



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

**DÜŞÜK DOZ VE YÜKSEK DOZ GONADOTROPİNLER
İLE OVULASYON İNDUKSİYONU YAPILAN KÖTÜ
OVER YANITLI HASTALARDA LUTEİNİZE
GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE SURVİVİN VE HIF-1 α
GEN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Günel ELİYEVA

KAYSERİ-2017



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**DÜŞÜK DOZ VE YÜKSEK DOZ GONADOTROPİNLER
İLE OVULASYON İNDUKSİYONU YAPILAN KÖTÜ
OVER YANITLI HASTALARDA LUTEİNİZE
GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE SURVİVİN VE HIF-1 α
GEN EKSPRESYONUN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Günel ELİYEVA

Danışman

Prof. Dr. Ercan M. AYGEN

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafindan TTU-2017-6587 No'lu Kod ile Desteklenmiştir.**

KAYSERİ-2017

TEŞEKKÜR

Tez sürecinde engin bilgi ve tecrübesinden istifade ettiğim, bana yol gösteren ve bana her konuda destek olan Tez Danışmanım, çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Ercan M. AYGEN'e şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmam süresince yardımcı olan tüp bebek ünitesinin değerli hemşire, embriyolog ve personeline, tezimin genetik çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Serpil Taheri ve ekibine çok teşekkür ediyorum.

Duruş ve davranışlarıyla hem meslekî, hem sosyal hayatta dürüstlük ve adaleti her şeyin üzerinde tutan, bana uzmanlık eğitimim süresince büyük bir özveri ile her konuda yardımcı olan ve desteklerini her zaman arkamda hissettiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Yılmaz ŞAHİN'e saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Mesleğimi öğrenmem de bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her konuda etik kuralları en önde tutan ve bu doğrultuda yetişmeme vesile olan, çok değerli hocalarıma bana kattıkları herşey için teşekkürlerimi sunarım.

Bütün eğitim sürecinde bana hem mesleki, hem sosyal alanda her zaman destek olan, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen sonsuz sabır ve özveri gösteren çok sevgili Op. Dr. Ayça Nazlı BULUT'a sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Bu zorlu süreçte bana her konuda destek olan sevgili eşim Dr. Bayram BAYRAMOV'a şükranlarımı sunuyorum.

Uzmanlık eğitiminin en zor zamanlarında bana destek olan ve bu sürecin çok daha verimli geçmesini sağlayan tüm asistan arkadaşlarım ve hastane personeline teşekkürlerimi sunarım.

Günel ELİYEVA

Haziran 2017, KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ	1
TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	iv
TABLolar LİSTESİ	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İNFERTİLİTE	5
2.1.1. İnfertilite Nedenleri.....	5
2.1.2. İnfertil Çiftlerin Değerlendirilmesi.....	6
2.1.2.1. Klinik değerlendirme	7
2.1.2.2. Tanısal Araştırmalar.....	7
2.1.2.3. Ovulatuvar Fonksiyon.....	7
2.1.2.4. Ovaryan Rezerv.....	8
2.1.2.5. Uterin Anormallikler.....	10
2.1.2.6. Tubal Açıklık	10
2.1.2.7. Peritoneal Faktörler.....	11
2.1.3. IVF/ICSI İçin Hasta Seçimi.....	12
2.1.3.1. IVF için KOH'a Kötü Yanıt Verenler.....	13
2.2. Biyokimyasal Markerlar	16
2.3. Apoptozis	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Granüloza Hücrelerinden RNA İzolasyonu.....	34
3.2. cDNA Eldesi.....	34
3.3. Preamplifikasyon Aşaması	36
3.4. Real-Time PCR	37

3.5. Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Hasta Karakteristikleri	39
4.2. Siklus Parametreleri	41
4.3. Oosit ve Embriyo Sonuçları	43
4.4. Gebelik Sonuçları	43
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR	64
KAYNAKLAR	65
TEZ ONAY SAYFASI.....	72

KISALTMALAR

AFS	: Antral folikül sayısı
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
BIRCH5	: Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5
CC	: Klomifen sitrat
CCCT	: Klomifen sitrat challenge test
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
E2	: Estradiol
EFORT	: Eksojen FSH ovaryan rezerve test
eNOS3	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
ESHRE	: European Society of Human Reproduction and Embryology
FSH	: Follikül stimüle edici hormon
GAST	: GnRH agonist Stimulasyon test
GnRH	: Gonadotropin releasing hormon
HCG	: Human koryonik gonadotropin
HIF-1α	: Hipoxia inducible factor-1 α
hMG	: Human menapozal gonadotropin
HSG	: Histerosalpingografi
IAP	: Apoptozis inhibitör proteini
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	: İn vitro fertilizasyon
IVF-ET	: İn vitro fertilizasyon-Embriyo transferi
KOH	: Kontrollü ovaryen hiperstimülasyon
LH	: Lüteinizan hormon
ORT	: Over rezerv testi
OXSR1	: Oxidative stress responsive 1
PKOS	: Polikistik over sendromu
TERT	: Telomeraz Revers Transkriptaz
TSH	: Tiroid stimulan hormon
USG	: Ultrasonografi
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Hastaların demografik özellikleri ve bazal hormon değerleri	40
Tablo 2. Grupların kullanılan r-FSH dozu ve stimülasyon süreleri, HCG günü E ₂ ve P açısından karşılaştırılması. Aspire edilen folikül sayısı, Toplanan oosit sayısı, Matür oosit sayısının gruplara göre dağılımı	42
Tablo 3. Fertilizasyon oranı, oluşan embriyo sayısı, transfer edilen embriyo sayısı ve transfer gününün gruplar arasında karşılaştırılması	45
Tablo 4. Kötü over yanıtı ve normal over yanıtı hastalarda granüloza hücrelerinde genlerin ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması	47
Tablo 5. Düşük ve yüksek doz tedavi verilen ve matür oosit elde edilen, matür oosit elde edilemeyen hastalarda Survivin, HİF-1 α , SMAD5, OXSR1, gen seviyelerinin karşılaştırılması	48

