granuloza hücre reseptör ilişkisi

Şekil-9: Oositten salınan faktörlerin kumulus hücrelerine ve oosit kalitesine etkisi

Şekil-10: BMP15 ve GDF9 eklenmiş mediumun oosit gelişim kapasitesine etkisi

Şekil-11: GDF9 proform ve matur düzeyleri ile klinik gebelik sonuçları arasındaki ilişki için yapılan ROC eğrisi

Şekil-12: BMP15 proform ve matur düzeyleri ile klinik gebelik sonuçları arasındaki ilişki için yapılan ROC eğrisi

GRAFİK LİSTESİ

Grafik-1: BMP15 proform ve matur düzeyleri arasında ve GDF9 proform ve matur düzeyleri arasında korelasyon

Grafik-2: BMP15 ve GDF9 matur düzeyleri arasında korelasyon

KISALTMALAR

AMH: Antimüllerian Hormon

ART: Yardımcı Üreme Tekniği

BMP15: Bone Morphogenetic Protein 15

E2: Östradiol

EFORT: Eksojen FSH Over Rezervi Testi

ET: Embryo Transferi

FSH: Folikül Stimulan Hormon

GDF9: Growth Differentiation Factor 9

GDF9B: Growth Differentiation Factor 9B

GDNF: Glial Cell-derived Neurotrophic Factor

GnRH: Gonadotrophine Releasing Hormone

GV: Germinal Vezikül

GVBD: Germinal Vezikülün Yıkılması

hCG: İnsan Koryonik Gonadotropin

ICSI: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

KOH: Kontrollü Overyen Hiperstimülasyon

LH: Luteinize Hormon

MII: Metafaz II

OD: Optik Densite

Ort: Ortalama

OPU: Oosit Pick Up

P: Progesteron

PCO: Polikistik Over

PCOS: Polikistik Over Sendromu

R: Reseptör

R-smad: Reseptörle Düzenlenen Smad

Sc: Side Chain Cleavage

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein

SH: Standart Hata

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

TESE: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu

TGF- β : Transforming Growth Factor β

ÖZET

Foliküler Sıvı GDF9 ve BMP15 düzeylerinin oosit ve embryo kalitesine etkisi

Amaç: Foliküler sıvı GDF-9 ve BMP-15 düzeylerinin oosit ve embryo kalitesi ile ilişkisini araştırmak.

Dizayn: Prospektif çalışma

Kurum: Üçüncü basamak tıp merkezi

Metot: Kontrollü over stimülasyonu uygulanan 97 hastadan folikül sıvısı alındı. Foliküler sıvı GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri western blot yöntemi ile ölçüldü. Foliküler sıvı FSH, östradiol ve progesteron düzeyleri otomatik kemiluminesent enzim immunoassay ile ölçüldü.

Sonuçlar: Toplam 97 hastaya ait oosit ve folikül sıvısı çalışmaya dâhil edildi. GDF9 ve BMP15 propeptit formu tüm örneklerde saptanırken, GDF9 matur formu 88 (%90,7) , BMP15 matur formu ise 58 (%59,8) örnekte mevcuttu GDF9 matur düzeyleri ile oositlerin nükleer maturasyonu arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptandı ($p<0,05$). Yüksek kalitedeki embryolara ait folikül sıvılarında ortalama GDF9 matur seviyesi $4,23\pm 0,37$ iken, düşük kalitedeki embryoların folikül sıvılarında $1,74\pm 0,92$ idi. Fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$) Klinik gebeliği olan olgularda da GDF9 matur düzeyleri anlamlı yüksekti ($p<0,05$). GDF9 ve BMP15 proform düzeyleri ve BMP15 matur düzeyleri ile nükleer maturasyon, fertilizasyon, embryo kalitesi arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı. Foliküler sıvı hormon düzeyleri (FSH, östradiol ve progesteron) ile GDF9 ve BMP15 arasında korrelasyon saptanmadı. Klinik gebelik olan olgularda foliküler FSH düzeyleri anlamlı düşük saptandı ($p<0,05$).

Yorumlar: Foliküler sıvı GDF9 matur düzeyi yüksek olan olgularda nükleer maturasyon, embryo kalitesi ve klinik gebelik oranları fazladır. Buna göre IVF kültür mediumlarına rekombinant GDF9 matur form eklenmesiyle tedavi başarısının arttırılabileceği düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: GDF9, BMP15, oosit kalitesi, embriyo kalitesi, maturasyon, foliküler sıvı, gebelik, in vitro fertilizasyon.

SUMMARY

The value of follicular fluid levels of GDF9 and BMP15 in the prediction of subsequent oocyte and embryo quality

Objective: To evaluate the association of follicular fluid levels of GDF-9 and BMP-15 with subsequent oocyte and embryo quality.

Design: Prospective study

Setting: Tertiary care medical center

Methods: The levels of follicular fluid GDF9 and BMP15 propeptide and mature forms were estimated by western blot analysis. The levels of follicular fluid FSH, estradiol and progesterone were measured with automated chemiluminescent enzyme immunoassays

Results: Ninety seven follicular fluid samples and oocytes were included to this study. The propeptide form of GDF9 and BMP15 were detected in all samples, however the mature forms were evident in 88 (90,7%) and 58 (59,8%) respectively. Mature GDF9 levels were significantly correlated with nuclear maturation of oocytes ($p<0.05$). Mean mature GDF9 level was $4,30\pm 0,56$ in high embryo quality group, and was $1,45\pm 0,81$ in low embryo quality group. The difference was statistically significant ($p<0.05$). Furthermore, mature GDF9 levels were significantly higher in clinical pregnant group ($p<0.05$). Neither propeptide GDF9 nor mature and propeptide BMP15 levels, were statistically significant according to oocyte morphology, fertilization, cleavage and embryo quality evaluation. There was not any correlation between follicular fluid hormone (FSH, estradiol, progesterone) and GDF9, BMP15 levels. Follicular fluid FSH levels were significantly lower in clinical pregnant group ($p<0,05$).

Conclusion(s): Higher mature GDF9 levels were significantly correlated with nuclear maturation, quality of embryos and clinical pregnancy rate. Treatment results may be improved with the usage of recombinant mature GDF9 in IVF culture media

Key words: GDF9, BMP15, oocyte quality, embryo quality, fertilization, follicular fluid, pregnancy, in vitro fertilization.

1. GİRİŞ VE AMAC

İnfertil çiftlerin tedavisinde diğer konvansiyonel tedavi yöntemlerine yanıt alınmadığında yardımcı üreme teknikleri (ART) tercih edilmektedir. Günümüzde halen en sık tercih edilen yardımcı üreme tekniği de in vitro fertilizasyondur (IVF). IVF gonadotropinlerle kontrollü overyen hiperstimülasyon sonrasında oositlerin toplanması, laboratuvar ortamında fertilizasyonu ve oluşan embryoların transservikal olarak uterusu transferini kapsamaktadır (1). Çoğu IVF merkezinde siklus başına gebelik oranını arttırmak amaçlı birden fazla embryo transfer edilmekle beraber bu durum çoğul gebelik gibi komplikasyonları da arttırmaktadır. Bazı ülkelerde transfer edilen embryo sayısına da sınırlamalar getirilmektedir (2). Bu nedenle gelecekte ART'deki gerçek başarı, gebeliği sağlayacak en üst kalitedeki tek embryonun transferi ile sağlanacaktır.

Embryo kalitesini arttırmak da embryoyu oluşturacak en uygun oositlerin belirlenmesi ile mümkündür. Günümüzde oositin gelişimini öngörmeye daha çok tercih edilen morfolojik değerlendirmedir. Fakat bununla ilgili çalışma sonuçlarının çelişkili olması ve bu yöntemin subjektif olması nedeniyle moleküler belirteçlerin kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (3).

Oosit gelişimi ve folikülogenez; hipotalamohipofizer aksın kontrolünde olduğu kadar, lokal faktörlerin de etkisindedir. Over folikülü, oosit ve çevresini saran granuloza ve teka hücrelerinden oluşmaktadır (1). Oositin maturasyonunu başarılı bir şekilde tamamlaması follikülogenez boyunca oosit ile granuloza hücreleri arasında ve granuloza ile teka hücreleri arasındaki çift yönlü ilişkiyi gerektirmektedir (4). Foliküler gelişim üç kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısım primordial folikülden preantral evreye kadar olan aşamadır ve gonadotropinlerden bağımsızdır. İkinci kısım preantral evreden erken antral evreye kadar olan kısımdır. Bu evrede gonadotropinlere yanıt vardır fakat bu faz esas olarak intraoveryen lokal faktörler ile düzenlenmektedir. Üçüncü kısım ise erken antral evreden sonraki dönemi kapsar ve devam etmesi gonadotropinlere bağımlıdır (5).

Transforming growth factor β (TGF- β) ailesi vücutta değişik yerlerde sayısız fizyolojik olayda ekstrasellüler bağlantıda görev alan, farklı grupta proteinler içeren en az 35 üyeden oluşan bir gruptur. Yapılan çalışma sonuçlarına göre bu aileye ait moleküller folikülogenez boyunca folikül gelişiminde rol almaktadır. Bu moleküllerin primordial folikül aktivasyonu, granuloza ve teka hücre proliferasyonu ve atrezisi, steroidegenez, gonadotropin reseptör aktivasyonu, oosit

maturasyonu, ovulasyon, luteinizasyon ve korpus luteum oluşumunda anahtar rollere sahip oldukları gösterilmiştir (6-8). Growth differentiation factor 9 (GDF9) ve bone morphogenetic protein 15 (BMP15) de oosit tarafından salgılandığı gösterilmiş, TGF β ailesine ait iki proteindir. Bu iki parakrin faktör de primer folikül evresinden itibaren salgılanmaktadır ve foliküler gelişim için gereklidirler. GDF9'un preantral folikül aşamasından erken antral foliküler evreye geçişte (2.faz) granuloza hücre apoptozisini ve foliküler atreziyi engellediği saptanmıştır (9). BMP15'in de foliküler gelişim için gerekli granuloza hücre mitozunu ve proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir (10). Çeşitli türlerde etkinlikleri farklı olmakla beraber, GDF9 ve BMP15 homozigot mutasyonu olan koyunların infertil olmaları bazı türlerde fertilité için esansiyel olduklarını da göstermektedir(11). İnsanda ise BMP15 mutasyonu taşıyanlarda hipergonadotropik overyen yetmezlik geliştiği belirlenmiştir (12). Oosit, bu iki parakrin faktörü salgılayarak çevresindeki kumulus hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozisini, metabolizmasını ve ekspansiyonunu düzenlemekte ve kendi mikroçevresini oluşturmaktadır (13). O nedenle bu iki lokal mediator, oosit ve folikülün izleyeceği yolu ve gelişimini belirlemektedir. Bu bulgulara dayanarak GDF-9 ve BMP-15'in oosit ve sonraki embryonun kalitesini de etkileyebileceği düşünülebilir.

Foliküler sıvı oogenez boyunca oositin içinde bulunduğu ortamdır ve oosit gelişiminde önemlidir. Bu sıvı plazma ile oosit ve granuloza-teka hücrelerinin oluşturduğu sekresyondan oluşmaktadır (14). Foliküler sıvı oosit toplama işlemi sırasında oositle beraber aspire edilmektedir. Bu nedenle alınan her bir oosite ait folikül sıvısı ayrı olarak incelenebilmektedir. Foliküler sıvının analizi ile oosit ve çevresindeki hücrelerin moleküler ilişkisi de değerlendirilebilmektedir.

Bu çalışmada amaçlanan foliküler sıvı GDF9 ve BMP15 düzeyleri ile oosit ve embryo kalitesi arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İn Vitro Fertilizasyon

2.1.1. Tanımı ve endikasyonları

Günümüzde infertil hastaların tedavisinde kullanılan yardımcı üreme teknikleri arasında en yaygın olanı in vitro fertilizasyondur (IVF). IVF, ekzojen gonadotropinlerin kullanımıyla overlerin kontrollü hiperstimülasyonu (KOH) sonrasında transvajinal ultrasonografi eşliğinde oositlerin toplanması, labaratuarda fertilizasyonu ve embriyoların transservikal olarak uterusu transferini kapsamaktadır. IVF ile ilk canlı doğum 1978'de gerçekleştirilmiştir. Yıllar içerisinde de yeni uygulamalar ve araştırmalarla sürekli gelişim halindedir (1).

IVF endikasyonları şunlardır (15):

- Tubal faktör
- Ovulatuvar disfonksiyon (diğer tedavilere yanıt olmaması durumunda)
- Over rezervinin azalması
- Endometriyozis (diğer tedavilere yanıt olmaması durumunda)
- Ciddi erkek faktörü
- Over yetmezliği (oosit donasyonu ile)
- Açıklanamayan infertilite (diğer tedavilere yanıt olmaması durumunda)

IVF'in dezavantajları yüksek maliyet, ilaç kullanım riskleri ve çoğul gebelik riskinde artıştır (1). Bu nedenle tubaların açık olması ve ciddi erkek faktörü olmaması durumunda öncelikle alternatif tedaviler denenmektedir.

2.1.2. IVF başarısını etkileyen faktörler

IVF başarısını çeşitli faktörler etkileyebilmekle birlikte, prosedürle ilgili en önemli faktörler toplanabilen oosit sayısı ve labaratuarda oluşturulabilen yüksek kalitedeki embryo sayısıdır. Bu

nedence IVF başarısını en çok belirleyen kadın yaşı ve over rezervidir. Yaşın artmasıyla beraber, overlerin gonadotropinlere yanıtı azalarak daha az sayıda oosit elde edilmektedir ayrıca oosit sayısı yeterli olsa dahi embryo implantasyon oranı genç yaş grubuna göre belirgin azalmaktadır. (16,17). Over rezervini değerlendirmede 3.gün folikül stimulan hormon (FSH) , östradiol (E2) düzeyleri, klomifen sitrat testi, ultrasonografik olarak antral folikül sayısı ve over volümünün ölçümü, eksojen FSH over rezervi testi (EFORT), inhibin B veya antimüllerian hormon düzeyleri gibi testler kullanılabilir. Hiçbir testin diğerine üstünlüğü saptanmamıştır (1,18). Fakat 3.gün serum FSH, östradiol ölçümü ve antral folikül sayısı tayini basitliği ve maliyeti açısından daha uygun görünmektedir (1,19). Erken foliküler fazda yüksek FSH değerlerinin IVF başarısı için kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. FSH konsantrasyonu siklusa siklusa değişebileceği için tek bir ölçüm yeterli görünmemekle birlikte (FSH düşükse), 20 mIU/mL'nin üzerindeki tek bir değer kötü prognoz taşımaktadır (20).

2.1.3. Kontrollü Overyen Hiperstimulasyon

IVF ile ilk canlı doğum spontan ovulatuvar siklus sonrası tek oosit elde edilmesi ve tek embryo transferi sonucu elde edilmiştir (21). Fakat bu metodun kullanımı ile başarı oranları düşük bulunmuş ve çoğu araştırmacı overyen stimulasyon rejimleri ile pek çok folikülün senkronize gelişimine yönelmiştir (22). Bunun sonucunda pek çok matür oosit elde edilerek fertilizasyon sağlanmıştır. Aynı anda pek çok embryonun transferi ile de canlı doğum ihtimali artırılmıştır (23). Multipl foliküler gelişim klomifen sitrat gibi selektif östrojen reseptör modülatörleri ile sağlanabilirse de çoğu programda günlük eksojen FSH enjeksiyonu kullanılmaktadır. Erken luteinize hormon (LH) pikini engellemek için de bir gonadotropin releasing hormon (GnRH) analogu kullanılmaktadır. Foliküllerin matür olduğu düşünüldüğünde ise LH yerine human koryonik gonadotropin (hCG) uygulanmaktadır.

Uzun protokollerde IVF siklusundan bir önceki menstrüel siklusa tedaviye başlanmakta ve GnRH agonist kullanılmaktadır. Kısa protokollerde ise tedaviye IVF siklusunda başlanmaktadır ve GnRH agonist veya antagonisti tercih edilmektedir (1). Klasik bir GnRH agonist uzun protokolünde pitüiter down-regulasyon sağlanana dek yaklaşık iki haftalık GnRH agonisti günlük uygulanmaktadır. Kohorttaki tüm overyen foliküllerin tam maturasyonu sağlanmadan LH pikinin engellenmesi için pitüiter baskılama çok önemlidir. Stimulasyona başlandığında ise genel olarak

human menopozal gonadotropini (hMG) veya FSH 150-450 IU/gün dozda intramuskuler ya da subkutan olarak uygulanır ve GnRH agoniste dozu azaltılarak devam edilir. Gonadotropin dozuna ise transvajinal ultrasonografide değerlendirilen foliküler gelişime ve serum östradiol düzeylerine göre karar verilir. Step-down protokolde gonadotropine yüksek dozdan başlanıp yanıtı göre doz basamaklı azaltılır. Step-up protokolde ise gonadotropine düşük dozdan başlanıp yanıtı göre doz basamaklı arttırılır. Eğer günlük GnRH antagonist uygulanacaksa, uygulamaya IVF siklusunda foliküller yeterli büyüklüğe ulaştığında (genelde en büyük folikül çapı ≥ 14 mm olduğunda) başlanır. Günlük antagonist uygulamasına da hCG uygulamasına kadar devam edilir (14).

GnRH antagonistleri, daha hızlı pitüiter desentisizasyon sağlamakta ve antagonist kullanımıyla ciddi overyen hiperstimulasyon riski de azalmaktadır (24). Şu anki mevcut verilere göre agonist kullanılan uzun protokoller antagonist kullanılanlara göre daha başarılı görünse de uygun karşılaştırma yapabilmek için optimum antagonist protokolleri belirlenmelidir (25). Gonadotropin olarak rekombinant FSH ile hMG kullanım etkinliğini karşılaştıran bir metaanalizde hMG kullanımıyla canlı doğum oranında artış saptanmış olsa da hasta seçimi ve daha pek çok faktörün IVF sonucunu etkileyebilmesi nedeniyle bu durum da tartışmalıdır (26). Rekombinant ya da uriner hCG kullanımı arasında ise klinik sonuçlarda farklılık gözlenmemiştir (27). Overyen foliküllerin matür olduğuna karar verildiğinde (transvajinal ultrasonografide çapı 18 mm ve üzerinde iki veya daha fazla folikül saptandığında ve/veya dominant folikül başına 200 pg/mL östradiol seviyesi olduğunda), hCG (250 mcg recombinant formu ya da 5000/10000 unite üriner hCG) uygulanır.