**DÜŞÜK DOZ VE YÜKSEK DOZ GONADOTROPİNLER İLE OVULASYON
İNDÜKSİYONU YAPILAN KÖTÜ OVER YANITLI HASTALARDA
LUTEİNİZE GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE SURVİVİN VE HİF-1 A GEN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Amaç: Kötü over yanıtli hastalarda düşük ve yüksek doz gonadotropinler ile yapılan

KOH'da granüloza hücrelerindeki survivin, HIF-1 α , SMAD5, OXSR1, eNOS, TERT gen ekspresyon düzeylerini araştırmaktır.

Yöntem ve gereçler: Çalışma yüksek (Grup 1 n:11) ve düşük doz (Grup 2 n:9) gonadotropinler ile KOH yapılan kötü over yanıtli olduğu tespit edilen 30 hasta ve normal ovaryan yanıtli 16 hasta ile yapılmıştır. Grup 1 hastalara siklusun 2-3. günü 375 IU FSH+75 IU LH başlandı. Grup 2 hastalara siklusun 2-3. gününden başlayarak 5 gün süreyle 100 mg CC ve siklusun 6.günü 187.5 IU/gün rFSH+75 IU/gün rLH başlandı. Her iki gruba dominant folikül >14 mm olduğunda hCG gününe kadar 0.25 mg/gün GnRH antagonisti eklendi. Kontrol grubu olarak normal ovaryan yanıtli hastalara 225 IU FSH+75 IU LH başlandı. En az 2 tane >18 mm folikül gelişimi olduğunda hastalara 250 μ g of hCG yapıldı ve 36 saat sonra OPU yapıldı. Granüloza hücrelerinden Real Time PCR ile Survivin ve HIF-1 α , gen ekspresyonu belirlendi.

Bulgular: Antral folikül sayısı, HCG günü E2, P, aspire edilen folikül sayısı, toplanan oosit sayısı ve matür oosit sayısında, 1. grup ve 2. grup hastalar arasında fark izlenmezken, normal over yanıtli hastalarda, diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Stimülasyon süresi tüm gruplarda benzer olarak bulunmuştur.

2. grupta toplam kullanılan gonadotropin dozu diğer gruplara göre anlamlı derecede az olarak bulundu. Tüm gruplar arasında fertilizasyon oranları, transfer edilen embriyo sayıları, klinik gebelik oranları arasında fark bulunmadı. 1. grup ve 2. grup hastalar arasında oluşan embriyo sayılarında fark yokken, kontrol grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulundu. 1. grup ve 2. grup hastalarda survivin ve HIF-1 α ekspresyonları arasında fark izlenmezken, kontrol grubunda 2. gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca 1.grup hastalarda da kontrol grubuna göre survivin ekspresyonu

anlamli olarak daha fazladir. 1. grup ve 2. grup hastalarda matür oosit alınan ve alınmayan hastalarda survivin ve HIF-1 α ekspresyonları arasında anlamlı farklılık izlenmedi. Tüm gruplarda gebelik olan ve olmayan hastalar arasında survivin ekspresyonu için istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi.

Sonuç: Düşük doz gonadotropin kullanımı klinik sonuçlara olumsuz etki etmezken tedavi maliyetini düşürmüştür. Yüksek doz gonadotropin kullanımının survivin ve HIF-1 α ekspresyon düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı olmasada artırdığı gösterilmiştir. Yüksek doz gonadotropin kullanımı granüloza hücrelerinde HIF-1 α düzeyini arttırmıştır ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir. Düşük doz tedavi uygulanan hastalarda istatistiksel anlamlı olmamak ile birlikte OXSR1 ve SMAD5 gen ekspresyonlarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Hem kötü over yanıtı hem de normal over yanıtı hastalarda granüloza hücrelerinde eNOS ve TERT ekspresyonu elde edilememiştir.

Buna bağlı olarak survivin ekspresyonundaki artış alınan matür oosit sayısını artırarak IVF-ET başarısına katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Kötü over yanıtı, Survivin, IVF, HIF-1 α , SMAD5, OXSR1, eNOS, TERT.

**COMPARISON OF EFFECTS OF MILD AND HIGH DOSE OVARIAN
STIMULATION PROTOCOLS ON LUTEINIZED GRANULOSA CELL
SURVIVIN GENE AND HIF 1 α GENE EXPRESSIONS IN POOR RESPONDER
PATIENTS**

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to evaluate survivin, HIF-1 α , SMAD5, OXSR1, eNOS, TERT gen expression in granulosa cells from infertile patients.

Material and Methods: The Study included 36 patients with poor ovarian response who have used either high (group 1, n:11) and low dose gonadotropins (group 2, n:9) and 16 patients with normal ovarian response.

Patients in the group 1 were given 375 IU FSH + 75 IU LH starting from cycle day 2-3. When one or more follicles reached 14 mm in size, gonadotropin relasing hormone (GnRH) antagonist 0.25mg, was introduced. Patients in the group 2, were given 100 mg of clomiphene daily for five days, starting from cycle day 2-3, followed by administration of 187,5 IU recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) +75 IU luteinizing hormone (LH), Patients with normal ovarian response were given 225 IU FSH+75IU LH. When at least two follicles reached >18 mm in size, 250 μ g of recombinant human chorionic gonadotropin (hCG) was administered and oocytes were retrieved approximately 36 hours after hCG administration. Survivin and HIF 1 α gene expression was determined by real time polymerase chain reaction (PCR) in the granulosa cells.

Result: There was no differences in the antral follicle count, hCG day estradiol (E2) levels, hCG day progesterone (P), number of aspirated follicles, oocytes retrieved and the mature oocytes between group1 and group 2 but these parameters were higher in patients with a normal ovarian response. The time of the stimulation were similar in group 1, group 2 and control group. There were no difference in fertilization rates, number of transferred embryos and clinical pregnancy between group 1, group 2 and control group. There was no differences in the number of embryos between group1 and group 2, but was higher in patients with a normal ovarian response. There was no statistically significant difference between group 1 and 2 with regard to survivin

($p > 0,05$) and HIF-1 α expression ($p > 0,05$). Survivin and HIF-1 α levels were found to be higher in group 1 compared with control group ($p < 0,05$) and the group 2 was significantly lower levels of survivin expression than control group ($p < 0,05$). The genes expression level of survivin and HIF-1 α were not significantly different in patients from whom mature oocytes were obtained than those were not. The genes expression level of survivin and HIF-1 α were similar in pregnant and nonpregnant patients in all groups

Conclusion: The low dose gonadotrophin stimulation does not negatively affect IVF outcome, and additionally, has lower cost than high dose stimulation protocol. The use of low dose gonadotrophin stimulation increases survivin and HIF-1 α expression, albeit the trend can not reach statistical significance. The high levels of survivin and HIF-1 α , may increase the number of mature oocytes retrieved and may contribute to success of IVF. The use of high-dose gonadotropin in poor responders in granulosa cells HIF-1 α levels increased, but this was not statistically significant. Low-dose treatment in patients with higher gene expression of SMAD5 and OXSR1 not to be statistically significant was observed. Both in normal and poor over responders in granulosa cells eNOS and TERT genes expression could not be obtained. Our results should be confirmed by further studies including larger patient populations.

Key Words: Poor ovarian response, Survivin, HIF-1 α , IVF, SMAD5, OXSR1, eNOS, TERT.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, yaygın bir klinik problemdir. Tüm dünyada çiftlerin %13-15'ini etkilemektedir [1]. Yardımla üreme teknikleri (YÜT) olan IVF ve ICSI, gebelik elde edemeyen çiftler için son basamak tedavi olarak uygulanmaktadır. IVF/ICSI başarısında çiftlerin özelliklerini iyi belirlemek önem teşkil etmektedir. Bu bağlamda, hastaya göre ayarlanan kontrollü over hiperstimülasyon protokolleri (KOH) ile daha fazla gebelik oranı ve daha az istenmeyen yan etki elde etmek amaçlanmaktadır. KOH'un amacı, iyi kalitede, fertilize olabilen oosit elde edebilmek ve bu sayede en uygun erken embriyo gelişimi ve başarılı embriyo transferi sağlayabilecek çok sayıda follikül toplanmasıdır [2].

Ovaryan stimülasyona başlamadan önce hastanın over rezervinin belirlenmesi ve stimülasyon protokolünün bu doğrultuda belirlenmesi önem arz etmektedir. Bir hastayı 'kötü over yanıtı' (Poor Ovarian Responder; POR) olarak kategorize etmede çeşitli özelliklerin standardize edilmesi zor olmak ile birlikte, IVF tedavisi alan hastaların yaklaşık %9-24'ünün kötü over yanıtı oldukları tahmin edilmektedir [3].

Bir çok faktör, ovaryan stimülasyona yetersiz cevap ile ilişkili olabilir. İleri yaşlı hastalarda over rezervinin azalması veya genç hastalarda erken ovaryan yaşlanma, daha önce geçirilmiş ovaryan cerrahi ve pelvik adezyonlar bu sebepler arasında sayılabilir [3]. Maalesef, çok sayıda test önerilmesine rağmen, hiçbirisi ovaryan cevabı belirleyebilmek için doğru prediktif test olmamaktadır. Bununla birlikte ideal test, ovaryan stimülasyona overlerin cevabı gibi görünmektedir [3]. Stimülasyona kötü over yanıtı veren kadınları tanımlamak için ilk sistematik girişim 2011 yılında the European

Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) tarafından yayınlanmış ve ‘Bologna kriterleri’ olarak adlandırılmıştır [4]. Bologna kriterlerine göre, aşağıdaki 3 maddeden 2 sine sahip olmak, POR tanımı için yeterli kabul edilmektedir [4];

- (i) Ortalama maternal yaş (≥ 40 yıl) veya herhangi bir başka risk faktörü,
- (ii) Daha önce uygulanan tedaviye kötü ovaryan cevap geliştirmek (siklus iptali veya klasik protokol ile ≤ 3 oosit gelişmesi),
- (iii) Anormal bir over rezerv testi (ORT) (antral follikül sayısı (AFS) $< 5-7$ follikül veya anti-Müllerian hormon (AMH) $< 0.5-1.1$ ng/ml – ESHRE’ye göre AFS ve AMH, ovaryan rezervi predikte etmekte 3. gün follikül stimüledici hormon (FSH) düzeyine göre daha anlamlı olmaktadır.