2.1.4. Folikül Aspirasyonu ve Fertilizasyon

HCG uygulamasının 36. saatinde oositler transvajinal ultrasonografi eşliğinde folikül aspirasyonu yöntemiyle toplanmaktadır. Analjezi/anestezi eşliğinde (sedasyon altında paraservikal blok veya spinal anestezi de tercih edilebilir) ultrasonografik gözlemlerle her bir foliküle iğne ile girilerek foliküler içerik aspire edilir. Toplanan oositlerin maturasyonu mikroskop ile değerlendirildikten sonra klasik IVF uygulanacak ise kumulus hücreleri mekanik olarak gevşetilir ardından uygun bir inkübasyon medyumuna aktarılarak %5-6 CO₂-li inkübatörde ortalama 3 saat inkübe edilir. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulanacaksa matür oositlerin, kumulus korona ve oosit kompleksi, enzimatik (hyaluronidaz ile) ve mekanik olarak denüedildikten sonra iki saat

inkübe edilir. İnseminasyondan bir-iki saat önce hastanın eşinden sperm örneği alınır. Elde edilen motil spermler yıkandıktan sonra yoğunlaşma ve motilite tekrar değerlendirilerek 37 derecede %5 CO₂'li inkübatörde 30 dakika bekletilir. Fertilizasyonun sağlanması için toplanan oositler kültür medyumunda hazırlanmış spermler ile bekletilir. Fakat ciddi erkek faktörü varsa, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulanır. Erkek faktör olmayan olgularda ICSI'nın konvansiyonel IVF'e üstünlüğü saptanmamıştır (28). O nedenle erkek faktörü olmayan olgularda IVF tercih edilmektedir.

2.1.5. Embryo kültürü ve Transfer

Fertilizasyon klasik IVF'de inseminasyondan 16–18 saat; ICSI'de ise 14–16 saat sonra iki adet pronükleus oluşumu ile tespit edilir (Şekil-1). Fertilize olmuş oositler uygun kültür ortamlarına aktarılarak takip edilir. Embryonun her bir hücresi (blastomerler) her 12-14 saatte bir bölünürler (Şekil-2). Böylece oosit toplanmasından 72 saat sonra embryo yaklaşık 8 hücreye ulaşır. 2 ve 4. günler arasındaki embryolar klivaj evresindeki embriyolar olarak isimlendirilir. Oosit toplanmasından yaklaşık 5 gün sonra blastokist evresine ulaşılır. 7. Günde ise implantasyon gerçekleşmiş olmalıdır. Bu nedenle bu süreden önce embriyolar transfer edilmelidir. Fertilizasyon sonrası embriyolar kültürde çeşitli sürelerde saklanabilmektedir. Fakat çoğunlukla tercih edilen, oosit toplanmasından sonraki ilk 72 saat içinde embriyoların uterusu transferidir. Embryo transferi ultrason eşliğinde transervikal olarak yapılmaktadır (1). Transfer edilecek embryo sayısına; maternal yaş, embryo kalitesi, hastanın kaçınıcı denemesi olduğu ve kriyoprezervasyon şansı gibi faktörlere göre karar verilir. Transfer sonrası da endometrial reseptiviteyi arttırmak amaçlı luteal faz boyunca hastalara progesteron desteği verilmektedir (29).



Şekil 1: Fertilize olmuş oosit ve 2 adet pronükleus



Şekil 2: İki hücreli embryo

2.2. Foliküler Gelişim

Overin reproduktif fizyolojideki fonksiyonu; oosit gelişimi ve steroidegenesidir. Foliküller overdeki fonksiyonel birimlerdir ve her bir folikül bir oosit ve çevresini saran bir veya daha fazla somatik hücre tabakasından oluşur. Foliküller steroidejenik ve ovulatuvar potansiyellerini elde edebilmek için çeşitli gelişimsel basamaklardan geçer. Fetal overde 20. haftada yaklaşık 20 milyon primordial folikül bulunur. Fakat bunların çoğu pre veya postnatal dönemde dejenere olur (4). Bir menstrüel döngünün ortalama süresi 28 gündür. Primordial folikülden preovulatuvar folikül aşamasına kadar olan gelişim süreci ise yaklaşık 85 gün sürmektedir (30). Foliküler gelişimin tamamlanması ve ovulasyonun gerçekleşmesi için hipofiz ön lobundan salınan gonadotropin hormonlara (FSH ve LH) ihtiyaç vardır. Foliküler gelişimin ilk bulgusu primordial folikül içindeki primer oosit boyutlarının artmasıdır. Ayrıca folikül çevresindeki granuloza hücreleri küboidal hale gelir. Granuloza hücreleri ve oositler arasında bağlantı yolları (gap-junction) oluşur. Granuloza hücreleri ile oosit arasındaki besin alışverişi, büyüme faktörleri

transferi, metabolitlerin uzaklaştırılması, bu bağlantı yolları aracılığı ile sağlanır. FSH uyarısı ile primordial folikül çevresindeki granuloza hücreleri bir bazal membranda çoğalmaya başlar ve primer folikül oluşur. Folikül çevresindeki teka hücreleri farklılaşmaya başlar (31). Foliküller gelişim devam ettikçe oosit çevresindeki granuloza hücreleri çok katlı hale gelir. Stromadaki tekal hücreler folikül çevresine doğru yaklaşır. Granuloza hücre bazal membranına yakın olan teka hücreleri teka interna, daha uzakta olanlar teka eksterna olarak adlandırılır. Bu yapıya preantral folikül denir. Preantral folikülde steroideenez başlar. Preantral folikülde farklı hücrelerde farklı gonadotropin reseptörleri bulunur. Teka hücreleri LH reseptörü, granuloza hücreleri ise FSH reseptörü taşımaktadır. LH; teka hücrelerindeki membran reseptörüne bağlandığında, hücrede kolesterolden androstenedion ve testosterona kadar olan steroidegenezi uyarır. Teka hücrelerindeki androstenedion ve testosteron granuloza hücrelerine aktarılır. Preantral foliküldeki granuloza hücreleri teka hücrelerinden gelen androjenleri aromataz enzimi ile östrojenlere çevirir. Folikülde üretilen östrojen, FSH ile sinerjistik olarak granuloza hücre proliferasyonunu ve hücre üzerindeki FSH reseptör sayısını artırır. Folikül gelişimine devam ettikçe önce granuloza hücreleri arasındaki boşlukta sıvı birikimi gözlenir. Daha sonra bu küçük boşluklar birleşerek antruma dönüşür ve antral folikül oluşur. Granuloza hücrelerinden salınan inhibin-B foliküller fazda FSH etkisi ile üretilmektedir. İnhibin-A ise luteal fazda LH etkisi ile salınır. Her iki inhibin formu FSH üretimini ve salınımını inhibe eder. Folikül geliştikçe östrojen ve inhibin-B üretimi artar. Üretilen bu iki hormon negatif feed-back ile hipofizer gonadotropilerden FSH üretimini azaltır. Overde gelişmekte olan antral foliküllerden FSH reseptörü fazla olan, ortamda azalan FSH'ı diğerlerine göre daha fazla bağlar ve gelişimine devam eder. Bu folikül dominant folikül olarak adlandırılır. Diğer foliküller ise atreziye uğrarlar. Dominant folikül gelişimine devam ederken boyutları ve folikül sıvısı artar. Primer oosit çevresindeki özelleşmiş granuloza hücrelerinden oluşan yapıya ise kumulus ooforus denir. Folikül geliştikçe üretilen östrojen granuloza hücrelerinde LH reseptörleri belirmesine neden olur. LH etkisi ile bu hücrelerde yağ birikimi başlar. Bu değişime luteinizasyon denir. LH'nin yükselmeye başlamasından 36 saat sonra folikül sıvısında oluşan plazminin etkisi ile kollejenaz aktive olur ve folikül duvarında rüptür ve ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyondan sonra geriye kalan foliküller yapı ise korpus luteum olarak adlandırılır (15).

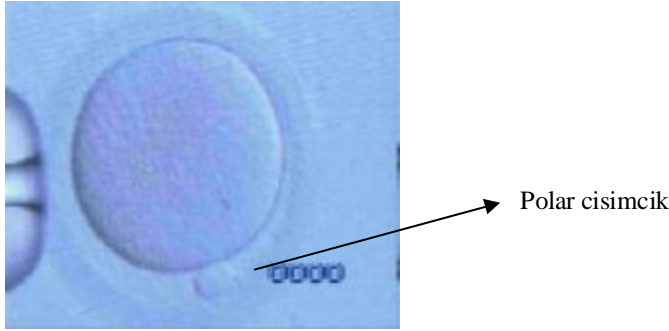
2.3. Oosit maturasyonu

Oosit; yapısal ve fonksiyonel özellikleri ile kadın vücudunda mayoz bölünmeye giden ve diploid durumdan haploid hale geçen tek hücredir. Oosit maturasyonu aslında mayozun ilerlemesidir. Basit olarak tanımlanırsa ilk mayoz bölünmenin tekrar başlayarak metafaz II evresine geçiş ve buna eşlik eden sitoplazmik değişikliklerin tamamıdır. Buna göre oosit maturasyonu hem nükleer ve hem de sitoplazmik maturasyonu kapsamaktadır. Nükleer maturasyon mayoz boyunca nükleer içerikte meydana gelen değişiklikleri içermektedir. Doğumda tüm oositler mayoz I'in profazında diploten evresinde duraklamış haldedir. Bu evrede nükleer zarf ve germinal vezikül bozulmamış durumdadır. Ovulasyon öncesi gonadotropin piki ile birlikte oosit bu sakin evreyi tamamlar ve germinal vezikül bozulur. Homolog kromozomların eşleşmesi ve rekombinasyonu ile ilk mayoz bölünmenin profaz evresi tamamlanır. Homolog kromozomlar daha sonra kondense olarak mayotik spindile oluşur ve homolog kromozom çiftleri metafaz plağında aynı hizada eşleşirler. Metafaz I'in tamamlanmasıyla homolog kromozomlar ayrılırlar. Sitoplazma orantısız olarak bölünür ve ilk polar cisimcik atılır. Son olarak oosit mayoz II'nin metafaz II evresinde fertilizasyona kadar duraklar. Nükleer maturasyon evreleri özet olarak şu altı basamaktan oluşur: 1) Mayozun tekrar başlaması/ germinal vezikülün bozulması 2) Kromatin kondensasyonu 3) Mayotik spindile oluşumu 4) Homolog kromozomların ayrılması 5) Sitoplazma bölünmesi ile ilk polar cisimciğin atılması 6) Mayozun tekrar duraklaması

Sitoplazmik maturasyon nükleer maturasyon kadar açık tanımlanmamıştır fakat fertilizasyonda nükleer maturasyon kadar önemlidir. Organellerin yeniden yerleşmesi ve sentezini, mRNA ve proteinlerin modifikasyonunu ve depolanmasını, başarılı bir fertilizasyon için gerekli moleküllerin ve çeşitli biyokimyasal yolların uygun zamanlı reaktivasyonunu içermektedir. Nükleer ve sitoplazmik maturasyon koordinasyon halindedir. Örneğin germinal vezikül bozulması ile nükleer içerik sitoplazmaya salınmakta ve bu şüphesiz sitoplazmik maturasyonu etkilemektedir. Fakat nükleer maturasyon sitoplazmik maturasyonu etkileyebilse de çeşitli açılardan sitoplazmik maturasyon bağımsızdır. Bu nedenle, oositin nükleer maturasyonunu tamamlaması, fertilizasyon ve embriyonik gelişim için gerekli sitoplazmik maturasyonunu tamamladığını göstermemektedir (32).

2.4. Oosit ve embryo kalitesi

Embriyonun yeterliliği öncelikle onu oluşturan gametlerin kalitesine bağlıdır. Bu nedenle oositin morfolojik görüntüsü oluşacak embriyonun potansiyeli ile ilişkilidir. Özellikle ICSI öncesinde oositlerin morfolojik olarak değerlendirilmesi ile daha iyi kalitede ve daha yüksek potansiyeli olan oositler kullanılarak tedavi başarısı artırılabilir (33). Standart IVF öncesi oosit morfolojisini değerlendirmek kumulus ve korona hücreleri nedeniyle zordur. Ayrıca bu hücrelerin dağılım derecesi ve kalitesi oosit kalitesinin belirlenmesinde çok iyi belirteç değildir (34). Kumulus-korona hücre tabakasının kaldırılması ve ilk polar cisimciğin gözlenmesiyle oositlerin nukleer maturitesi değerlendirilebilir (Şekil-3).

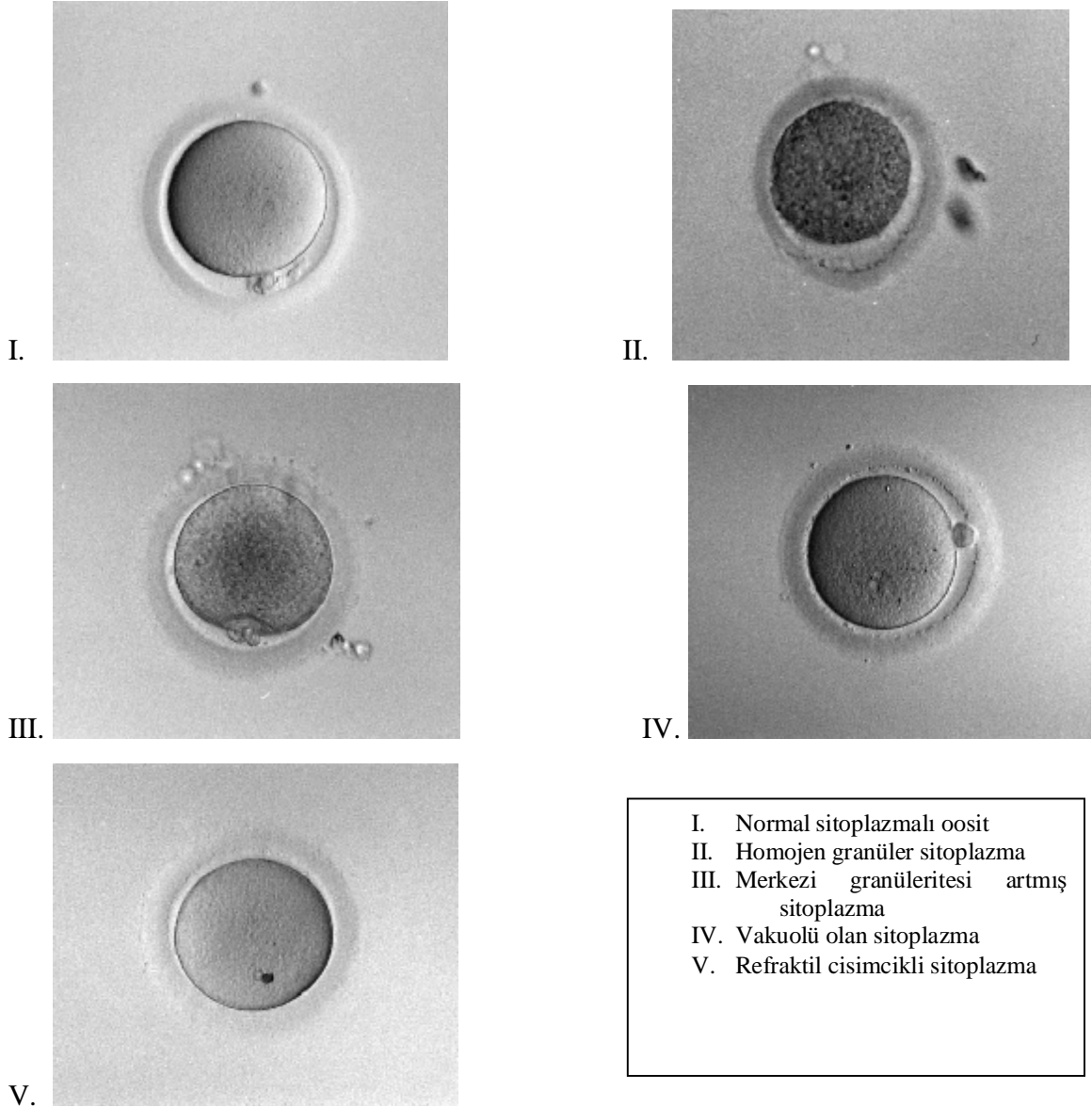


Şekil-3: Nükleer maturasyonunu tamamlamış oosit. Polar cisimcik izlenmektedir.

Fakat sadece nükleer maturasyon, oosit yeterliliğini değerlendirmede yeterli değildir. Fertilizasyon için uygun optimal hücresel koşulları saptamada, nükleer ve sitoplazmik maturasyon birlikte değerlendirilmelidir. Bunların asenkronizasyonu veya bozukluğu farklı oosit anomalilerine neden olur (33). Fakat anormal oosit morfolojisi ile fertilizasyon oranları ve embryo gelişimi arasındaki ilişki de netlik kazanmamıştır (35,36). Denuasyon sonrası oosit morfolojisini değerlendirmede sitoplazma ve zona pellucida, ilk polar cisimcik ve perivitellin aralık gibi ekstrasitoplazmik yapılar değerlendirilir. Klasik olarak normal bir metafaz II oositin normal morfolojik özellikleri şunları içermektedir:

Ekstrasitoplazmik değerlendirme: Düzgün şekil, fragmente olmayan normal görünümlü ilk polar cisimcik, yuvarlak belirgin düzgün bir zona pellucida, küçük perivitellin aralık

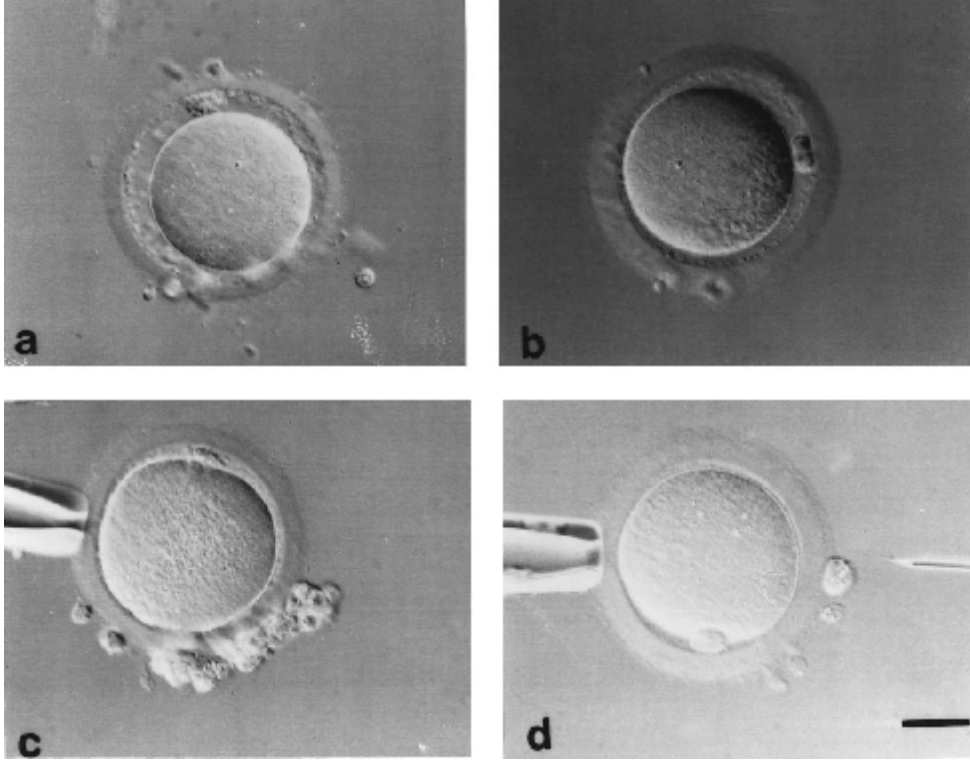
Sitoplazmik değerlendirme: Soluk, orta derecede granüler yapıda, inklüzyon yok, vakuol yok, düz endoplazmik retikulum kümeleri yok, refraktil cisimcik yok (37) (Şekil-4).