Yaş faktörü ve anormal ORT yokluğunda ise, daha önce maksimum stimülasyon sonrasında iki kez kötü ovaryan cevap geliştirmiş olması da hastanın kötü over yanıtı olarak tanımlanması için yeterli olarak kabul edilmektedir (Bologna kriterlerinin 4. özelliği olarak kabul edilmektedir) [5].

Bir follikül, üç farklı hücre tipinden oluşmaktadır: bir oosit ve iki farklı tip somatik hücre olan granüloza hücreleri ve teka hücreleri [6].

Kümüls hücrelerindeki gen ekspresyonu ile ilgili çalışmalar sadece oositin büyümesi ve matürasyonunun anlaşılmasını sağlamakla kalmayıp aynı zamanda, oositin büyümesindeki moleküler mekanizmalara ulaşmayı da sağlamıştır çünkü kümülüs hücrelerindeki gen ekspresyonundaki anormallik, oositin büyümesi ve gelişmesinde de anormalliklere yol açacaktır [7]. Apoptozis, ovaryan folliküler atrezi ve luteal regresyon ile ilişkili hücrel bir mekanizmadır. Bir follikül populasyonundaki granüloza hücrelerinin yüksek oranda atreziye uğraması, follikülü apoptotik hücre ölümüne karşı son derece duyarlı bir hale getirmektedir [8]. Granüloza hücrelerindeki apoptozis, IVF sonuçları üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir [9]. Survivin diğer adıyla baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 (BIRC5), apoptozis inhibitör proteinlerinin (AIPs) en küçük üyesidir ve caspas inhibitör fonksiyonu için esansiyeldir [6]. Survivin, embriyonik ve fetal dokudan da eksprese edilmiş olup, bir çok kanser ile de ilişkili olduğu saptanmıştır [6].

Büyüme faktörleri tarafından, fosfatidilinozitol 3-kinaz/Akt yolu üzerinden indirekt olarak aktive edilebilen Nükleer faktör- κ B, survivin üretimini arttırmaktadır [10]. Ayrıca, insülin benzeri büyüme faktörü I/m TOR üretiminin de survivin ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir [11]. Bunun dışında, survivinin mRNA'dan ayrıştırılması fikri de farklı ekspresyon yollarını ve apoptozu önleme özelliklerini ortaya çıkarmaktadır [12].

Apoptozis, hipoksiye bir cevap olarak da artabilmektedir. Hipoksinin şiddeti, hücreleri ölmeye veya hipoksiye adapte olup hayatta kalmaya zorlamaktadır [13]. Heterodimerik bir protein olan HIF-1, HIF-1 α ve HIF-1 β denilen iki subünitten oluşmaktadır [14].

Fare beyinde yapılan çalışmalar, hipoksi tedavisi sonrasında survivin ve HIF-1 artışı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sonuçlar, HIF-1 α ve survivinin hipoksi bağımlı hücre apoptozisinde koruyucu rol oynadığını ve hipoksi tarafından survivinin upregüle edilmesinin HIF-1 α bağımlı olduğunu ortaya çıkarmıştır [10].

Sağlıklı bir insanın vücudunda Reaktif oksijen Türleri (ROS) ve antioksidanlar bir denge durumundadır. Bu doğal denge ROS artışı yönünde bozulduğunda oksidatif stres meydana gelir. Reaktif oksijen çeşitleri oosit oluşumundan döllenmeye, embriyo gelişiminden hamileliğe kadar bir çok fizyolojik süreci etkiler. Endometriosis, tubal and peritoneal faktör infertilitesi ve açıklanamayan infertilitede rol aldığına ilişkin birkaç kanıt vardır (15).

Oxidative stress responsive 1 (OXSR1) gen ürünü Serin/Treonin protein kinaz ailesi üyesidir. Çevresel strese cevapta kinazların downstreamini regüle eder ve aktin hücre iskeletinin regülasyonunda rol alır. Ayrıca bu gen oksidatif stres nedeniyle gerçekleşen hücre ölümü ve proliferasyonunun kontrolünde önemli rol oynar (16).

Nitrik Oksit (NO), memeli vücudundaki yararlı veya zararlı birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynayan önemli bir sinyal molekülüdür. Bu molekül çok sayıda nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin yardımıyla arjinin ve oksijenden veya inorganik nitrat gruplarının indirgenmesiyle nitrovazodilatör ilaç moleküllerinden sentezlenmektedir. NO'yu sentezleyen Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS3) enzimi teka, granüloza hücrelerinde ve oositin yüzeyinde foliküler gelişim boyunca sentezlenir ve birçok biyolojik süreçte önemli rollere sahiptir (15).

SMAD aile üyesi-5 (SMAD5) geni ise granüloza hücrelerinin fonksiyonunu direkt olarak etkileyebilir. SMAD5 geni granüloza hücrelerinin gelişiminde de önemli rol oynayan bir regülatördür. SMAD5 geni Bone morphogenetic protein (BMP), sinyal yolağının anahtar genlerinden birtanesidir ve bu sinyal yolağı apoptosis mekanizmasında görev alır. SMAD5'in ovaryan granüloza hücrelerinde gerçekleşen apoptozisteki rolünü araştırmak için yapılan bir çalışmada, SMAD5 siRNA'sı kullanılarak kültüre edilmiş granüloza hücrelerinde bu gen inhibe edilmiştir (17).

Literatürde folliküler gelişim boyunca granüloza hücrelerinin kök hücre popülasyonundan köken aldığı birçok çalışmada rapor edilmektedir. Granüloza hücrelerinin kök hücre karakteristiği göstermelerinin ana kanıtı ise telomer bölgeleri ve telomeraz enzimidir. Telomer bölgeleri kromozomların uç kısmında yer alan kromozomun bütünlüğünü ve stabilizasyonunu sağlayan tekrar bölgeleridir. Telomeraz enzimi Telomeraz Revers Transkriptaz (TERT) ve Telomeraz RNA (TERC) olmak üzere iki alt üniteden oluşur. TERT geni telomeraz enziminin aktivitesinin primer regülatörüdür. Ayrıca TERT geni, Telomeraz enziminin aktivasyonunun mekanizmasında görev almasının yanında, telomeraz enziminden bağımsız olarak apoptozisin regülasyonunda görev alır. Artan apoptozis ile azalan TERT geni ekspresyonu ile koreledir (18, 19).

Bu bağlamda çalışmamızda YÜT'ne başvuran kadınlardan follikül aspirasyonu ile elde edilen granüloza hücrelerindeki apoptozis, oksidatif stres, hücre yaşlanması ve hipoksi mekanizmasında farklı görevlere sahip olan survivin, HIF- 1 α , OXSR1, SMAD5 ve TERT genlerinin ekspresyonuna farklı over stimülasyon protokollerinin etkisini araştırmayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE

İnfertilite 1 yıl korunmasız, aynı partner ile düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalınmaması olarak tanımlanmaktadır. İnfertilite yaygın bir klinik problemdir. Tüm dünyada çiftlerin %13-15'ini etkilemektedir. Prevalansı geniş bir farklılık göstermek ile birlikte gelişmiş ülkelerde daha az ve yetersiz araştırma ve tedavi olanakları nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde daha fazladır. Ek olarak, infertilite toplumsal bir problemdir. Sadece çiftlerin hayatını etkilemek ile kalmamakta aynı zamanda sağlık kuruluşları ve sosyal çevreye de etki etmektedir [1].

Sağlıklı genç çiftler için, her reproduktif siklus başına gebelik elde edebilme olasılığı (fekundabilite) %20-25'tir. İnfertilite reproduktif çağıdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Korunmasız geçen 12 aylık süre sonunda çiftlerin ortalama %85'i gebe kalabilmektedir.

2.1.1. İnfertilite Nedenleri

Literatür araştırmasına göre en sık infertilite nedenleri sperm anormallikleri gibi erkek faktörüne bağlı sebepler, ovulasyon disfonksiyonu ve tubal patoloji gibi kadın faktörüne bağlı sebepler, hem erkek hem kadın faktörünün bir arada bulunduğu sebepler ve hiçbir faktörün saptanamadığı açıklanamayan infertilitedir. Tüm infertil çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü tespit edilir. %20-25 çiftte hem erkek hem de kadına ait patolojiler birlikte gözlenir. %15 çiftte ise tüm tanısal tetkikler sonucunda bir infertilite nedeni tanımlanamaz (açıklanamayan infertilite) [20].

2.1.2. İnfertil Çiftlerin Değerlendirilmesi

İnfertil çiftlerde, başvuru anında hem nedenin saptanmasına yardımcı olması hem de tedavi aşamasında yol gösterici olması açısından araştırmaya başlamadan önce tam bir tıbbi öykü (anamnez) alınması uygun olacaktır.

Erkek; mevcut durum/şikayeti, yaş, meslek, önceki semen analizi bulguları, memede büyüme veya herhangi bir meme değişikliği, ilaç ya da keyif verici madde kullanımı, sigara, alkol kullanımı ve aşırı kahve tüketimi sorgulanmalıdır. Koitus sıklığı, zamanı ve erektil disfonksiyon veya ejakülasyon problemi gibi koitusla ilişkili herhangi bir problem, libido kaybı, önceki evlilikleri veya evlilik dışı cinsel ilişkileri, daha önce herhangi bir kontraseptif yöntem kullanıp kullanmadığı, kabakulak gibi geçirilmiş bir hastalık, geçirilmiş medikal ya da cerrahi öykü, cinsel geçişli enfeksiyon, hidrosel, varikosel, inmemiş testis, apendektomi, inguinal herni veya mesane boynu süspansiyon ameliyatı sorgulanmalıdır.

Kadın; önceki hikayesi: mevcut problem/şikayet, yaş, meslek, en son servikal smear bulguları, süt benzeri salgı gibi meme değişiklikleri, yüzde veya göğüste sivilce ile birlikte veya tek başına aşırı tüylenme, ateş basması, yeme bozuklukları, DM ve/veya HT gibi mevcut dahili hastalık, NSAID'ler, seks steroidleri, sitotoksik ilaçlar gibi ilaç kullanımı veya mariuana ve kokain gibi keyif verici madde kullanımı, sigara ve alkol kullanımı ve aşırı kahve tüketimi sorgulanmalıdır.