Sekil-4: Sitoplazmik yapılarına göre oositler (38) (Human Reproduction 1997; 12:1267-1270)

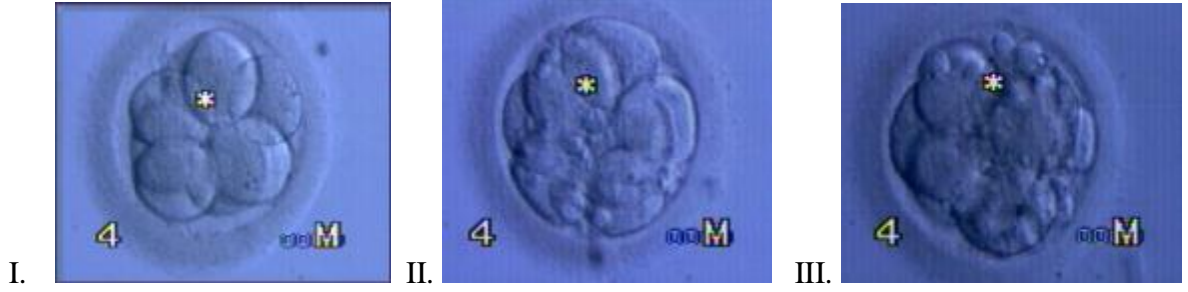
Xia'nın oosit morfolojik derecelendirme sistemi şekil 5'te gösterilmiştir (36).

Rienzi ve ark. yaptıkları çalışmada yeni bir metafaz II oosit morfolojik skorlama sistemi (MOMS) geliştirmişlerdir. Sonuçlarına göre; ekstrasitoplazmik değerlendirmede anormal ilk polar cisimcik, geniş perivitellin aralık olması ve sitoplazmik değerlendirmede granüleritede artış, merkezde granüler alan ve vakuol olması oositin fertilizasyon, klivaj kapasitesini ve klinik sonuçları olumsuz yönde etkilemektedir (33)



Sekil-5 (a) Grade I, fragmante ilk polar cisimcik ve geniş perivitellin aralık; (b) Grade II, Normal ilk polar cisimcik ve geniş perivitellin aralık; (c) Grade III, fragmante ilk polar cisimcik ve normal perivitellin aralık (d) Grade IV, normal ilk polar cisimcik ve normal perivitellin aralık (36) (Human Reproduction 1997; 12:1750-1755)

Fertilizasyon sonrası embryolar çeşitli aşamalarda değerlendirilebilmektedir: 1.gün pronükleer morfoloji, erken klivaj, 2.gün değerlendirme, 3. gün değerlendirme ve son olarak blastokist değerlendirmesi. Kullanılan tüm metotlar gebelikle korelasyon göstermiştir (35). Veek'in sık kullanılan embryo skorumlama sistemi şu şekildedir: Grade 1, doğru ve eşit büyüklükte hücreler, fragmentasyon yok, çok çekirdeklik yok; Grade 2, doğru ve eşit büyüklükte hücreler, %0-25 fragmentasyon var; Grade 3, hücreler eşit büyüklükte değil ve %25-50 fragmentasyon ; Grade 4, hücreler eşit büyüklükte veya değil ancak >%50 fragmentasyon var (Şekil-6) (40).

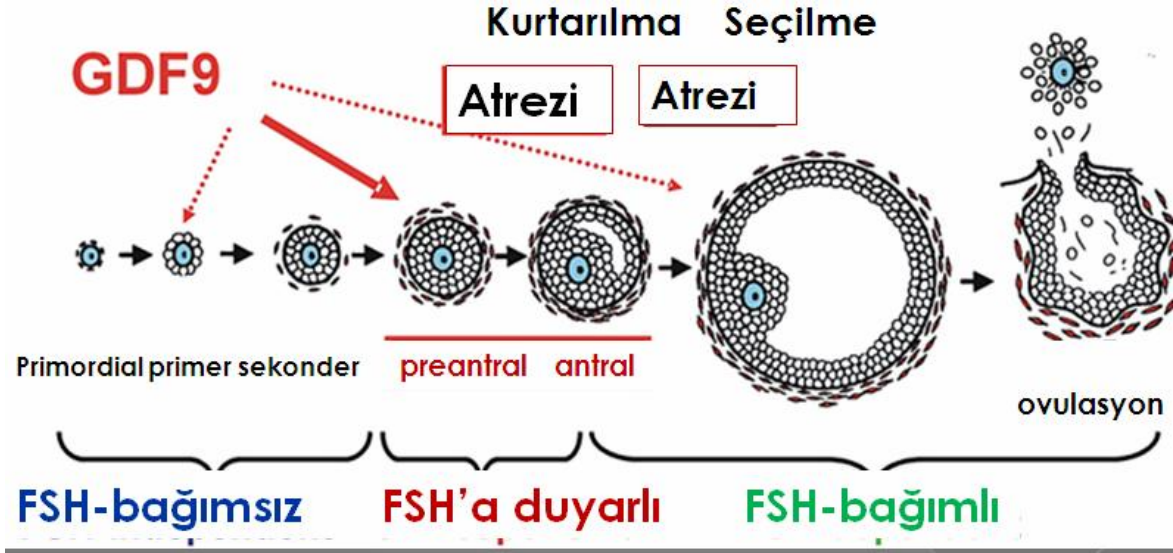


Şekil-6: I. 8 hücreli G1 embryo, II. 8 hücreli G2 embryo, III. 8 hücreli G3 embryo

2.5. Foliküler gelişim ve TGF- β ailesi ilişkisi

Over folikülü, over fonksiyonunu sağlayan temel parçadır ve her bir folikül bir oosit ve çevresini saran granuloza ve teka hücrelerinden oluşmaktadır. Foliküler gelişim üç faza ayrılabilir: 1) Primordial, primer ve sekonder evreleri içeren gonadotropinden bağımsız gelişim fazı, 2) Preantral evreden erken antral evreye geçişi içeren gonadotropine yanıt veren faz, 3) Erken antral evre sonrası gonadotropin bağımlı faz. Bu en son fazda folikül kurtarılması, seçimi ve ovulasyon olmaktadır (5) (Şekil-7). Folikül gelişiminin başarılı bir şekilde devam etmesi follikülogenez boyunca oosit-granuloza hücreleri arasında ve granuloza-teka hücreleri arasındaki çift yönlü ilişkiyi gerektirir (4). Özellikle preantraldan erken antral evreye geçiş (2. faz) intraovaryen düzenleyiciler ile düzenlenmektedir ve bu evrede gonadotropine ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu diyalogda TGF- β ailesine ait pek çok ekstrasellüler sinyal molekülü görev almaktadır. Folikül gelişiminin daha sonraki aşamaları (folikül seçimi dahil) ise uygun zamanlamalı endokrin sinyaller, pitüiter gonadotropinler ve metabolik hormonlara bağlıdır.

TGF- β ailesi yapısal olarak korunmuş fakat fonksiyonel olarak farklı grupta proteinler içeren en az 35 üyeden oluşur. Vücutta değişik yerlerde sayısız fizyolojik olayda ekstrasellüler bağlantıda görev alırlar. Matür biyoaktif halleri homo veya heterodimer olabilir. Bu dimerler çoğunlukla sistein kalıntılarının oluşturduğu kovalent bağlarla oluşur. Yapısal özelliklerine göre çeşitli alt gruplara ayrılırlar. Bunlar TGF- β alt ailesi (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), bone morphogenetic protein (BMP) ailesi (yaklaşık 20 üye içerir), growth and differentiation factor (GDF) alt ailesi (en az 9 üye içerir), aktivin/inhibin alt ailesi (aktivin A, AB, B, inhibin A,B), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) alt ailesi (GDNF, artemin ve neutrin), anti- müllerian hormon (AMH) ve nodal'dır (6).



Sekil-7: Foliküler gelişimin gonadotropin bağımlı ve bağımsız evreleri (41)
(Frontiers in Bioscience 2007; 12: 3628-3639)

Çoğu TGF- β üyesi (GDNF ve inhibin hariç), hedef hücre üzerindeki etkilerini 2 tip serin/threonin kinaz reseptörüne bağlandıktan sonra heterotetramerik kompleks oluşturarak yaparlar. Memelilerde TGF- β sinyal iletiminde 7 tane bilinen tip I ve tip II reseptör vardır. TGF- β ailesi tip I ve tip II reseptörün bir veya daha fazlasının kombinasyonlarının ekstrasellüler parçasına bağlanarak aktif sinyal kompleksini oluşturur. Reseptör aktive olduktan sonra reseptörün intrasellüler kinaz parçasının fosforilasyonu gerçekleşir. Fosforile olmuş aktif reseptör de reseptörle düzenlenen smadlar (R-smadlar) olarak adlandırılan sinyal iletim moleküllerinin fosforilasyonunu sağlar. Bunlar genel ortak smad ile bağlantıya geçerler. Bu smad ise çekirdeğe gider ve çeşitli transkripsiyon faktörleri, koaktivatörler ve koekspresörlerle etkileşime girerek hedef gen ekspresyonunu değiştirir (7).

Çeşitli memeli türlerinde yapılan çalışmalarda foliküler gelişimde basamaklara göre oositlerde ve overyen somatik hücrelerde, çeşitli sayıda ligand, reseptör, sinyal aracıları ve bağlanma proteinlerinin ekspresyonu gösterilmiştir. Deneysel kanıtlara göre bu aile, primordial folikül aktivasyonu, granuloza ve teka hücre proliferasyonu ve atrezisi, steroidegenез, gonadotropin reseptör aktivasyonu, oosit maturasyonu, ovulasyon, luteinizasyon ve korpus luteum oluşumunda anahtar rollere sahiptir (6-8).

Çoğu memelide over rezervi doğumdan önce oluşur. Dinlenme halindeki primordial foliküllerin aktivasyonu fetal hayatta başlar ve over rezervi bitene kadar folikülogenez devam eder.

Duraklamış folikülleri tekrar uyaran kesin mekanizmalar bilinmese de foliküllerin gelişim havuzuna katılma hızı, over rezervi büyüklüğü ile doğru orantılıdır (42).

Kesin kanıtlara göre oosit ve çevresindeki granuloza hücreleri arasında ve granuloza-teka hücreleri arasındaki iki yönlü haberleşme folikül aktivasyonu ve gelişimi için zorunludur (4, 43).

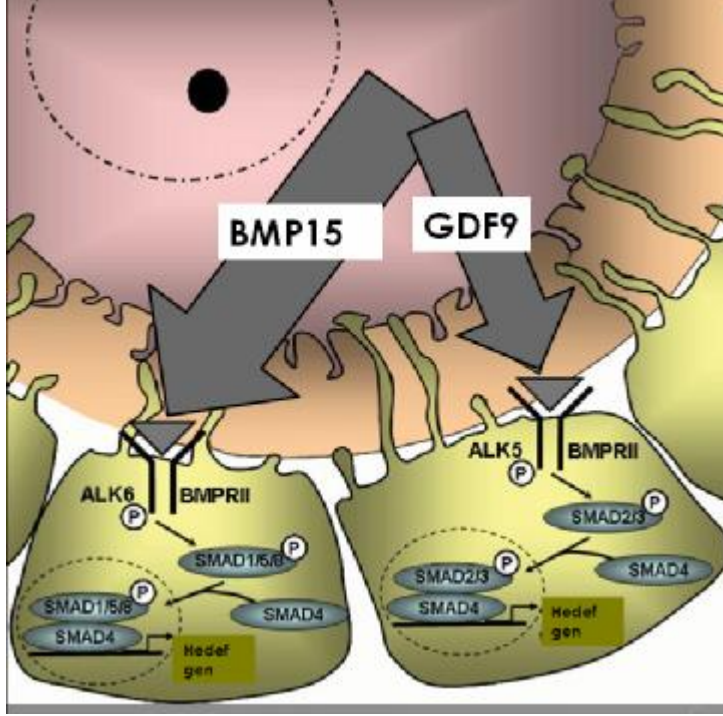
2.6. BMP-15 ve GDF-9

Folikülogenez boyunca; oosit granuloza hücrelerinden nutrisyonel destek ve regülatuar sinyalleri alması yanında, kendisi de mikro çevresini ve gelişimsel kapasitesini artırıcı parakrin faktörler salgılamaktadır. Çoğu türde oositte GDF9 ve BMP15 (GDF 9B olarak da bilinmektedir.)'in haberci ribonükleik asit(mRNA) ve proteini saptanmıştır. Bu nedenle öncelikle bu proteinlerin oositten salınan parakrin faktörler oldukları ve folikülogenez boyunca oosit granuloza hücre etkileşiminde ve dolayısıyla oosit gelişiminde çok önemli oldukları düşünülmektedir.

Bu iki protein de TGF β ailesindedir. Pre-protein olarak sentezlenirler. Pre-protein formları bir sinyal peptidi, bir proform ve bir matur formdan oluşmaktadır (44, 45). Sinyal peptidin kaldırılmasıyla proprotein proteolitik klivaja uğrayarak proform ve matur form oluşur. Bu iki proteinde de diğer TGF- β ailesi üyelerinde bulunan sistein kalıntısı yerine serin kalıntısı bulunmaktadır. Diğer TGF- β üyeleri bu sistein kalıntısı üzerinden kovalent bağlarla aynı proteinin kendisiyle bağlanması sonucu homodimerler ya da farklı proteinlerin kovalent bağlarıyla heterodimerler oluştururlar (46). GDF9 ve BMP15 ise serin kalıntısı üzerinden non-kovalent bağlarla salgılandıkları ortamda homodimer veya birbirleriyle heterodimer yapılar oluştururlar (47). Yani salgılandıkları ortamda hem kendi başlarına hem de bileşik halde bulunabilirler (44, 45).

GDF9, ALK5 (TGF β RI) ve BMPRII reseptörleri üzerinden ve sonra smad 2 ve 3 yolundan, BMP15 ise ALK6 (BMPRII) ve BMPRII reseptörleri üzerinden ve sonra smad 1, 5, 8 yolundan etki göstermektedir (13) (Şekil 8). Koyun overlerinde preantral foliküllerde, oositlerde ve granuloza hücrelerinde BMPRII ve BMPRII reseptörlerinin protein ve mRNA'larının bulunması, GDF9 ve BMP15'in hem oosit hem de granuloza hücre fonksiyonlarını düzenlediğini göstermektedir (48). Teka hücrelerinde sadece BMPRII mRNA'sının gözlenmesi, BMPRII ve BMPRII proteinlerinin zayıf sinyalinin saptanması ise GDF9 ve BMP15'in teka hücre fonksiyonlarını da düzenlediğini göstermektedir (49). Halbuki farelerde BMPRII ekspresyonu

sadece granuloza hücrelerinde saptanırken, BMPRIIB ekspresyonunun oosit, granuloza ve teka hücrelerinde gözlenmesi GDF9 ve BMP15'in türler arasında farklı etkilerinin olduğunu düşündürmektedir (50).



Sekil-8: BMP15 ve GDF9'un granuloza hücre reseptör ilişkisi (ALK: activin receptor like kinase, SMAD: hücre içi sinyal iletim molekülü, BMPRII: bone morphogenetic protein reseptör tip II) (13). (Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum Reprod Update 2008; 14: 159-177.)

Bazı türlerde bu iki büyüme faktörünün ilk ekspresyonu primordial foliküllerde saptanmış olsa da insanda ilk olarak primer folikül evresinde görülürler. Koyunda GDF9'un primordial folikül evresinden önce da saptanması ve hamster overlerinin perinatal incelenmesi sırasında GDF9 koyulan ortamda folikül içinde oosit sayısının artması bu proteinin bazı türlerde primordial folikül gelişiminde de etkili olabileceğini göstermektedir. (51).

İn vitro çalışmalarda bu iki proteinin granuloza ve teka hücre fonksiyonlarını düzenlediği gösterilmiştir. Türler arası bulgular çelişkili olsa da genel olarak mitojenik etkide oldukları saptanmıştır. Bu etkiyi ise, stem cell factor (SCF) ekspresyonunu uyararak sağlamaktadırlar(52). Genel olarak GDF9 ve BMP 15'in ikisi de granuloza hücrelerinden gonadotropinle uyarılan progesteron üretimini inhibe ederler. GDF9 hCG'nin bağlanmasını engeller ve LH-R mRNA

ekspresyonunu baskılar. BMP15 ise FSH-R mRNA ekspresyonunu baskılayarak LH-R mRNA ekspresyonunu baskılamış olur. BMP15, FSH ile uyarılan progesteron sentezini östradiol sekresyonunu etkilemeden inhibe eder. GDF9 ise, granuloza hücrelerinde P450 aromataz mRNA ekspresyonunu baskıladığı için östradiol sekresyonunu da etkilemektedir. Sonuç olarak GDF9 ve BMP15'in granuloza hücrelerindeki gonadotropin bağımlı steroid sentezini inhibe ederek farklılaşmayı kontrol ettikleri söylenebilir. GDF9'un teka hücre fonksiyonları üzerindeki etkileri (steroidogenez inhibisyon ya da aktivasyonu) ile ilgili ise çelişkili sonuçlar vardır (53,54). Preantral-erken antral foliküler gelişim(2.faz) aşamasında GDF9 teka hücre farklılaşmasında rol alır. Preantralden erken antral foliküle geçiş aşaması foliküler atreziye en duyarlı aşamadır. Bu aşamada GDF9 granuloza hücre apoptozisini de engelleyerek folikülün kurtarılmasını ve gelişimini sağlamaktadır (5,41) (Şekil-7).