Menarş yaşı, siklus karakteristikleri ve menstruasyon esnasında ağrı ve intermenstrual lekelenme gibi belirtiler. Primer veya sekonder amenore öyküsü, eğer varsa önceki gebelikler ve sonuçları, tekrarlayan gebelik kaybı, indüklenmiş abortus, abortus sonrası enfeksiyon veya puerperal sepsis, daha önce kullandığı herhangi bir kontraseptif ajan, özellikle RIA ve bununla ilişkili herhangi bir problem olup olmadığı, koitus sıklığı, daha önce vajinal lubrikant kullanıp kullanmadığı veya koitus sonrası vajinal duş, libido kaybı ve zor ve ağrılı koitus gibi bir problem olup olmadığı, pelvik enfeksiyon, tuberküloz, ovaryan kist, apendektomi, laparotomi, sezaryen ameliyatı ve servikal konizasyon geçirip geçirmediği, aile üyelerinde benzer problemler, DM, HT, ikiz doğum, meme kanseri varlığı sorgulanmalıdır.

2.1.2.1. Klinik değerlendirme

Erkek

Ayrıntılı bir ürolojik muayene ve spermioqram yapılmalıdır

Kadın

Genel muayene: Vital bulgular (özellikle kan basıncı), boy, kilo, BMI, aşırı veya düşük kilo, sekonder seksüel karakterler, yüzde veya göğüste sivilcelenme ile birlikte veya tek başına olan aşırı tüylenme ve akantozis nigrikans, otoimmün hastalıkları çağrıştıran vitiligo gibi anormal deri depigmentasyonlarının varlığı incelenmelidir. Araştırma tiroid bezini de içermelidir.

Meme incelemesi: Galaktore gibi bir patolojiyi dışlamak ve meme gelişimini değerlendirmek için meme muayenesi yapılmalıdır.

Abdominal inceleme: herhangi bir kitle, organomegali, asit, abdominal stria ve cerrahi skar varlığı değerlendirilmelidir.

Genital inceleme: Klitorisın şekli ve büyüklüğü, vajinal intraoitus, imperforehymen, vajinal septum, uterusun varlığı (RKHM sendromu açısından), şekli, boyutu, yönü, herhangi bir palpabl abdominal kitle, hassasiyet, uterosakral ligament kalınlığı ve nodülü, cul-de-sac'da endometriozis veya tuberkülozise bağlı bulgular değerlendirilebilir.

2.1.2.2. Tanısal Araştırmalar

Takip eden araştırmalar, infertilitenin en sık sebeplerini saptamada en az invaziv yöntemler ile, ilgili faktörlerin hepsini tanımlamak için sistematik, hızlandırılmış ve kost-efektif bir şekilde yönetilmelidir. Araştırmanın hızı ve büyüklüğü için, çiftlerin tercihleri, hastaların yaşı ve tıbbi öykünün ve fizik muayenenin kişiye özgü özellikleri ve infertilitenin süresi dikkate alınmalıdır.

2.1.2.3. Ovulatuvar Fonksiyon

Ovulatuvar disfonksiyon tüm infertil çiftlerin %15'i tanımlanmakta ve infertil kadınlar göz önünde bulundurulduğunda ise %40'ını oluşturmaktadır (21). Sıklıkla menstrual

düzensizlikler (oligo/amenore) ile kendini göstermekte fakat daha çözümü zor bir durumda da karşımıza çıkabilmektedir. Spesifik tedavi gerektirebileceği ve diğer sağlık nedenlerinin sebepleri ve sonuçları ile ilişkili olabileceği için altta yatan neden anlaşılmaya çalışılmalıdır. Ovulatuvar disfonksiyonun en sık altta yatan nedeni PCOS, kilo artışı veya kaybı, yorucu egzersizler, tiroid disfonksiyonu ve hiperprolaktinemidir. Ancak, sıklıkla ovulatuvar disfonksiyonun altında yatan neden belirsizdir [21]. Ovulatuvar fonksiyonu değerlendirmede;

Menstrual öykü tüm hastalarda bilinmelidir. Seri bazal vücut ısı ölçümleri, serum progesteron ölçümü, üriner LH saptamak için çeşitli “ovulasyon saptama kitleri”, endometrial biyopsi ve histoloji, transvajinal ultrasound (TV USG) gelişen follüküllerin büyüklüğünü ve sayısını göstermektedir ve progresif follükül büyümesi ardından birden preovulatuvar follükülün rüptüre olması, follükülün açıkça kaybolması ve douglasta sıvı birikimi ile ovulasyon ve luteinizasyon için varsayımsal bir kanıt sağlamaktadır (17).

2.1.2.4. Ovaryan Rezerv

“Ovaryan rezerv” kavramı, elde edilen oositlerin kalitesi ve sayısının bir fonksiyonu olarak reproduktif potansiyeli göstermektedir. Azalmış veya yetersiz ovaryan rezerv (AOR) reproduktif çağda düzenli menstrasyon paternine sahip ovaryan stimülasyona cevabı veya fekunditesi kendi yaşındakilere kıyasla azalmış olan kadınları tanımlamaktadır. Testler, “ovaryan rezerv”i değerlendirmek için, siklusun 3. günü follükül stimüle edici hormon (FSH) ve estradiol (E2) ölçümlerinden, klomifen sitrat challenge test, erken follüküler antral follükül sayısı (AFS) (TV USG ile) veya serum Anti Mülleriien Hormon (AMH) seviyelerinden yararlanmaktadır. Bu testler, AOR için artmış riske sahip olan;

- 1) 35 yaşından büyük
- 2) Erken menapoz için aile öyküsü olan
- 3) Daha önce ovaryan cerrahi, kemoterapi veya pelvik radyasyon terapi öyküsü olan veya tek overe sahip olan
- 4) açıklanamayan infertilitesi olan
- 5) Gonadotropinlere (Gn) kötü cevap verdiği gösterilmiş olan

6) Yardımla üreme teknolojileri (YÜT) ile tedavi planlanan kadınlarda prognostik bilgileri arttırabilir [21].