Bu büyüme faktörlerinin ikisi de folikülogenez boyunca salınmakta ve birbirleriyle etkileşim halinde bulunmaktadır. GDF9 ve BMP15'in birlikte olan etkilerinin ayrı ayrı etkilerinin toplamından fazla olması da birbirlerinin etkinliğini arttırdıklarını göstermektedir (55). Genel bakıldığında ikisinin de hücre proliferasyonunu uyardığı ve gonadotropinle uyarılan farklılaşmayı düzenledikleri düşünülmektedir (51).

İn vivo etkilerine bakıldığında ise fonksiyonel GDF9'u olmayan farelerin infertil olduğu ve foliküler gelişimin primer evrede kaldığı saptanmıştır (56). Bu farelerde plazma FSH ve LH seviyesinin yüksek olduğu, over kistlerinin mevcut olduğu ve çeşitli proteinleri kodlayan mRNA'larda bozulmuş ekspresyon olduğu gözlenmiştir. Stem cell factor ekspresyonunda artış, aromataz, aktivinβ B, follistatin ve siklooksigenaz-2 ekspresyonunda ise azalma saptanmıştır (56, 57). Bu mRNA ekspresyon bozuklukları erken foliküler gelişimde bir blokaja neden olmakta ve matür foliküllerin yokluğu ile sonuçlanmaktadır. Hemen başlangıç sonrası foliküler gelişimdeki durma oositin devam eden büyümesine neden olmaktadır. Fakat eşlik eden granuloza hücre artışı olmamakta ve oositte yapısal bozukluk ve dejenerasyon gerçekleşmektedir. GDF9'un olmaması sonucu oositte önemli bir parakrin feedback sistemin kaybolduğu ve anterior hipofiz ile normal endokrin ilişkinin bozulduğu düşünülmektedir (51). GDF9'u inaktive eden mutasyonun homozigot taşıyıcı koyunları da infertildir ve primer overyen yetmezlik gelişir (58). GDF9 heterozigot mutasyonlu farelerin normal farelerden bir farkı yok iken heterozigot mutasyonlu koyunlarda ovulasyon oranlarında artış saptanmış olması ise bazı türlerde bu proteinin ovulasyon

hızını da kontrol ettiğini de göstermektedir (56, 58). Polikistik over sendromunda da küçük gelişen antral foliküllerde GDF9 ekspresyonunun baskılandığı saptanmıştır (59).

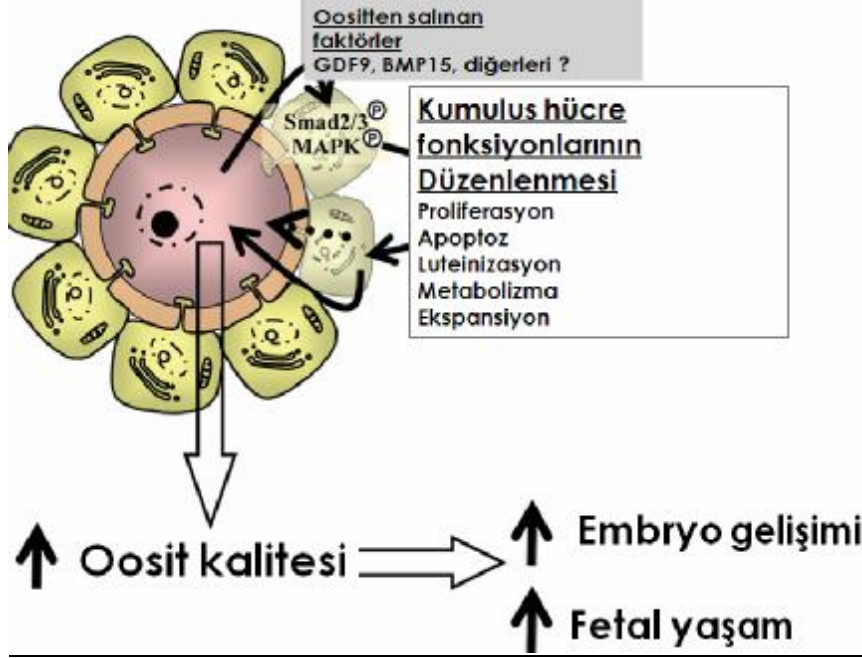
Yakın zamanda hipergonadotropik overyen yetmezliği olan olgularda ise BMP15'te mutasyon saptanmıştır (12). Fonksiyonel BMP15 geni olmayan farelerde normal foliküler gelişim olsa da, ovulasyon ve fertilizasyon bozulmakta ve fertilitate azalmaktadır (60). Fonksiyonel BMP15 geni olmayan koyunlarda ise primordial folikül popülasyonu normal olsa da streak overler olmakta ve primer overyen yetmezlik gelişmektedir. Bu koyunlarda foliküler gelişimin primer evresi durmaktadır (58). BMP15 heterozigot mutasyonlu farelerin ise normal farelerden farkı yoktur (60). Fakat koyunlarda heterozigot mutasyonlarda ovulasyon hızında, çoğul gebelik oranlarında artma da saptanmıştır (51,58). Bu koyunlarda intrafoliküler BMP15 seviyeleri azalmakta ve folikülün FSH'a yanıtı artmaktadır. Granuloza hücre popülasyonu azalmakta ve ovulasyon daha küçük folikülerden gerçekleşebilmektedir. Buna göre oosit kaynaklı BMP15'in biyoyararlanımının düzenlenmesi ile hipotalamopitüiter ovaryen aksta endokrin değişiklikler yapmadan ovulasyon oranları da değiştirilebilecektir. Koyunlarda bu etki immunizasyon çalışmalarıyla sağlanmıştır (61). Fakat farelerde yapılan çalışmalarda ovulasyon hızı ve yavru sayısında farklılık saptanmamıştır. BMP15 ve GDF9 mutasyonu (her ikisi de) heterozigot taşıyıcı farelerde sadece yavrular daha küçüktür ve yavru sayısı daha azdır. Fonksiyonel BMP15'i olmayıp, GDF9 heterozigot mutasyonu olan farelerde ise foliküler gelişim normal görünse de oositlerin fertilizasyonunun belirgin olarak azaldığı saptanmıştır (60). Bu durum ise kumulus hücre-oosit kompleksinin bozulması ile ilişkilendirilmiştir (51). Çoğu oositte ya çok az ya da hiç kumulus hücresi yoktur . Bazı hayvanlarda bu etki infertiliteye neden olabilir. Hem GDF9 hem de BMP15 mutasyonu taşıyıcısı koyunlar ise fertildir ve bu durumun ovulasyona olumlu etkileri vardır (58).

Oosit çevresini saran granuloza hücrelerinin fenotipini de etkilemektedir. Over folikülü preantral evreden antral evreye geçerken granuloza hücreleri de farklı tabakalara ayrılır. Oositin hemen yakınındaki granuloza hücreleri kumulus hücreleri, uzağındaki hücreler ise mural granuloza hücreleri olarak isimlendirilir. Kumulus kompleksi oositin normal maturasyonu için esansiyeldir ve bu hücrelerin fonksiyonları oosit tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (4). Oositin kumulus hücre proliferasyonunu , ekspansiyonunu ve östradiol üretimini arttırdığı, LH-R, SCF(kit ligand) ve progesteron sentezini ise azalttığı bilinmektedir (4). GDF9 kumulus hücre fenotipini belirlemede en önemli faktörlerden biridir (62). Farelerde GDF9'un oositin

çevresindeki hücrelerle bağlantısını ve gap junctionlar yoluyla aminoasit transportunu düzenlediği de gösterilmiştir (51, 63). Bu iki parakrin faktöre yanıt olarak kumulus hücrelerinde hücre içi sinyal ileti molekülleri(smadlar) ve mitojen active protein kinaz(MAPK) aktive olarak bu hücrelerin fonksiyonlarını etkilemektedir. Yani oositin salınan bu faktörler ile kumulus hücre proliferasyonu, apoptozisi, luteinizasyonu, metabolizması ve ekspansiyonu düzenlenmektedir. Oositin sonraki gelişiminde de oosit-kumulus hücre bağlantısı gerekmektedir (13) (Şekil 9).

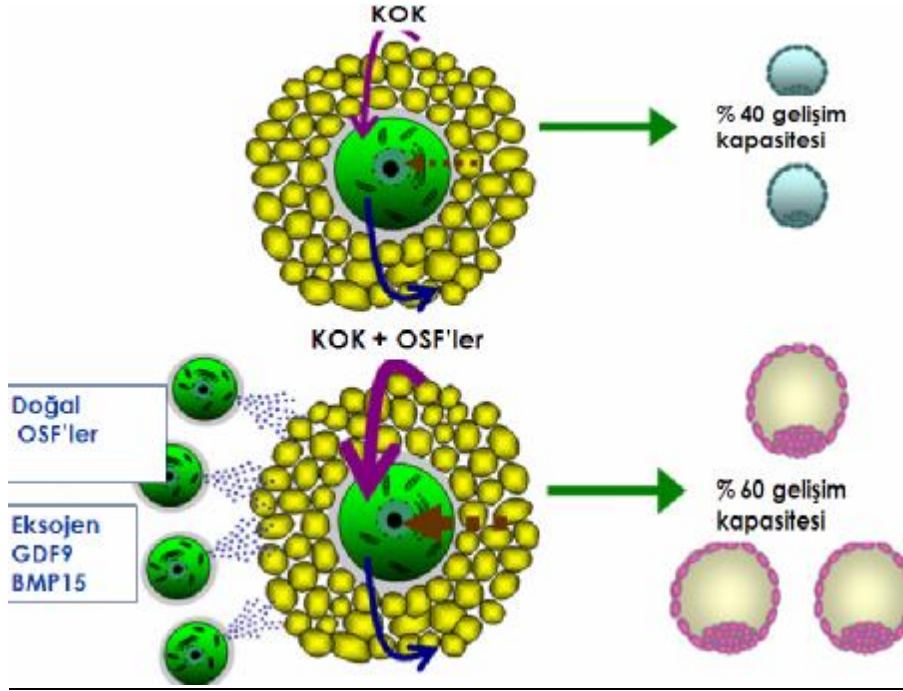
Yukarıda belirtildiği gibi GDF9 ve BMP15 oosit tarafından sentezlenip salgılanan ve granuloza hücre fonksiyonu düzenleyen lokal medyatörlerdir. Vasküler bir ortamda parakrin faktörlere dışarıdan müdahale etmek zor görünse de yakın zamanda yapılan çalışmalarda koyunlarda aktif ve pasif immunizasyonla GDF9 ve BMP15 biyolojik aktivitesinin kontrol edilebildiği gösterilmiştir. Koyunlara aylık GDF9 ve BMP15 spesifik peptidlerle immunizasyon uygulanmış 4-5 ay sonra üreme dönemlerinde sikluslarında bozulma gözlenmiştir. Çoğu koyunda ovulasyon oluşmamış, overlerin incelenmesinde normal foliküler gelişimin primer evrede kaldığı saptanmıştır. Ayrıca anormal foliküllerin immunize koyunlarda, BMP15 homozigot mutasyonu olan koyunlardakine çok benzer olduğu saptanmıştır. Kumulus kompleksleri anormal olan büyük oositler gözlenmiştir (63). Erken foliküler gelişimde bu iki proteinin yeri daha belirgin ise de foliküler gelişimin sonraki aşamalarına etkilerini değerlendirmek için bu aşamalarda koyunlara pasif immunizasyon yapılmıştır. Bu aşamada GDF9 nötralizasyonu ovulasyonu önleyememiş olsa da, luteinizasyonda bozulma ve sonraki siklusta progesteron salgılanmasında bozulma saptanmıştır. BMP15 nötralizasyonu ile ise beş koyunun dördünde ovulasyon bloke olmuş, üçünde antral folikül gelişimi gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre GDF9 ve BMP15'in erken foliküler gelişim kadar ileri foliküler gelişimde de rolleri mevcuttur (64).

Heterozigot mutasyonu olan koyunlarda ovulasyon oranlarında artış saptanması bu heterozigot mutasyonların fizyolojik benzerini oluşturarak ovulasyon oranlarını artırmak mümkün müdür sorusunu getirmiştir. GDF9 ve BMP15'in kısa dönem su bazlı adjuvan kullanımı ve immunizasyonu ile ovulasyon oranlarında artış saptanmıştır (61). Ayrıca fertilizasyon, embryo sağ kalımı ve gebelik devamında farklılık da saptanmamıştır. Bu bulgular bu iki faktörün infertilite tedavisinde ovulasyon oranlarını arttırmada da kullanılabileceğini düşündürmektedir.



Sekil-9: Oositten salınan faktörlerin kumulus hücrelerine ve oosit kalitesine etkisi (Smad: hücre içi sinyal ileti molekülü, MAPK: mitogen-activated protein kinase) (13). (Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum Reprod Update 2008; 14: 159-177.)

Bu iki parakrin faktörün folikülogenezdeki etkilerine bakılarak bu faktörlerin kültür medyumlarına eklenmesiyle oosit kalitesinin artırılması da amaçlanabilir. Yakın zamandaki bir çalışmada in vitro maturasyonda (IVM) kumulus hücresi oosit kompleksi, rekombinant GDF9 ve BMP15 eklenmiş ortama koyularak oositlerin gelişim kapasiteleri incelenmiştir. Sonuçta oositlerin blastokist evresine geçişinin %40'tan %60'a yükseldiği gözlenmiştir (65, 66)(Şekil-10). Aynı zamanda oositten salınan faktörlerin kumulus oosit kompleksi ortamına eklenmesiyle embryo kalitesinin artırılabilirdiği ve trofektoderm hücre sayısının arttığı da gösterilmiştir (66). Oositin kalitesi sonraki gelişim basamaklarını etkilemektedir. Bunlar fertilizasyon, embryo oluşumu ve sağlıklı gebeliği kapsamaktadır. Kötü oosit kalitesi, polispermi veya embryonik gelişimde duraksama ve spontan abortus gibi durumlarla sonuçlanmaktadır. Günümüzde embryo gelişimi ve çevresel faktörlerin oositin kendisi tarafından düzenlendiği görüşü de giderek kabul görmektedir (67). Reprodüktif biyoloji ve tıp alanında oosit kalitesini etkileyen moleküler ve hücresele olayların mekanizması ise hala tam açıklanamamıştır.



Sekil-10: BMP15 ve GDF9 eklenmiş mediumun oosit gelişim kapasitesine etkisi. (KOK: Kumulus oosit kompleks, OSF: Oositten salınan faktörler)(66)(Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. Theriogenology 2007; 67: 6-15)

Yapılan araştırma sonuçlarını kısaca özetleyecek olursak bu yakın zamanda keşfedilmiş iki lokal medyatörün oosit tarafından salgılanarak çevre granuloza ve teka hücre fonksiyonlarını (ve dolaylı olarak da oositin kendisini) etkilediğini söyleyebiliriz. Yani oositin kendi kaderini tayin etmede rolü olduğu düşünülebilir.

GDF9 ve BMP15'in oositten salındıktan sonra foliküler sıvıda buldukları da gösterilmiştir (50). Mevcut verilere dayanarak foliküler sıvı GDF9 ve BMP15 düzeylerinin oosit maturasyonunu, fertilizasyonu, embryo kalitesini ve klinik gebelik oranlarını etkileyebileceği düşünülebilir. Biz de bu çalışmada bu hipotezi araştırmak amaçlı infertilite nedeniyle kliniğimize başvurarak in vitro fertilizasyon uygulanan hastaların foliküler sıvı GDF9 ve BMP15 düzeyleri ile o foliküle ait oositin sonraki gelişimi(maturasyon, kalite, fertilizasyon, bölünme, embryo kalitesi) ve klinik gebelik oranları arasındaki ilişkiyi incelemeyi planladık. Bu iki parakrin faktörün yapılan çalışmalarda FSH ve LH reseptörleri üzerinden steroidegenezi de etkiledikleri gözönüne alınarak foliküler sıvı FSH, östradiol ve progesteron düzeyleri de çalışmaya dahil

edildi. Oosit morfolojisinin daha subjektif bir bulgu olabileceğinden yola çıkılarak üç ayrı oosit morfolojik değerlendirmesinin sonraki embryo kalitesine etkisi ve oosit morfolojisi ile bu iki parakrin faktör arasındaki ilişkinin araştırılması da planlandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu prospektif çalışma 2008-2009 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, IVF merkezinde IVF/ICSI uygulanan hastaların oosit toplama sırasında elde edilen foliküler sıvıları incelenerek gerçekleştirildi. Dokuz Eylül Üniversitesi etik kurulu onayı alındı. İşlem öncesi çalışmaya katılım için her hastanın yazılı ve sözlü onamı alındı. Çalışmaya çeşitli nedenlerle (erkek faktör, kadın faktör, açıklanamayan infertilite) kliniğimize IVF/ICSI için başvuran toplam 97 hasta dahil edildi. Polikistik over sendromu tanısında Rotterdam tanı kriterlerinden (1. Oligo-anovulasyon 2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenemi 3. Ultrasonografide polikistik overlerin mevcut olması) en az ikisinin mevcut olması kullanıldı (68). Ultrasonografide polikistik over görüntüsü olan fakat polikistik over sendromu olmayan hastalar da polikistik overli olan hastalar olarak istatistik analizde ayrıca incelendi .