Ovaryan rezerv ölçümü, AOR'nin tanısını kanıtlamamaktadır fakat bunun yerine ekzojen gonadotropinler (Gn) ile ovaryan stimülasyona cevabın predikte edilmesine ve daha az olarak da YÜT ile başarılı gebelik elde etme olasılığını saptamaya yardımcı olmaktadır [22]. Ancak, herhangi bir testte kötü sonuçlar elde etmek gebelik elde edilmesinde başarısız olunacağı anlamına gelmemektedir.

Siklusun 3. günü FSH ve Estradiol

Siklusun 2-5. günü ölçülen FSH değeri ovaryan rezerv ölçümünde sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek değerleri (10-20 IU/L) hem kötü ovaryan yanıt hem de gebelik elde edilmesinde başarısız olunması ile yakından ilişkilidir [22]. Ölçüm, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ikinci uluslararası standartlara göre tanımlanmış, stimülasyona kötü ovaryan cevabın (genellikle < 2-3 follikül veya ≤ 4 oosit eldesi ile tanımlanır) yüksek spesifiteye (%83-100 aralığında) sahiptir. Ancak kötü over yanıtının saptanması için sensitivitesi (%10-80) değişkendir [22]. Tek başına E2, AOR taraması için kullanılmamalıdır. Test ancak normal bazal serum FSH değerlerinin doğru yorumlanmasına yardımcı olabilir. Erken folliküler fazda bazal FSH konsantrasyonları normal olup E2 değerleri yüksek olduğu zaman (>60-80 pg/mL), kötü ovaryan cevap, artmış siklus iptali oranı ve daha düşük gebelik oranları için sınırlı bir kanıt elde edilebilir [21].

Klomifen Sitrat Challenge Test [23]

Antral Follikül Sayısı (AFS)

AFS, erken folliküler fazda her iki overden toplam follikül sayısının TV USG ile gösterilmesidir. Antralfolliküller, en geniş 2 boyutlu düzlemde 2-10 mm veya 3-8 mm çapındaki bir ölçümle tanımlanmaktadır. Düşük bir AFS (total AFS'nin 3-10 aralığında olması), ovaryan stimülasyona kötü cevap ve gebelik elde edilmesinde başarısızlık olarak tanımlanmaktadır [24].

Serum AMH seviyeleri

Erken folliküllerin granüloza hücrelerinde üretilen AMH'nın serum konsantrasyonları Gn bağımsızdır ve bu nedenle hem infertil kadınlar ve hem de normal genç ovulatar kadınların menstrual siklusları arasında kısmi bir tutarlılık mevcuttur [21]. Bu nedenle AMH değerleri siklusun herhangi bir gününde ölçülebilmektedir. Tamamında, düşük bir AMH değeri (<1 ng/mL), ovaryan stimülasyona kötü ovaryan yanıt, kötü embriyo kalitesi ve IVF'te kötü gebelik sonuçları ile ilişkilidir [21].

2.1.2.5. Uterin Anormallikler

Uterin anatomi veya fonksiyonundaki anormallikler kadınlarda infertilitenin sık olmayan nedenlerini oluşturmaktadır fakat dışlanmamalıdır. Uterusu değerlendirmek için kullanılan yöntemler şu şekilde sıralanabilir;

HSG, uterin kavitenin büyüklüğünü ve şeklini tanımlar ve potansiyel reproduktif sonuçlara sahip gelişimsel anomalileri (unikornus, septum, bikornus uteri) veya diğer edinilen anomalileri (endometrial polip, submüköz myomlar, sineşi) ortaya çıkarabilir. Ancak, HSG, relatif düşük sensitiviteye sahiptir (%50) ve asemptomatik infertil kadınlarda submüköz myom ve endometrial poliplerin tanısı için pozitif prediktif değeri %30 tur [21].

USG myomlar da dahil uterin patolojilerde kullanılabilir [21].

Sonohisterografi, uterin kaviteye salın verdikten sonra TV USG ile değerlendirme yapılması, uterin kavite ve şeklini daha iyi değerlendirmekte ve daha yüksek bir pozitif prediktif değere sahip (>%90) olmaktadır ve intrauterin (IU) patolojileri dışlamak için negatif prediktif değeri daha yüksektir.

Histeroskopi, IU patolojilerin tanısı tedavisi için esas yöntemdir. En maliyetli ve en invazif yöntem olduğu için, genellikle HSG ve Sono gibi daha az invazif yöntemler ile tanımlanan anormalliklerin ileri değerlendirmesi ve tedavisi için ayrılabilir [21].

2.1.2.6. Tubal Açıklık

Tubal hastalık infertilite için önemli bir sebeptir. Tubal açıklığın değerlendirilmesi ve efektif tedavisi için kullanılan yöntemler aşağıda belirtilmiştir:

HSG, tubal açıklığın değerlendirilmesinde geleneksel ve standart bir yöntemdir ve bazı tedavi edici faydaları da bulunabilir. HSG, proksimal veya distal tubal oklüzyonu dökümanete edebilir.

SIS, sıvı ve USG kullanarak tubal açıklığı değerlendirmek için kullanılan bir testtir. Douglasta sıvı görülerek tubal açıklık gözlenebilmesine rağmen, tek veya çift taraflı açıklığı ortaya koyamamaktadır.