3.1. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon

Çalışmaya katılan hastalara (n=67) GnRH analogu (Suprefact; Sanofi Aventis, Türkiye/Lucrin; Abbot, Türkiye) ile uzun protokol uygulanarak hipofizer baskılama sonrası overyen stimülasyon amaçlı rekombinant FSH (Puregon; Organon, Türkiye/ Gonal-F, Serona, Türkiye) veya hMG (Menogon; Er-Kim, Türkiye) kullanıldı. Diğer hastalarda (n=30) kısa protokol uygulanarak GnRH agonist yerine antagonist (Cetrotide; Serona, Türkiye/ Orgalutron; Organon, Türkiye) kullanıldı. Düzenli folikülometrik değerlendirme sonrası en az iki folikül çapı 18 mm olunca 10000 IU hCG (Pregnyl, Organon, Türkiye) ya da 250 mcg rekombinant formu (Ovidrel; Serono, Türkiye) uygulandı.

3.2. Oosit Toplanması

Yapılan hCG'den 36 saat sonra intravenöz sedasyon altında oosit toplama işlemi gerçekleştirildi. Sedasyon için fentanyl (fentanyl citrate ampul, Abbot, Türkiye) 1 mcg/kg, propofol (propofol flakon 500 mg/ml, Abbot, Türkiye) 1 mg/kg ve midazolam (dormicum ampul 5mg/ml, Roche, Türkiye) kullanıldı. Vajen steril salin solüsyonuyla temizlendikten sonra transvajinal ultrasonografi rehberliğinde; ultrasonografi probuna (7,5 mhz endovajinal probe, Siemens, Japonya) bağlı 16 G aspirasyon iğnesi (Gynetics, Hamont-Archel, Belçika) ile 125 mmHg

basınç uygulanarak foliküler aspirasyon yapıldı. Her aspirasyondan sonra bir sonraki folikül sıvısının kontaminasyonunu engellemek amaçlı set temizlenerek yeni toplama tüpü kullanıldı. Her hastadan yıkamasız ve kontaminasyonu olmayan ve tek oosit elde edilen bir adet folikül sıvısı ayrılarak 15 ml hacimli tüpe kondu. Sıvı örneğindeki granuloza hücrelerini ve debrisini ayırmak için 2000 devir/dk hızda 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant 0,4 ml içerecek şekilde steril polipropilen tüplere aktarıldı. Materyeller numaralandırılarak -80°C'de analiz gününe kadar saklandı.

3.3. Oositlerin Elde Edilmesi ve ICSI

Aspirasyon ile elde edilen her bir folikül sıvısı laminar flow kabinindeki petri kaplarına döküldükten sonra mikroskop altında oositler bulundu. Falcon 353037 (60x15 mm) center well dishler; dış kısmına 2 ml, iç kısmına 1 ml HEPES eklenerek Quinn's Advantage medyum (SAGE Biopharma, Bedminster, NJ, ABD) konularak hazırlandı. Tabağın dış kısmında yıkanıp bulunan oositler Pasteur pipet ile iç kısma alındı. Folikül sıvısı ayrılan oosit ayrı bir kaptaki takip edildi. Oosit toplama işlemi bittikten sonra oositler, bir gün önceden hazırlanmış Quinn's Advantage Protein Plus Fertilization (HTF) medyumlu tabağa (NUNC four well dish, 176740, Thermo Fisher Scientific, ABD) aktarılarak ICSI işlemine kadar 2-4 saat inkübe edildiler. ICSI işlemi öncesi oositlere mekanik ve kimyasal denüasyon uygulandıktan sonra, invert mikroskop (Olympus IX70, Olympus, Viyana) altında nükleus ve sitoplazmaları değerlendirildi. Nükleer değerlendirmede oositler üç gruba ayrıldı. Grup 1; matür, metafaz II (MII) oositler, Grup 2; immatür, metafaz I (MI) veya germinal vezikül (GV) oositler, Grup 3; dejenere olan oositler olarak belirlendi. Sitoplazmik değerlendirme sonucunda ise oositler sitoplazması normal ve anormal olanlar (granüler, koyu, vakuollü, refraktil cisimli) olarak gruplandı. Oositlerin polar cisimcik (normal, parçalı, geniş) ve previtellin aralıkları (normal, geniş, dar, partiküler) da değerlendirildi. Yumurta toplama işlemi sonrası hasta eşlerinden mastürbasyon ile semen örneği alındı. Semen örneğinde sperm bulunmayanlara TESE (Testiküler sperm ekstraksiyonu) uygulandı. Swim up ve yoğunluk gradiyenti santrifüjü ile hazırlanan spermler 0,5-4 saat protein içeren medyumda (Quinn's Sperm Washing Medium, Sage Media, A.B.D), 37°C'de, %5'lik karbon dioksitli ve %98'lik nemli ortamda kapasitasyon amacıyla inkübasyona (Heraus inkübatör, Almanya) bırakıldıktan sonra mikroenjeksiyon prosedürü uygulandı.

3.4. Oosit grade sistemi

Oositler embryoloğun sitoplazmik ve ekstrasitoplazmik deęrlendirmesine göre tekrar derecelendirildi. Derecelendirme kriterleri Őu Şekildedir.

Grade A sistemi; Xia'nın oosit gradeleme sistemine göre (36):

Grade1: Parçalı polar cisimcik, geniş perivitellin aralık

Grade2: Normal polar cisimcik, geniş perivitellin aralık

Grade3: Parçalı polar cisimcik, normal perivitellin aralık

Grade4: Normal polar cisimcik, normal perivitellin aralık

Grade B sistemi ise Mikkelsen ve ark.'nın yaptığı derecelendirmeye göre yapılmıştır ve Őu Şekildedir (69): Oositlerin sahip olduğu ekstrasitoplazmik anomalilerden parçalı polar cisimcik veya geniş perivitellin aralık; sitoplazmik anormalliklerden koyu ya da granüler sitoplazma, refraktil cisim olması gibi anormalliklere göre:

Grade I: Normal oosit

Grade II: Bir anomali mevcut

Grade III: En az iki anomali mevcut

MOMS (Metafaz II Oosit Morfoloji Skoru) ise yakın zamanda Rienzi ve ark'nın yaptığı oosit skorlamasıdır (33). Tablo I'de gösterilmiştir:

Tablo I: MOMS

Ekstrasitoplazmik değerlendirmede	Puan
Anormal polar cisim	2,0
Geniş perivitellin aralık	1,4
Sitoplazmik değerlendirmede	
Granüler sitoplazma	1,4
Santral lokalizasyonlu granüler alan	2,7
Vakuol	2,1

3.5. Fertilizasyon, Klivaj ve Embryo Değerlendirmesi

ICSI işleminden 18 saat sonra fertilizasyon değerlendirildi. İki adet pronukleusa sahip olanlar fertilize olarak kabul edildi. Fertilizasyona göre oositler iki gruba ayrıldı. Grup1; fertilize olanlar; Grup 2; fertilize olmayanlar. Fertilize olan oositlerde klivaj 24 saat sonra değerlendirildi. Bölünmeye başlayıp en az iki hücre olanlar klivaj olmuş, bölünmeyenler ise klivaj olmamış olarak iki gruba ayrıldı. ICSI işleminden 48-72 saat sonra embryo transferi yapıldı. Transfer öncesi embryolar ikinci ve üçüncü gün kalitelerine göre derecelendirildi. En üst kalitede olan embryolar transfer için kullanıldı. Derecelendirmede blastomerlerin şekli, birbirlerine oranı ve fragmentasyon değerlendirildi, Grade 1, doğru ve eşit büyüklükte hücreler, fragmentasyon yok, çok çekirdeklilik yok; Grade 2, doğru ve eşit büyüklükte hücreler, %0-25 fragmentasyon var; Grade3, hücreler eşit büyüklükte değil ve %25-50 fragmentasyon ; Grade 4, hücreler eşit büyüklükte veya değil ancak >%50 fragmentasyon var (40).

Embryo transferi transabdominal ultrasonografi (Sonoline Adara, Siemens, Almanya) eşliğinde gerçekleştirildi. Vajen steril salin solüsyonuyla temizlendikten sonra kateter (Wallace, Smiths, İngiltere Labotect, Almanya) ile kaviteye girilerek , kateterin ucu fundusa 1-1,5 cm uzaklıkta iken embryo transferi yapıldı. Transfer kateterinde embryo kalıp kalmadığı kontrol edilerek işleme son verildi. Embriyo transferi sonrasında hasta 30 dakika dinlendirildi. Luteal faz desteği için her hastaya 600 mg/gün vaginal progesterone (Progestan kapsül, 100 mg, Koçak, Türkiye) verildi. Transferin 14. gününde serum β -hCG değeri > 25 mIU/ml ise biyokimyasal gebelik tespit edildi. Klinik gebelik ise üç hafta sonra bakılan transvaginal ultrasonografide gebelik kesesinin gözlenmesi ile saptandı.

3.6. Foliküler Sıvı GDF9 ve BMP15 Düzeylerinin Belirlenmesi

3.6.1. Protein düzeylerinin belirlenmesi

Folikül sıvıları çözünme sonrası 1300 g'de 10 dakika tekrar santrifüj edilerek supernatant kısımları ayrı ependorflara alındı. Protein miktar belirlemesi için BCA Protein Assay Kit (Pierce 23225) kullanıldı. Her bir tüpte farklı miktarlarda stok BSA (Pierce, 23209) içeren, BCA ve ddH₂O ilaveleriyle 1ml'lik toplam hacme ulaştırılan reaktif solüsyonlar hazırlandı. Yine bunlara

paralel olarak, miktarı tayin edilecek hasta folikül sıvılarının her birinden 2 µl içeren ve aynı şekilde BCA ve ddH₂O ile 1ml'ye tamamlanmış reaktif solüsyon hazırlandı. Tüm örnekler tepkime gerçekleşmesi için 60 °C' de 15 dakika inkübe edildi. Isı altında içerdikleri protein miktarlarıyla orantılı şekilde değişiklik gösteren reaksiyon sonunda oluşan bikronik asit-bakır komplekslerinin optik densiteleri (OD) "picodrop" cihazı kullanılarak, 562 nm dalga boyu baz alınarak ölçüldü. Bilinen BSA konsantrasyonlarına karşı "picodrop"da okunan OD değerleri kullanılarak çizilen standart doğrusal grafikten elde edilen matematiksel formül kullanılarak diğer örneklerdeki bilinmeyen protein miktarları hesaplandı.

3.6.2. SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrez

BioRad mini tetracell protein elektrofrez sistemi kullanıldı. Konsantrasyonları belirlenmiş folikül sıvıları PBS içerisinde dilüe edilerek ve eşit miktarlardaki proteinler kullanılacak şekilde, % 5 β-ME (Applichem, A1108,0100) içeren 2X yükleme tamponu ile son konsantrasyon 1X olacak şekilde karıştırılıp, 95 °C' de 10 dakika kaynatıldı. Protokol Duffey D (2003) modifiye edilerek kullanıldı (70). Kaynatılan örnekler oda sıcaklığına gelince, tanka yerleştirilmiş tris-glisin elektrofrez yürüme tamponu içerisindeki jellerin kuyularına yüklendi. Bir kuyuya da proteinlerin büyüklüklerini tahmin etmek amacıyla içinde bilinen büyüklüklerde çeşitli proteinler bulunan önceden boyalı büyüklük belirteci (prestained size marker) (MBI Fermantas SM0671) yüklendi. Örnekler istifleyici jelin sonuna kadar 70V'da, ayırıcı jelde ise 110 V sabit gerilimde 3-4 saat yürütüldü. 1 PVDF membran (millipore, IPVH15150) kullanılarak ıslak olarak %20 metanol içeren transfer tamponu ile 400mA de 3 saat transfer yapıldı. Transfer işleminden sonra %10'luk süt tozu ve %0.1 Tween-20 içeren TBS ile bloklama işlemi oda sıcaklığında 1 saat olarak gerçekleştirildi. Belirlenmek istenilen proteine karşı özgün olarak üretilmiş satın alınan antikorların (primer antikor), %3 süt tozu içeren TBS-T içinde optimizasyon sonrasında belirlenmiş konsantrasyonlarda olacak şekilde dilüsyonları yapıldı ve oda ısısında 1 saat ya da +4 °C'de çalkalanarak inkübe edildi. Bu işlemin ardından membran en az 6 kere 10'ar dakikalık çalkalamalarla yıkandı. Daha sonra primer antikorun elde edildiği hayvana karşı ve ucunda HRP enzimi takılı antikorun (GDF-9 (C-20) Sc-7407, GDF-9B (H-83) Sc-28911) yine %5 süt tozu içeren TBS-T kullanılarak optimize dilüsyonları (1:500) yapıldı ve 16 saat +4 derecede yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Primer antikor sonrasında yapılan yıkama işlemi tekrarlandı.

Sekonder antikor olarak rabbit anti-goat HRP Sc-2768 (1:10000) ve stabilized HRP conjugated goat anti-mouse 1858413 (1:10000) antikorları yine %5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde hazırlanıp oda sıcaklığında 1 saat membranla inkübe edildi. Ardından membran en az 6 kere 10'ar dakikalık çalkalamalarla yıkandı. Tüm yıkamaların ardından Pierce (West Dura Extended Duration Substrate, 34075) kit solüsyonları kullanılarak bantlar görüntülendi. Pierce kitinde önerildiği gibi membran 5 dakika solüsyon karışımıyla muamele edildikten sonra naylon içerisine alındı. Işımaya duyarlı Kodak (5256441) filmi naylon içerisindeki membran üzerinde, kasette kapalı şekilde, farklı antikorlar için farklı sürelerde tutulup ardından da banyo edilen filmde sonuçlar görüntülendi. İkincil antikor ucuna bağlı HRP enzimi Pierce kitinin içerisindeki substratı parçalayarak ışımaya sebep oldu.

3.7. Foliküler Sıvı FSH, Progesteron ve Östradiol Düzeylerinin Belirlenmesi

Foliküler sıvı hormon düzeyleri (FSH, Progesteron, Östradiol) kemiluminesent immunoassay yöntemi ile belirlendi. Immulite 2500 (Siemens) cihazı kullanıldı. Örneklerin tamamı çalışılmadan önce dilüsyon testi ile kontrol örnekler çalışıldı. Her test öncesi Immulite 2500 düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlar için kalibre edildi. Östradiol için örnekler 1:1000 dilüsyonda, progesteron için 1:500 dilüsyonda çalışıldı. FSH için ise dilüsyon gerekmedi. İntraassay değişim katsayıları (coefficient of variations): FSH %1.5, E2%3.73, P%2.85. Interassay değişim katsayıları ise: FSH% 3.5, E2%3.84, P%4.65 idi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 11,0) programında analiz edildi. Oluşurulan iki grup ortalaması arasında fark olup olmadığını belirlemede parametrik koşullarda bağımsız gruplarda t testi, parametrik olmayan koşullarda bağımsız gruplarda Mann-Whitney U testi kullanıldı. İki'den fazla grubun ortalamaları karşılaştırıldığında parametrik olmayan koşullarda Kruskal-Wallis Varyans Analizi yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma toplam 97 hasta ile yapıldı. Hastaların infertilite nedenlerine göre dağılımları Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo -II: Hastaların infertilite nedenleri

İnfertilite nedeni	Sayı	%
Erkek faktör	41	42,3
Kadın faktör	19	19,6
Açıklanamayan	29	29,9
Kadın+Erkek faktör	8	8,2
Toplam	97	100,0

Kadın faktörü olan olgular irdelendiğinde ; PCOS olan 5 (%18,5), endometriozis olan 6 (%22,2), ileri kadın yaşı olan 4 (%14,8), tubal faktör olan 12 (%44,4) hasta saptanmıştır.

Hastalar infertilite nedenlerine göre gruplandırıldığında; gruplar arasında bakılan klinik özellikler açısından istatistiksel fark gözlenmedi (Tablo III).

Hastaların oositleri değerlendirildiğinde 97 oositin 7 (%7,2)'sinde nükleer maturasyon gerçekleşmemiş, 90 (%92,8) adet MII oosit oluşmuştur. Bu 90 hastanın 6'sına da TESE negatif oldukları için ICSI uygulanmamıştır. 91 hastanın 38 (%41,7)'inde gebelik elde edilmiştir.

ICSI uygulanabilen 84 hastanın oositlerinde sitoplazmik inceleme ve oosit grade'lemesi yapılmış, fertilizasyon oranlarına bakılmıştır. Sitoplazmik değerlendirmede sitoplazması normal olan 12 (%14,3), granüler olan 49 (58,3), koyu olan 13 (%15,5), refraktör cisimli olan 8 (%9,5), vakuollü olan 2 (%2,4) oosit saptanmıştır. Grade A sistemine göre oositler derecelendirildiğinde şu şekilde dağılım gözlenmiştir (Tablo IV).

Tablo -III: Hastaların infertilite nedenlerine göre klinik özellikleri ve tedavi sonuçları

n=97	Erkek faktör (n=41)	Kadın faktör (n=19)	Açıklanmayan (n=29)	Erkek+Kadın faktör (n=8)	p-değeri
Yaş	30,07±0,80	32,5±1,29	31,1±0,88	33,0±1,46	0,282
Gonadotropin dozu(IU)	2948±245,6	3230±398,7	2838±259,6	3625±562,0	0,547
hCG günü	11,79±0,65	12,33±0,86	11,8±0,55	12±0,57	0,974
Folikül sayısı	13,4±1,25	10,2±1,16	15,8±2,31	12±2,3	0,368
Oosit sayısı	12,6±1,2	8,9±1,24	12±1,2	8,0±2,0	0,153
MII oranı(%)	81±4	82±6	79±5	76±18	0,948
Fertilizasyon oranı(%) (n=84)	64±6 (n=33)	78±5 (n=17)	70±3 (n=26)	77±12 (n=8)	0,260
Embryo sayısı (n=64)	7,4±0,9 (n=25)	7,1±1,3 (n=12)	8,6±0,8 (n=21)	7,2±1,7 (n=6)	0,404

Tablo -IV: Grade A sistemine göre oosit gradeleri

Grade	Sayı	%
Grade 1	14	16,7
Grade 2	15	17,9
Grade 3	33	39,3
Grade4	22	26,2
Toplam	84	100,0

Grade B sistemine göre ise oositler şu şekilde dağılım göstermiştir (Tablo V):

Tablo -V: Grade B sistemine göre oosit gradeleri

Grade	Sayı	%
Grade I	7	8,3
Grade II	22	26,2
Grade III	55	65,5
Toplam	84	100,0

84 oositin 66 (%78,6) tanesinde fertilizasyon gerçekleşmiş, 18 (%21,4) tanesinde ise fertilizasyon saptanamamıştır. Oluşan 66 embryonun ise 64 (%97) tanesinde klivaj oluşmuş, 2 (%3) tanesinde klivaj saptanamamıştır

Bu 64 embryonun 2. gün embryo kalitesine göre değerlendirilmelerinde 31 (%48,4) tanesinin grade1, 27 (%42,2) tanesinin grade2, 6 (%9,4) tanesinin ise grade3 embryo olduğu saptanmıştır (Tablo VI). 20 embryo 2. gün transfer edildiği için 44 embryonun 3. gün kalitesine bakılmıştır. Bunların ise 19 (%43,2) tanesinin grade1, 20 (%45,5) tanesinin grade2, 5 (%11,4) tanesinin ise grade3 embryo olduğu saptanmıştır (Tablo VII).

Tablo -VI: 2. gün embryo kalitesine göre embryo gradeleri

Grade	Sayı	%
Grade 1	31	48,4
Grade 2	27	42,2
Grade 3	6	9,4
Toplam	64	100,0

Tablo -VII: 3. gün embryo kalitesine göre embryo gradeleri

Grade	Sayı	%
Grade 1	19	43,2
Grade 2	20	45,5
Grade 3	5	11,3
Toplam	44	100,0

Foliküler sıvılarda GDF9 ve BMP15'in proform ve matur formları ölçülmüştür. Örneklerin tamamında proform düzeyleri saptanabilirken, bazı hastalarda bu proteinlerin matur formlarının oluşmadığı saptanmıştır. 97 hastanın 88 (%90,7)'ine ait folikül sıvısında GDF9 matur formu saptanmış, 9 (%9,3)'unda saptanmamıştır. BMP15 matur formu ise 58(%59,8) hastada saptanmış 39(%40,2) hastada saptanmamıştır. Folikül sıvılarının ortalama GDF9 proform, BMP15 proform, GDF9 matur, BMP15 matur, FSH, Progesteron (P) ve E2 düzeyleri Tablo VIII'de gösterilmiştir.

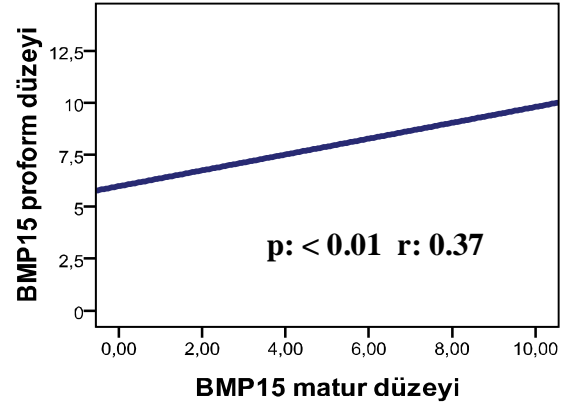
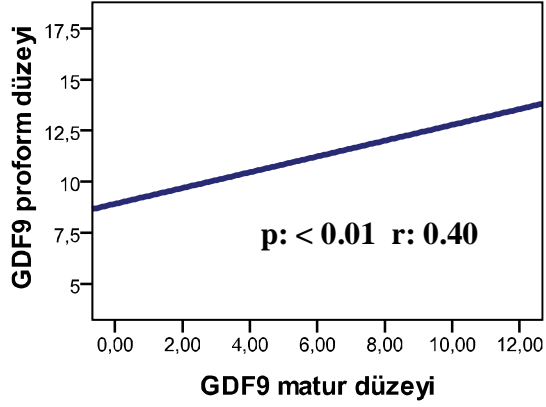
Tablo –VIII: Foliküler sıvı FSH, P, E2, GDF9 proform, BMP15 proform, GDF9 matur, BMP15 matur düzeyleri(ortalama±standart hata(sh)).

n:97	Ortalama±sh	Minimum-maksimum değer
FSH(mIU/ml)	8,21±5,49	1,16-24,6
P (µg/ml)	11,12±3,76	2,43-19,1
E2 (ng/ml)	657,42±356,28	106,46-1644,66
GDF9 proform	10,37±2,75	4-17
BMP15 proform	6,87±2,52	1-13
GDF9 matur form(n:88)	3,77±2,91	0-11,3
BMP15 matur form(n:58)	2,31±2,45	0-9,7

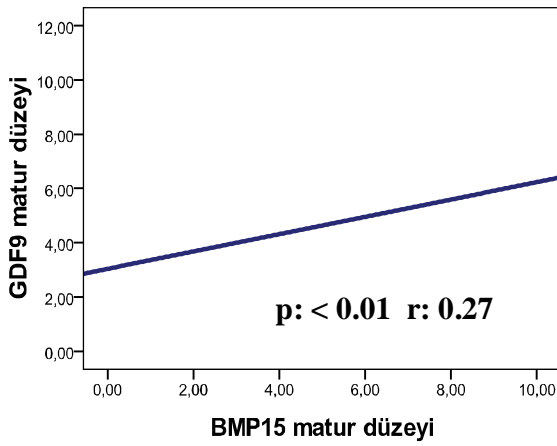
GDF9 proform ile GDF9 matur düzeyleri, BMP15 proform ile BMP15 matur düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı pozitif korrelasyon saptandı ($p<0,05$) (Grafik-1). Ayrıca GDF9 matur ile BMP15 matur düzeyleri arasında da anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($p<0,05$) (Grafik-2). Foliküler hormon düzeyleri ile GDF9 ve BMP15 düzeyleri arasında anlamlı korrelasyon izlenmedi. FSH ile P düzeyleri arasında, P ve E2 düzeyleri arasında da istatistiksel anlamlı pozitif korrelasyon saptandı ($p<0,05$).

İnfertilite nedenine göre gruplandırılmada gruplar arasında GDF9, BMP15 proform ve matur düzeyleri ve hormon düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo IX).

Grafik 1: GDF9 proform ile GDF9 matur düzeyleri, BMP15 proform ile BMP15 matur düzeyleri



Grafik 2: GDF9 matur ile BMP15 matur düzeyleri



Tablo IX: İnfertilite nedenine göre foliküler sıvı FSH, E2, P, GDF9, BMP15 proform, matur düzeyleri(ort±sh)

n=97	Erkek faktör (n=41)	Kadın faktör (n=19)	Açıklanamayan (n=29)	Erkek+Kadın faktör (n=8)	p-değeri
FSH(mIU/ml)	8,00±0,75	9,70±1,36	7,34±1,04	8,93±2,54	0,559
P (µg/ml)	11,00±0,52	10,66±0,90	11,43±0,75	11,69±1,69	0,797
E2 (ng/ml)	589,06±06	742,88±84,8	670,01±68,4	759,10±155,4	0,370
GDF9 proform	10,61±0,44	10,74±0,56	9,79±0,50	10,38±1,13	0,780
BMP15 proform	6,51±0,37	7,05±0,56	7,21±0,52	7,00±0,90	0,723
GDF9 matur (n=88)	4,39±0,47 (n=39)	2,80±0,62 (n=16)	3,58±0,50 (n=26)	3,60±1,12 (n=7)	0,203
BMP15 matur (n=58)	2,47±0,38 (n=27)	2,39±0,76 (n=11)	2,06±0,34 (n=15)	2,15±0,73 (n=5)	0,814

Foliküler sıvı GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri ile oositlerin nükleer maturasyonları, fertilize olup embryo oluşturmaları, oluşan embryoların klivaj olup olmaması, embryo kaliteleri ve gebelik olup olmaması arasındaki ilişkiler değerlendirildi.

Oositlerin nükleer maturasyonları ile foliküler sıvı GDF 9 ve BMP15 proform ve BMP15 matur düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı. GDF9 matur formu, nükleer maturasyonunu tamamlamış oositlerin foliküler sıvısında anlamlı yüksek saptandı (p<0,05). (Tablo X)

Tablo -X: Oositlerin nükleer maturasyonları ile GDF-9 ve BMP-15 proform, matur düzeyleri (ort±sh) arasındaki ilişki

Foliküler sıvı(n=97)	Nükleer maturasyon yok (n=7)	Nükleer maturasyon var (n=90)	P değeri
GDF9 proform	10,29±0,56	10,38±0,29	0,950
BMP15 proform	6,43±1,69	6,90±0,24	0,399
GDF9 matur	1,71±0,50	3,93±0,31	p<0,05
BMP15 matur	1,58±0,59	2,36±0,26	0,605

Oositlerin sitoplazmalarına göre normal ve anormal sitoplazmalı oositler ile GDF9, BMP15 proform ve matur düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı. (Tablo XI)

Tablo -XI: Oositlerin sitoplazması ve GDF-9 ve BMP-15 proform, matur düzeyleri(ort±sh) arasındaki ilişki

Foliküler sıvı(n=84)	Normal sitoplazma(n=12)	Anormal sitoplazma(n=72)	P değeri
GDF9 proform	9,40±0,70	10,50±0,35	0,265
BMP15 proform	6,50±0,65	6,68±0,25	0,796
GDF9 matur	2,65±0,63	4,17±0,34	0,069
BMP15 matur	2,31±0,91	2,24±0,28	0,602

Oosit grade A sisteminde, oosit gradeleri ile GDF9, BMP15 proform ve matur düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı . (Tablo XII).

Tablo -XII: Oosit gradeleri (A) ile GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri (ort±sh) arasındaki ilişki

Foliküler sıvı (n=84)	Grade1 (n=14)	Grade2 (n=15)	Grade3 (n=33)	Grade4 (n=22)	P değeri
GDF9 proform	11,00±0,60	9,13±0,60	10,85±0,55	10,18±0,64	0,160
BMP15 proform	6,86±0,70	6,67±0,54	6,27±0,37	7,09±0,41	0,575
GDF9 matur	5,18±0,72	3,03±0,79	4,28±0,51	3,40±0,54	0,067
BMP15 matur	2,56±0,75	1,42±0,78	2,12±0,42	2,93±0,59	0,272

Oosit grade B sisteminde oosit gradeleri ile BMP15 proform ve GDF9 proform ve matur düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı BMP15 matur düzeyleri, grade 1 oositlere ait folikül sıvılarında anlamlı olarak yüksek saptandı (Tablo XIII).

Tablo -XIII: Oosit gradeleri (B) ile GDF-9 ve BMP-15 proform ve matur düzeyleri (ort±sh) arasındaki ilişki

Foliküler sıvı(n=84)	Grade 1(n=7)	Grade 2(n=22)	Grade 3(n=55)	P değeri
GDF9 proform	9,29±0,42	10,36±0,71	10,55±0,38	0,461
BMP15 proform	7,29±0,47	6,73±0,46	6,55±0,30	0,702
GDF9 matur	2,37±0,41	3,70±0,61	4,29±0,40	0,205
BMP15 matur	4,65±1,01	1,53±0,48	2,28±0,32	p<0,05

Oositlerin fertilize olup olmamaları ile GDF-9 ve BMP-15 proform ve matur düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo XIV).

Tablo XIV: Fertilizasyon ile GDF-9 ve BMP-15 proform ve matur düzeyleri (ort±sh) arasındaki ilişki

Foliküler sıvı(n=84)	Fertilizasyon yok (n=18)	Fertilizasyon var (n=66)	P değeri
GDF9 proform	10,61±0,88	10,29±0,32	0,767
BMP15 proform	7,17±0,70	6,74±0,25	0,296
GDF9 matur	4,10±0,74	4,03±0,35	0,983
BMP15 matur	2,28±0,67	2,28±0,30	0,664

İki oosit fertilize olduktan sonra 2PN aşamasından ileri gidemedi. Fertilize olan embryoların bölünmeye devamı (klivaj) ile GDF-9 ve BMP-15 proform ve matur düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo XV).

Tablo XV: Klivaja göre ile GDF-9 ve BMP-15 proform ve matur düzeyleri (ort±sh).

Foliküler sıvı(66)	Klivaj yok (n=2)	Klivaj var (n=64)	P değeri
GDF9 proform	9,00±1,00	10,33±0,32	0,431
BMP15 proform	7,50±1,50	6,72±0,26	0,571
GDF9 matur	4,00±0,30	4,03±0,36	0,694
BMP15 matur	2,25±0,31	2,35±0,34	0,224

2. gün embryo kalitesine bakıldığında embryo gradeleri ile GDF-9 ve BMP-15 proform düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı. GDF9 matur düzeyleri grade 1 ve 2 embryolarda grade 3 embryolara göre anlamlı yüksek saptandı (Tablo XVI). 3.gün embryo kalitesi ile ise GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Tablo XVI: 2. gün embryo kalitesine göre GDF9 ve BMP15 proform, matur düzeyleri(ort±sh).

Foliküler sıvı(n=64)	Grade1(n=31)	Grade2 (n=27)	Grade3(n=6)	P değeri
GDF9 proform	10,19±0,44	10,74±0,49	9,17±1,35	0,593
BMP15 proform	6,39±0,40	7,11±0,35	6,67±1,02	0,305
GDF9 matur	4,30±0,56	4,30±0,49	1,45±0,81	p<0,05
BMP15 matur	2,73±0,56	1,55±0,30	2,90±0,64	0,305

2.gün ve 3.gün embryo kaliteleri foliküler sıvıda GDF-9 ve BMP-15'in matur formlarının foliküler sıvıda saptanıp saptanmamasına göre tekrar karşılaştırıldı. BMP-15 matur formun foliküler sıvıda bulunması ile 2. Gün ve 3.gün embryo kalitesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı. GDF-9 matur formun foliküler sıvıda bulunması ile ise 2.gün ve 3.gün embryo kalitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (Tablo XVII, Tablo XVIII).

Tablo XVII: 2. gün embryo kalitesi ile GDF-9 ve BMP-15 matur formlarının karşılaştırılması (Dikey sütunlar embryo sayılarını, yatay sütunlar ise matur formun foliküler sıvıda bulunup bulunmadığını göstermektedir.)

Foliküler sıvı	Grade1 (n=31)	Grade2 (n=27)	Grade3 (n=6)	P değeri
BMP-15 matur form var	18	13	4	0,620
BMP-15 matur form yok	13	14	2	
GDF-9 matur form var	31	26	4	p<0,01
GDF-9 matur form yok	0	1	2	

Tablo-XVIII: 3. gün embryo kalitesi ile GDF-9 ve BMP-15 matur formlarının karşılaştırılması (Dikey sütunlar embryo sayılarını, yatay sütunlar ise matur formun foliküler sıvıda bulunup bulunmadığını göstermektedir.)

Foliküler sıvı	Grade1(n=19)	Grade2(n=20)	Grade3(n=5)	P değeri
BMP-15 matur form var	12	7	2	0,199
BMP-15 matur form yok	7	13	3	
GDF-9 matur form var	19	20	2	p<0,01
GDF-9 matur form yok	0	0	3	

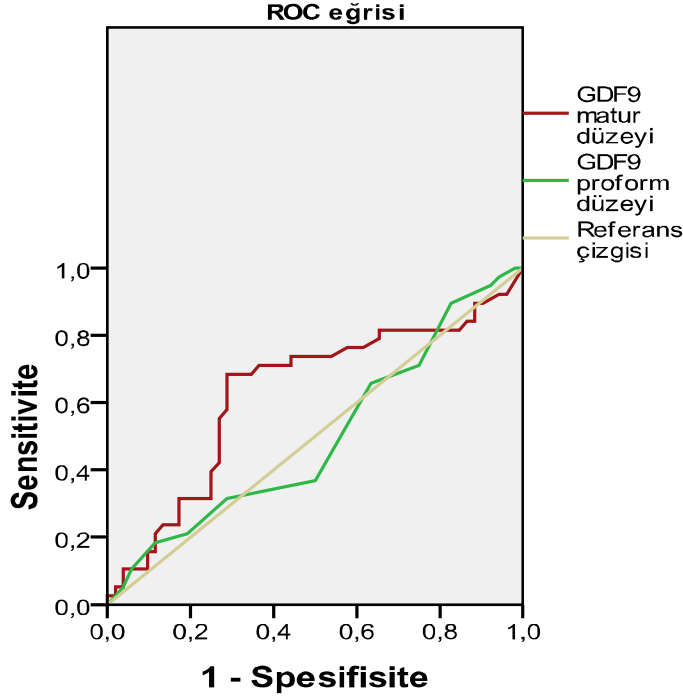
Gebelik sonuçlarına bakıldığında GDF-9 ,BMP-15 proform ve BMP15 matur düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı. GDF9 matur düzeyleri klinik gebeliği olan olgularda anlamlı yüksek saptandı (Tablo XIX).

Tablo-XIX: Klinik gebelik sonuçları ile GDF9 ve BMP15 proform ve matur ortalama düzeylerinin(ort±sh) karşılaştırılması

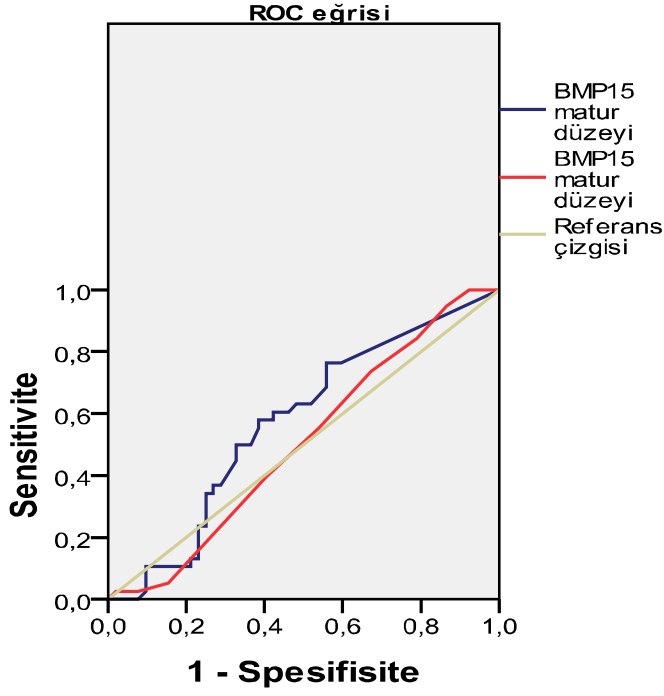
Foliküler sıvı (n=84)	Klinik gebelik yok (n=46)	Klinik gebelik var (n=38)	p değeri
GDF9 proform	10,27±2,76	10,45±2,80	0,765
BMP15 proform	6,75±2,77	6,82±2,11	0,903
GDF9 matur	3,35±2,71	4,58±2,99	p<0,05
BMP15 matur	2,15±2,78	2,24±2,00	0,874

Klinik gebelik sonuçları ile GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri arasındaki ilişki için ROC eğrisi yapıldığında GDF9 matur için eğri altında kalan alan 0,629 iken GDF9 proform için 0,498 olarak , BMP15 proform için 0,504 ve BMP 15 matur form için ise 0,571 olarak saptandı (şekil 11-12).

Şekil 11 : GDF9 proform ve matur düzeyleri ile klinik gebelik sonuçları için yapılan ROC eğrisi



Sekil 12 : BMP15 proform ve matur düzeyleri ile klinik gebelik sonuçları için yapılan ROC eğrisi



Oosit gradelemesi ve MOM skorlaması ile embryo kalitesi arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde oosit morfolojik görüntüsü ile embryo kaliteleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo XX ve XXI).

Tablo XX: Oosit morfolojisi ile embryo kalitesi arasındaki ilişki

	Grade1	Grade2	Grade 3	Toplam
GradeI	2	4	0	6
GradeII	8	8	0	16
GradeIII	20	13	6	39
Toplam	30	25	6	61

*Dikey sütunlar embryo gradelerini, yatay sütunlar oosit gradelerini(B) göstermektedir.

**p=0,234

Tablo XXI: MOMS(ort±sh) ile embryo kalitesi arasındaki ilişki

	Grade1	Grade2	Grade 3	P değeri
MOMS	1,56±0,19	1,72±0,33	1,61±0,21	0,997

Foliküler sıvı FSH, P, ve E2 düzeyleri ile oosit sitoplazması, morfolojik evrelemeleri ve MOMS arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo gösterimi yoktur).

Foliküler sıvı FSH, P, E2 düzeyleri ile nükleer maturasyon, fertilizasyon, klivaj, embryo kalitesi arasında anlamlı istatistiksel ilişki saptanmadı (Tablo XXII, XXIII, XXIV).

Tablo XXII: Nükleer maturasyon, fertilizasyon ile foliküler sıvı FSH, P, E2 düzeyleri (ort±sh) arasındaki ilişki

	Nükleer maturasyon(+)	Nükleer maturasyon(-)	Pdeğeri
FSH(mIU/ml)	8,14±0,56	9,15±2,94	0,972
E2 (ng/ml)	654,08±36,39	700,25±192,88	0,845
P (µg/ml)	11,19±0,40	10,17±0,55	0,329
	Fertilizasyon (+)	Fertilizasyon(-)	
FSH(mIU/ml)	7,91±0,62	9,89±1,52	0,305
E2 (ng/ml)	695,82±44,97	522,13±50,31	0,079
P (µg/ml)	11,48±0,45	10,33±1,13	0,452

Tablo XXIII: Klivaj ile foliküler sıvı FSH, P, E2 düzeyleri (ort±sh) arasındaki ilişki

n=66	Klivaj var (n=64)	Klivaj yok (n=2)	P değeri
FSH(mIU/ml)	7,96±0,63	6,33±4,26	0,630
E2 (ng/ml)	696,69±46,20	667,94±185,40	0,955
P (µg/ml)	11,52±0,46	10,37±3,30	0,731

Tablo XXIV: Embryo kalitesi ile FSH, E2, P düzeyleri (ort±sh) arasındaki ilişki

n=64	Grade1	Grade2	Grade 3	P değeri
FSH(mIU/ml)	9,29±1,07	6,98±0,73	5,47±1,32	0,182
E2 (ng/ml)	747,97±64,43	685,12±77,75	483,79±69,18	0,343
P (µg/ml)	11,47±0,68	11,59±0,72	11,48±1,39	0,977

Klinik gebeliği olan olgularda foliküler sıvı FSH düzeyleri istatistiksel anlamlı olarak daha düşük saptandı (Tablo XXV).

Tablo-XXV: Klinik gebelik sonuçları ile foliküler sıvı FSH, P ve E2 düzeylerinin (ort±sh) karşılaştırılması

Foliküler sıvı (n=84)	Klinik gebelik yok (n=46)	Klinik gebelik var (n=38)	p değeri
FSH(mIU/ml)	9,69±5,71	6,71±5,03	p<0,05
P (µg/ml)	11,22±3,97	11,05±3,75	0,833
E2 (ng/ml)	680,11±350,31	639,85±372,86	0,602

Polikistik overi olan olgularda foliküler sıvı FSH ve P düzeyleri anlamlı düşük ve E2 düzeyleri (ort±sh) anlamlı yüksek izlendi (Tablo XXVI). Polikistik over olmasıyla foliküler sıvı GDF9 ve BMP15 düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel ilişki saptanmamıştır.

Tablo XXVI: Polikistik overi olmasına göre foliküler sıvı FSH, E2 ve P düzeyleri

n=97	Polikistik over var (n=24)	Polikistik over yok (n=73)	P değeri
FSH(mIU/ml)	5,11±0,78	9,23±0,65	p<0,01
E2(ng/ml)	870,49±87,08	587,36±35,30	p<0,01
P(µg/ml)	8,92±0,62	11,84±0,43	p<0,01

5. TARTIŞMA

Günümüze kadar, overyen foliküler gelişimin, sadece hipotalamik-pitüiter-overyen sistemin endokrinolojik kontrolünde olduğu düşünülmüşse de, artık intraovaryen faktörlerin de etkili olduğu gösterilmiştir. Oositin folikülogenez boyunca, folikül gelişimi, organizasyonu ve somatik hücre fonksiyonunda temel faktör olduğuna dair kanıtlar da her geçen gün artmaktadır.

Günümüzde IVF’te oosit kalitesinin değerlendirilmesi en önemli unsurlardan biridir. Oosit yeterliliği; oositin mayotik maturasyonunu, fertilizasyonunu tamamlayabilmesini ve iyi kalitede embryo oluşturarak başarılı gebelik oluşturabilmesini kapsamaktadır. Yüksek kalitede embryoların elde edilmesi ve başarılı gebelik elde edilmesi için oositin yeterli olması gerektiği açıktır. Şimdiye kadar oosit seçiminde sitoplazma, polar cisimcik ve perivitellin aralık gibi çeşitli morfolojik parametreler kullanılmıştır (3). Biz de çalışmamızda oosit morfolojisini değerlendirmede şimdiye kadar diğer çalışmalarda belirlenmiş üç ayrı oosit evrelemesi kullandık (33,36,69). Bu çalışmalarda oosit evrelemesi ile embryo kalitesi arasında korelasyon saptanmıştır. Fakat oosit morfolojisi ile embryo kalitesi arasında korelasyon saptanmayan başka çalışmalar da mevcuttur (35,71,72). Çalışmamızda sitoplazması normal ve anormal olan gruplar arasında ve oosit gradelemesinin perivitellin aralık ve polar cisimciğe bakılarak yapıldığı evrelemede gruplar arasında GDF9, BMP15 proform ve matur düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo XI,XII). MOMS oosit skorlama sistemi ile de bu iki parakrin faktör arasında herhangi bir korelasyon izlenmemiştir. Sadece Mikkelsen ve ark’nın yaptığı oosit gradelemesine göre hiç bir anomalisi olmayan oosit grubunda BMP15 matur düzeyleri anlamlı yüksek saptanmıştır (Tablo XIII, $p<0,05$) (69). Çalışmamızda kullandığımız oosit morfolojik gradeleri ve oositlere ait embryo kaliteleri arasında da istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo XX, XXI). Bu bulgu, oosit morfolojisinin subjektif bir değerlendirme olduğunu ve oosit morfolojisi ile embro kalitesi arasındaki ilişkinin de tartışmalı olduğunu desteklemektedir. GDF9 ve BMP15 düzeyleri ile oosit morfolojisi arasında anlamlı ilişki saptamamız da muhtemelen buna bağlı olabilir. Bu bulgular oositin yeterliliğini değerlendirmede moleküler tanı testleri gibi daha objektif testlere ihtiyaç olduğunu da göstermektedir.

Oositin nükleer maturasyonunun değerlendirilmesinde ışık mikroskopu altında perivitellin aralıkta bir polar cisimciğin gözlenmesi yeterlidir ve değerlendirilmesinde daha az parametre olması ile sitoplazmik değerlendirmeye göre daha objektif bir bulgudur. Oositlerin nükleer

maturasyonlarına bakıldığında GDF9 proform, BMP 15 proform ve matur düzeyleri ile anlamlı ilişki saptanmazken, GDF9 matur düzeyleri metafaz II oosit grubunda anlamlı yüksek saptanmıştır ($p<0.05$, Tablo X). Bu bulgu oositin dejenere olmayıp nükleer maturasyonunu tamamlamasında GDF9 matur formun gerekli olduğunu düşündürmektedir.

Fertilizasyon ve klivaj sonuçlarına göre GDF9 ve BMP15 düzeyleri ile gruplar arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo XV,XVI). Bu bulgu klivaj olmamış embryo sayımızın az olmasından kaynaklanabilir. Wu ve ark.'nın yaptığı yakın zamandaki bir çalışmada foliküler sıvı BMP15 düzeyleri ile fertilizasyon, klivaj ve embryo kalitesi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (73). Fakat bu çalışmanın sonuçları yöntem olarak çelişkilidir. Çünkü GDF9 ve BMP15 diğer TGF- β ailesi üyeleri gibi posttranlasyonel modifikasyona uğrayan, yani pre-protein formunda oluştuktan sonra proteolitik klivaja uğrayarak proformun ayrılmasıyla matur hale dönüşen proteinlerdir. Daha sonra da hem birbirleriyle hem de kendi kendileriyle birleşerek homo ya da heterodimer oluşturabilirler (11). Çalışmada BMP15'in hangi formuna bakıldığından bahsedilmemiştir ve western blot analizi indirgenmemiş koşullarda yapılmıştır. Fakat bizim çalışmamızda western blot analizi indirgenmiş koşullarda yapıldığı için homo ya da heterodimer formlar değerlendirilmemiş bu proteinlerin monomerik konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Bu konudaki yapılmış tek çalışmanın sonuçları ile bizim çalışma sonuçlarımız arasındaki fark da buna bağlı olabilir.

2.gün embryo kalitesine bakıldığında BMP15 proform, matur ve GDF9 proform düzeyleri ile embryo kalitesi arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. GDF9 matur düzeyleri ise daha iyi kalitedeki embryolara ait folikül sıvısında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (Tablo XVI, $p<0,01$). Tüm hastalarda bu iki parakrin faktörün proformları saptanabilmişken, matur formları bazı hastalarda saptanabilmiştir. 2. ve 3. gün embryo kalitesinin ise folikül sıvısında GDF 9 matur form saptanan hasta grubunda anlamlı olarak daha iyi olması bu parakrin faktörün proformdan matur forma dönüşebilmesinin bile embryo kalitesini arttırdığını göstermektedir. Bu bulgular proteolitik klivaj basamağının bazı hastalarda belli nedenlerle sağlanamadığını ve bu hastalarda GDF9 matur formunun oluşmamasının embryo kalitesini olumsuz etkilediğini göstermektedir.

Klinik gebelik sonuçlarına bakıldığında da klinik gebelik olan olgularda GDF9 matur düzeylerinin anlamlı daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo XIX, $p<0,05$). BMP15 proform,

matur ve GDF9 proform düzeyleri ile klinik gebelik arasında ise istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır.

GDF9 ve BMP15 yakın zamanda keşfedilen proteinler oldukları için, biyolojik özellikleri daha tam anlamıyla çözülememiştir. Ayrıca bu moleküllerin birbirleriyle ve diğer parakrin faktörlerle ilişkileri de netlik kazanmamıştır. Bizim bulgularımıza göre GDF9'un proteolitik klivaja uğrayarak matur hale gelmesi ve GDF9 matur düzeylerinin yüksek olması oosit maturasyonu, embryo kalitesi ve klinik gebelik sonuçlarını olumlu etkilemektedir. BMP15 proform ve matur düzeyleri ile ilişki saptayamamızın nedeni bu iki proteinin heterodimer ya da homodimer formlarının değerlendirilememesinden kaynaklanabilir. Daha önceki çalışmalarda BMP15'in posttranslasyonel modifikasyonunun türler arasında değişebileceği de öne sürülmüştür(46). McIntosh ve ark'nın yaptığı çalışmada, recombinant fare GDF9 ve BMP15'in birbirleriyle ilişkisine bakıldığında ortamda BMP15 olsun ya da olmasın GDF9'un matur formunun daha çok homodimer oluşturduğu, BMP15'in ise daha çok monomerik proform, matur ve preprotein halde kaldığı saptanmıştır (74). McMahon ve ark'nın yaptığı yakın zamanlı bir çalışmada da bu iki proteinin posttranslasyonel fosforilasyonunun in vitro biyolojik aktivitelerinde etkili olduğu gösterilmiştir (75). Saito ve ark'nın yaptığı çalışmada ise recombinant BMP15 matur proteinde fosforilasyon, o-glikozilasyon ve kısalma gibi posttranslasyonel modifikasyonlar saptanmıştır (76). Başka bir çalışmada da BMP15 mutasyonunun insan recombinant BMP-15'inin matur formunun biyolojik aktivitesini değiştirmedeği, fakat proproteinlerin posttranslasyonel modifikasyonunu ve matur proteinin salgılanmasını olumsuz etkilediği gösterilmiştir. İlginç olan bu mutasyonların etkilerinin BMP15 mutant formun GDF9'la birlikte ekspresyonu olduğunda saptanmış olmasıdır (77). McNatty ve ark'nın çalışmasında BMP15 ve GDF9'un granuloza hücre fonksiyonu regülasyonunda tek başlarına etkilerine göre birlikte etkilerinin daha fazla olduğu da gösterilmiştir (55). Bizim çalışmamızda da GDF9 matur ve BMP15 matur düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmıştır. Bu bulgular ve bizim çalışmamızın sonuçları da BMP15'in fonksiyonunda ve gebelik sonuçlarını etkilemesinde, düzeylerinden çok posttranslasyonel yolların ve GDF9 ile etkileşmesinin ve heteromerik formların etkili olabileceğini düşündürmektedir.

İnfertilite nedenine göre bakıldığında gruplar arasında GDF9 ve BMP15 proform ve matur düzeyleri açısından fark saptanmamıştır. Filho ve ark'nın yaptığı çalışmada polikistik over sendromu olan hastalardan alınan over dokusu örneklerinde primordial, primer ve küçük antral

folliküllerde oositlerde kontrol grubuna göre GDF9 ekspresyonunda azalma saptanmıştır(59). Aynı çalışmada BMP15 ekspresyonunda ise farklılık saptanmamıştır. Fakat bu çalışmada over biyopsisi ile inceleme yapılmış ve hastalar ovulasyon indüksiyonu amaçlı gonadotropin kullanmamıştır. Bizim polikistik overli hastalarımızda fark saptanmaması buna ya da olgu sayısının az olmasına bağlı olabilir.

Çalışmamızda foliküler sıvı hormon düzeyleri ile GDF9 ve BMP15 arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmamıştır. Li ve ark'nın farelerde yaptığı çalışma sonuçlarına göre in vitro gonadotropin ve in vivo FSH uygulaması ile overyen GDF9 ekspresyonunun arttığı, BMP15 ekspresyonunun ise değişmediği saptanmıştır (78). Spicer ve ark'nın sığırlarda yaptığı çalışmada GDF9'un FSH'a bağlı östradiol ve progesteron üretimini inhibe ederek granuloza hücrelerinin prematür luteinizasyonunu engellediği saptanmıştır (79). Yamamoto ve ark. da insan granuloza hücre kültürlerinde GDF9'un progesteron üretimini inhibe ettiğini saptamıştır(54). Vitt ve ark'nın çalışmasında granuloza hücre kültürüne GDF9 tek başına eklendiğinde bazal steroidogenezi arttırdığı , FSH'la birlikte eklendiğinde ise FSH'a bağlı progesteron ve östrojen üretimini baskıladığı saptanmıştır. Buna göre GDF9'un erken antral ve preovulatar foliküllerde proliferatif etkisi olduğu fakat FSH bağımlı farklılaşmayı inhibe ettiği sonucuna varılabilir (62). Elvin ve ark'nın farelerde yaptığı çalışmada ise GDF9'un bazal progesteron üretimini arttırdığı saptanmıştır (80). Çalışmalar arasındaki farklı sonuçlar türler arası farklılık ya da kültür şartlarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Çalışmamızda hormon düzeyleri ile bu parakrin faktörler arasında korelasyon saptanmaması hastaların ovulasyon indüksiyonu almasına bağlı olarak hormon düzeylerinin etkilenmesiyle ilişkili olabilir. Çünkü tedavide kullanılan gonadotropin dozunda artışa bağlı olarak foliküler sıvı FSH ve P düzeyleri de istatistiksel anlamlı artış göstermiştir ($p<0,05$).

Çalışmamızda foliküler sıvı hormon düzeyleri (FSH, E2, P) ile nükleer maturasyon, oosit morfolojisi, fertilizasyon, klivaj ve embryo kalitesi arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı. Şimdiye kadar bu konuyla ilgili yapılmış çalışma sonuçları da çelişkilidir. Bazı çalışmalarda foliküler sıvı hormon seviyeleriyle fertilizasyon, embryo kalitesi arasında ilişki saptanmazken, bazılarında yüksek E2 ve P seviyeleri ile oosit maturasyonu ve fertilizasyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (81-85). Tarlatzis ve ark'nın çalışmasında ise matur oositlerin foliküler sıvı östradiol ve progesteron seviyeleri immatur oositlere göre daha düşük saptanmıştır (86). Laufer ve ark'nın yaptığı çalışmada ise foliküler sıvı FSH düzeyi ile fertilizasyon arasında

anlamli iliŖki gözlenirken embryo geliŖimi arasında iliŖki saptanmamıŖtır (87). Kreiner ve ark'nın yaptığı alıŖmada foliküler sıvı E2 ve E2/P düzeyleri ile klinik gebelik arasında anlamli iliŖki saptanmıŖtır (88). alıŖmamızda klinik gebelik olan olgularda foliküler sıvı FSH düzeyi istatistiksel olarak anlamli dŖk izlenmiŖtir. IVF sikluslarında foliküler hormon düzeyleri gonadotropin dozlarından ve pitüiter supresyondan etkilenebilirler. Foliküler FSH düzeyinin alınan gonadotropin dozu ile istatistiksel anlamli korelasyon göstermesi de bunu desteklemektedir. Daha yüksek oranda gonadotropine ihtiya duyulan hasta grubunda klinik gebeliğin daha dŖk olması da beklenebilir.

alıŖmamızda ultrasonografik incelemede polikistik overi olan olgulara bakıldığında foliküler sıvı FSH ve progesteron düzeyleri anlamli dŖk ve östradiol düzeyleri anlamli yüksek saptanmıŖtır. GDF9 ve BMP15 düzeyleri ile ise anlamli iliŖki saptanmamıŖtır. Messerlian ve ark'nın alıŖmasında da polikistik over hastalığı olan olgularda gonadotropinle indüksiyon sonrası foliküler sıvı FSH ve P düzeyleri anlamli dŖk bulunmuŖtur (89). Desforjes ve ark'nın yakın zamanlı bir alıŖmasında ise IVF yapılan PCOS'lu hastaların foliküler sıvı FSH ve AMH düzeylerine bakılmıŖ ve FSH düzeyleri anlamli dŖk, AMH düzeyleri anlamli yüksek saptanmıŖtır (90). Bu durum da PCOS'lu olgularda FSH'ın bozulmuŖ foliküler etkinliğine bađlanmıŖtır.

GDF9 ve BMP15 insan overinde primer foliküler evreden itibaren eksprese olan iki parakrin faktördür (44, 45, 91). YapılmıŖ alıŖmalarda GDF9'un kumulus hücre progesteron sentezini düzenlenmek, LH reseptör ekspresyonunu baskılamak, granuloza hücre geliŖimini ve kumulus hücre ekspansiyonunu uyarmak gibi fonksiyonları gsterilmiŖtir (79,92,93). Shimizu ve ark'nın yaptığı alıŖmada immatur diŖi farelerde overe tek doz GDF9 gen enjeksiyonu ile antral folliküllerde büyüme saptanmıŖtır (94). İn vitro koŖullarda rekombinant GDF9 uygulaması ile insan ve farelerde erken folliküler geliŖim uyarılmıŖtır (95,96). Vitt ve ark'nın yaptığı alıŖmada da farelerde in vivo GDF9 uygulamasıyla primer ve antral folikül sayısında artma saptanmıŖtır (97).Orisaka ve ark'nın alıŖmasında farelerde eksojen GDF9 eklenmesiyle preantral folikülden erken antral foliküle geiŖ aŖamasında granuloza hücre apoptozisinin ve foliküler atrezinin engellendiği saptanmıŖtır (6). Hussein ve ark'nın sığırlarda in vitro maturasyon (IVM) alıŖmasında GDF9 ve BMP15'in kumulus oosit kompleksi ortamına eklenmesiyle embryo kalitesinin ve trofektoderm hücre sayısının arttığı gsterilmiŖtir (66). Yeo ve ark'nın yakın zamanlı alıŖmasında da farelerde oosit maturasyon medyumuna eksojen GDF9 eklenmesiyle

embryo gelişiminin ve fetal viabilitenin arttığı saptanmıştır (98). Bizim çalışma sonuçlarımıza göre de GDF9 matur formu ile IVF sonuçlarında iyileşme gözlenmesi yukarıdaki literatürde hayvan çalışmalarında kültür medyumlarına recombinant GDF9 eklenmesiyle elde edilen olumlu sonuçları desteklemektedir. Fakat bu bulguların insan kültür medyumları ile yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızın eleştiriye açık olan noktalarından birisi, tek bir folikül sıvısı örneği ile klinik gebelik sonuçları arasında korelasyon saptamamız olabilir. Tek bir folikül sıvısının tüm overyen kohortu yansıtmayacağı bir gerçektir. Fakat tüm kohorttan yıkama yapılmadan foliküler sıvı alabilmek hastaların tedavi sonuçlarını etkileyebileceğinden mevcut şartlarla etik açıdan mümkün görünmemektedir. Foliküler sıvı FSH düzeyleri ile alınan gonadotropin dozu arasında anlamlı korelasyon saptanması ise tek bir folikül sıvısının plazma ve diğer kohorttaki folikül sıvıları ile korrele olabileceğini de düşündürmektedir. Embryo kalitesinin yüksek olması implantasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir (99). Biz de çalışmamızda foliküler sıvı GDF9 matur düzeylerinin artmasıyla embryo kalitesinin arttığını saptadık. Bu da dolaylı olarak GDF9 matur ve gebelik oranları arasındaki ilişkiyi açıklayabilir.

Oositin maturasyonu nükleer ve sitoplazmik maturasyonu birlikte kapsamaktadır. Nükleer maturasyon ilk polar cisimciğin gözlenmesiyle direk değerlendirilebilmekte fakat sitoplazmik maturasyon tam olarak değerlendirilememekte, sitoplazmanın morfolojik görünümüne bakılmakta, ve oositin sonraki fertilizasyon ve embryo gelişimine göre karar verilmektedir. Bizim çalışma sonucumuza göre de GDF9 matur düzeyleri ile embryo kalitesi arasında pozitif ilişki saptanması bu parakrin faktörün sitoplazmik maturasyonda da rol aldığını düşündürmektedir.

6. SONUÇ

Çalışma sonuçlarımıza göre; ilk olarak in vivo foliküler sıvı GDF9 matur düzeyinin artışı ile oosit nükleer maturasyonu, embryo kalitesi ve klinik gebelik sonuçları anlamlı artış göstermektedir. Bu araştırma insanda IVF sikluslarında GDF9 proform ve matur düzeyleri ile oosit ve embriyo kalitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır. Hayvanlarda yapılmış önceki IVM çalışmaları ve bizim çalışma sonuçlarımız ART'de insan oosit maturasyon medyumuna GDF9'un matur formunun eklenmesinin embryo gelişimi için faydalı olacağını düşündürmektedir.

İkinci olarak çalışmamızda oositin çeşitli morfolojik değerlendirmeleri ile embryo kalitesi arasında ilişki ortaya koyamamamız morfolojik değerlendirmenin subjektif bir bulgu olduğunu oosit değerlendirmesinde daha objektif kriterlere ihtiyaç olduğunu ve sonraki embryo kalitesini öngörme açısından GDF9 matur form gibi oositin salınan parakrin faktörlerin ölçümünün kullanılabilmesini göstermektedir.

Üçüncüsü; çalışma sonuçlarımız (GDF9 proform, BMP15 proform ve matur form ile IVF sonuçları arasında ilişki saptamamız) GDF9 ve BMP15 fonksiyonunda ilk salgılanma düzeylerinden çok, proteolitik klivaj, homo ya da hetero dimerizasyon ve posttranlasyonel modifikasyonlar gibi faktörlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu iki proteinin fonksiyonlarının türler arası farklılık göstermesinden dolayı bu konuda insanda yapılacak moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak IVF başarısını etkileyen faktörlerden olan oosit-embryo kalitesi ve belki de implantasyon başarısını arttırmak için bu çalışmanın bir ön çalışma olarak literatüre katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Lippincott Williams and Wilkins 7 th edition Philadelphia.2005
2. Lan KC, Huang FJ, Lin YC, Kung FT, Hsieh CH, Huang HW, Tan PH, Chang SY. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assesment of embryo survival on day 5. Hum Reprod 2003; 18(6): 1299-1306.
3. Wang Q, Sun QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. Reprod Fertil Dev. 2007; 19(1): 1-12.
4. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals Reproduction 2001; 122: 829-838.
5. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F.Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. J Ovarian Res. 2009; 9: 2-9.
6. Knight PG, Claire G . Focus on TGF- β signaling. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction 2006; 132: 191-206
7. Drummond AE, Dyson M, Le MT, Ethier JF, Findlay JK. Ovarian follicle populations of the rat express TGF-beta signalling pathways. Mol Cell Endocrinol 2003; 202: 53–57.
8. Erickson GF, Shimasaki S. The spatiotemporal expression pattern of the bonemorphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. Reprod Biol Endocrinol 2003; 5: 1-9
9. Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. Mol Endocrinol 2006; 20: 2456-2468.
10. Moore RK, Shimasaki S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. Mol Cell Endocrinol 2005; 234: 67-73.
11. Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR, McNatty KP. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. Anim Reprod Sci, 2004; 82-83: 447-460.
12. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P and Persani L. Hypergonadotrophic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15(BMP15) gene. Am J Hum Genet 2004; 75: 106-111.

13. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 159-177
14. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massbriò M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 4: 7-40
15. Çiçek. N. Temel üreme endokrinolojisi ve infertilite. Palme Yayıncılık 2008.
16. Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA. Reversing natural decline in human fertility: An extended clinical trial of oocyte donation to women of advanced reproductive age. *JAMA* 1992; 268:1275-1279.
17. Van Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Women older than 40 years of age and those elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 79(3): 482- 488.
18. Gulekli B, Bulbul Y, Onvural A, Yorukoglu K, Posaci C, Demir N, Erten O. Accuracy of ovarian reserve tests *Hum Reprod* 1999; 14(11):2822-2826
19. Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle stimulating hormone versus the clomiphene challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 2004; 82(1):180-185.
20. Martin JS, Nisker JA, Tummon IS, Daniel SA, Auckland JL, Feyles V. Future in vitro fertilization pregnancy potential of women with variably elevated day 3 follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril* 1996; 65: 1238-1240.
21. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2 (8085): 366.
22. Ingerslev HJ, Hojgaard A, Hindkjaer J, Kesmodel U. A randomized study comparing IVF in the unstimulated cycle with IVF following clomiphene citrate. *Hum Reprod* 2001; 16: 696-702.
23. Pandian Z, Bhattacharya S, Ozturk O, Serour GI, Templeton A. Number of embryos for transfer following in-vitro fertilization or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004; 18: CD003416.
24. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotropin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 3: CD001750.

25. Huirne JA, Homburg R, Lambalk CB. Are GnRH antagonists comparable to agonists for use in IVF? *Hum Reprod* 2007 ; 22(11): 2805-2813.
26. Coomarasamy A, Afnan M, Cheema D, van der Veen F, Bossuyt PM, van Wely M. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23(2): 310-315.
27. Al-Inany HG, Aboulghar M, Mansour R, Proctor M. Recombinant versus urinary human chorionic gonadotropin for ovulation induction in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 18: CD003719.
28. Bhattacharya S, Hamilton BPR, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, Braude P, Kennedy R, Rutherford A, Hartshorne G, Templeton A. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001; 357:2075-2079.
29. Practice Committee of American Society fo Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive Endocrinology and Infertility. Progesterone supplementation during the luteal phase and in early pregnancy in the treatment of infertility: an educational bulletin. *Fertil Steril* 2008; 89:789-792
30. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results, *Hum Reprod* 1988; 1(2): 81-87
31. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17(2): 121-155
32. Swain EJ, Smith; Mechanism of oocyte maturation. In: Tan SL, Chian RC, Buckett WM editors. *In-Vitro Maturation of Human Oocytes, Basic Science to Clinical Application*, 1st ed. Montreal, Informa Health Care pres. 2007; p: 83-101
33. Rienzi L, Ubaldi FM, Lacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Litwicka K, Greco E. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 2008; 90(5): 16092-1700.
34. Khamsi F, Roberge S, Lacanna IC, Wong J, Yavas Y. Effects of granulosa cells, cumulus cells, and oocyte density on in vitro fertilization in women. *Endocrine* 1999;10:161-166

35. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11:595-597
36. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997; 12:1750-1755
37. Ubaldi F, Rienzi L. Morphological selection of gametes. *Placenta* 2008; 29: 115-120.
38. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12: 1267-1270.
39. Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphological parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* 2007; 22: 230-240
40. Veeck LL. Preembryo grading. *Atlas of the human oocyte and early conceptus*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1991; 2:121-149
41. Craig J, Orisaka M, Wang H, Orisaka S, Thompson W, Zhu C, Kotsuji F, Tsang BK. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 3628-3639.
42. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypothesis. *Endocr Rev.* 1996; 17: 121–155.
43. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 2005; 11(5): 461–471.
44. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ and Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1809-1817.
45. Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 1998; 78: 135-140.
46. Chang H, Brown CW and Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily *Endocr Rev* 2002; 23: 787-823.

47. Liao WX, Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15(BMP-15) and growth differentiation factor 9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *J. Biol. Chem* 2003; 278: 3713-3719.
48. Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, Dodds KG, Walling GA, McEwan JC, O'Connell AR, McNatty KP, Montgomery GW. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod.* 2001; 64: 1225-1235.
49. Souza CJ, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on estradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction* 2002; 123: 363-369.
50. Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath Chang RJ, Erickson GF. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 7282-7287.
51. Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor- β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 144-161.
52. Otsuka F and Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein-15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002a; 99: 8060-8065.
53. Solovyeva EV, Hayashi M, Margi K, Barkats C, Klain C, Amsterdam A, Hsueh AJW, Tsafiri A. Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biol Reprod.* 2000; 63: 1214-1218.
54. Yamamoto N, Christenson LK, McAllister JM, Strauss JF. Growth differentiation factor-9 inhibits 3'-5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(6): 2849-2856.
55. McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome N et al. Bone morphogenetic protein 15 and

- growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction* 2005b; 129: 473-480
56. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N and Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531-535.
57. Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K and Matzuk MM. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol* 1999b; 13: 1018-1034.
58. Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R and Galloway SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 2004; 70: 900-909.
59. Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF. Aberrant Expression of Growth Differentiation Factor-9 in Oocytes of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3): 1337-1344
60. Yan C, Wang P, De Mayo J, De Mayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 854-866.
61. Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, McNatty KP. Effects of immunization against bone morphogenetic 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol Reprod* 2004; 70: 557-561.
62. Vitt UA, Hayashi M, Klein C and Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 2000a; 62: 370-377.
63. Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM and Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor 9- deficient mice. *Dev Biol* 1998; 204: 373-384.
64. Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MPE, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty KP. Growth differentiation

- factor 9 and bone morphogenetic protein are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 2002; 67: 1777-1789.
65. Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 2007; 67: 6-15
 66. Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* 2006; 296: 514-521
 67. Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ. The embryo and its future. *Biol Reprod* 2004; 71: 1046-1054
 68. Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS Concensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81: 19-25.
 69. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality *Hum Reprod* 2001; 16: 1714-1718
 70. Diane M Duffy. Growth Differentiation Factor-9 is expressed by primate follicle throughout the periovulatory interval. *Biol Reprod* 2003; 69:725-732.
 71. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:3431-3433
 72. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 608-615
 73. Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF. 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.
 74. McIntosh CJ, Lun S, Lawrence S, Western AH, McNatty KP, Juengel JL. The proregion of Mouse BMP15 regulates the cooperative interactions of BMP15 and GDF9. *Biol Reprod* 2008; 79: 889-896.
 75. McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S. Phosphorylation of Bone Morphogenetic Protein-15 and Growth and Differentiation Factor-9 plays a critical role in determining agonistic or antagonistic functions. *Endocrinol* 2008; 149(2): 812-817.

76. Saito S, Yano K, Sharma S, McMahon HE, Shimasaki S. Characterization of the post-translational modification of recombinant human BMP-15 mature protein. *Protein Science* 2008; 17: 362-370.
77. Liao WX, Moore RK, Shimasaki S. Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. *J Biol Chem* 2004; 17:17391-17396.
78. Li CY, Zhao YR, Chen ZJ, Zhao LX, Fan XL, Sheng Y, Tang R. Effects of gonadotropin on the expression of growth differentiation factor 9 and 9B in Mouse ovary. *Abstract. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2006; 41(12): 806-809.
79. Spicer LJ, Aad PY, Allen D, Mazrbourg S, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *J Endocrinol* 2006; 189(2): 329-339
80. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *PNAS* 2000; 97: 10288-10293
81. Pellicer A, Valbuena D, Bauset C, Albert C, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril* 1998; 69: 1135-1141.
82. Fujiwara T, Lambert-Messerlian G, Sidis Y, Leykin L, Isaacson K, Toth T, Schneyer A. Analysis of follicular fluid hormone concentrations and granulosa cell mRNA levels for the inhibin-activin- follistatin system: relation to oocyte and embryo characteristics. *Fertil Steril* 2000; 74: 348-355.
83. Asimakopoulos B, Abu- Hassan D, Metzen E, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008. 90(1): 60-64.
84. Lindner C, Lichtenberg V, Westhof G, Braendle W, Bettendorf G. Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. *Horm Metab Res* 1988; 20(4): 243-246.

85. Botero-Ruiz W, Laufer N, DeCherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil Steril* 1984; 41: 820-826.
86. Tarlatzis BC, Pazaitou K, Bili H, Bontis J, Papadimas J, Lagos S, Spanos E, Mantalenakis S. Growth hormone, estradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. *Hum Reprod* 1993; 8: 1612-1616.
87. Laufer N, Botero-Ruiz W, De Cherney AH, Haseltine F, Polan ML, Behrman HR. Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58: 430-434.
88. Kreiner D, Liu HC, Itskovitz J, Veeck L, Rosenwaks Z. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality. *Fertil Steril* 1987; 48: 991-994
89. Lambert-Messerlian G, Taylor A, Leykin L, Isaacson K, Toth T, Chang YC, Schneyer A. Characterization of intrafollicular steroid hormones, inhibin and follistatin in women with and without Polycystic Ovarian Syndrome following gonadotropin hyperstimulation. *Biol Reprod* 1997; 57: 1211-1216.
90. Desforges-Bullet V, Gallo C, Lefebvre C, Pigny P, Dewailly D, Catteau-Jonard S. Increased anti-mullerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009 April Epub ahead of print
91. Aaltonen J, Laitinen MP, Vujolainen K, Jaatinen R, Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R, Hovatta O, Dale L, Ritvos O. Human Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) and Its Novel Homolog GDF-9B Are Expressed in Oocytes during Early Folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(8): 2744-2750.
92. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999a; 13:1035-1048.
93. Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic RA, Hickey TE, Ritvos O, Motteshead DG. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J Cell Sci* 2006; 119:3811-3821.

94. Shimizu T, Iijima K, Ogowa Y, Miyazaki H, Sasada H, Sato E. Gene injections of vascular endothelial growth factor and growth differentiation factor-9 stimulate ovarian follicular development in immature female rats. *Fertil Steril* 2008; 89: 1563-1570
95. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, Duin MV, Hsueh AJW. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 1999; 140: 1236-1244.
96. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJW, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 316-321.
97. Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJW. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 2000; 141(10): 3814-3820.
98. Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG, Lane M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum Reprod* 2008; 1: 67-73.
99. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos : a preliminary study. *Hum Reprod* 2000; 15: 2190-2196.