L/S ve metilen mavisi veya indigokarminin (tercihen) su ile dilüe edilmesi ve serviks yolu ile verilmesi ile gerçekleştirilen kromotubasyon, tubal açıklığı gösterebilir veya proksimal veya distal obstrüksiyonu gösterebilir.

2.1.2.7. Peritoneal Faktörler

Endometriozis ve pelvik veya adneksiyal adezyonlar gibi peritoneal faktörler infertiliteye sebep olmakta veya katkıda bulunmaktadır. Anamnez ve/veya fizik muayene bulguları şüpheleri arttırabilir fakat tanı için nadiren yeterlidir. Peritoneal faktörler açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda ortaya konulmalıdır.

TV USG tanınmayan endometrioma gibi reproduktif etkileri olan diğer pelvik patolojileri ortaya çıkarabilir [21].

Pelvikreproduktif anatominin L/S ile direk görülerek değerlendirilmesi, fertilitiyi etkileyebilen peritoneal faktörlerin spesifik tanısında kullanılabilen tek yöntemdir.

İnfertil çiftlerin değerlendirilmesine korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememelerinden 12 ay sonra başlanmalıdır ancak female partner 35 yaşın üzerinde ise ve her iki partner için de infertilite için aşikar bir sebep varsa bu süre 6 aya düşmektedir.

İnfertilitenin majör sebepleri içerisinde sperm anormallikleri, ovulatuvar disfonksiyon ve fallop tüp obstrüksiyonları sayılabilir. Araştırmalarda başlangıçta semen analizi üzerine odaklanılmalı ve değerler DSÖ referans değerler ile karşılaştırılmalıdır [25], hormonal değerler değerlendirilmeli (erken folliküler fazda FSH, LH seviyeleri ve mid-luteal fazda progesteron ölçümleri) ve histerosalpingografi ile tubal patolojiler üzerine odaklanılmalıdır.

Daha ileri araştırmalar, klinik durum ve başlangıç testlerinin sonuçlarına göre yapılmalıdır. Özellikle çiftlerde gereksiz testlerin çıkarılması infertilite başarısını düşürmeden toplam tedavi maliyetini azaltacaktır. Örneğin, daha öncesinde pelvik enfeksiyon veya endometriozis öyküsü olmayan normal HSG bulgularına sahip bir kadında laparoskopi yapmak gereksizdir. Benzer olarak, IVF veya ICSI endikasyonu olan hastalarda tubal değerlendirme yapılması gereksizdir.

2.1.3. IVF/ICSI İçin Hasta Seçimi

IVF Tedavisine Başlama Kriterleri

A. Erkek faktörü: Oligoastenospermi- azospermi [25].

B. Kadın faktörü:

1. Tubal faktör [20]

2. Endometriozis [20]

3. Hormonal -Ovulatuvar Bozukluklar

a) Oligo - anovulasyon

C. Açıklanamayan İnfertilite:

Hem erkek, hem de kadının tetkiklerinin normal olmasına ve en az üç siklus IUI uygulanmasına rağmen üç yıl veya daha uzun süreli gebe kalamama halinde IVF tedavisine başlanabilir.

Tüm bu bilgiler ışığında infertil çiftin değerlendirilmesi ve IVF'e yönlendirilmesi aşamaları sabırla ve titizlikle basamak basamak gerçekleştirilmelidir. Hasta için maliyeti en düşük, en kolay ve en fazla yarar sağlama olasılığı olan tedavi yöntemi isabetli olarak doğru zamanda seçilmelidir.

Bazı otörler, klasik stimölasyon protokollerini hastaların karakteristiklerine göre modifiye ederken, ki buna bireyselleştirilmiş KOH denir, diğerleri standart, hasta dostu, düşük Gn dozları içeren düşük yoğunlukta stimölasyon protokollerini benimsemektedir.

Açıkçası, herkese hitap edecek bir protokol bulunmamaktadır bu nedenle KOH bireyselleştirilmelidir. Hormonal, fonksiyonel ve genetik biyomarkerlar ile en uygun KOH protokolünü uygulamak için çaba sarfedilmektedir. Bireyselleştirilmiş KOH'un amacı: 1) kötü veya aşırı cevap yüzünden siklus iptallerinin engellenmesi 2) stimölasyon yükünü en aza indirmek 3) artmış canlı doğum oranları 4) azalmış çoğul gebelik oranlarıdır [26].

KOH'un bireyselleştirilmesi için stimölasyona verilen ovaryan cevabın bilinmesi ya da öngörülmesi gerekmektedir. Bunun için hastalar kötü over yanıtı, normal over yanıtı ve artmış over yanıtı olarak ayrılmaktadır.

2.1.3.1. IVF için KOH'a Kötü Yanıt Verenler

IVF sürecinde gonadotropin stimölasyonuna kötü ovaryan cevap, yardımla üreme alanında en zorlu ve yorucu problemlerden birisidir, özellikle bu durum beklenmiyorsa ve hasta gençse. IVF tedavi başarısı, kısmen, yeterli düzeyde kontrollü ovaryan hiperstimölasyona bağlıdır. Gonadotropinlere kötü yanıt verme, siklus iptali, transfer ve kriyoprezervasyon için uygun embriyoların sayısında azalma, buna bağlı olarak düşük gebelik oranı, çiftlerde stres ve hüsrana ve doktorda da hayal kırıklığına neden olmaktadır. Kötü cevap verenler için en uygun stimölasyon için bir mücadele devam etmekte ve iyi bir reproduktif sonuç elde etmek için özel dikkat gerektirmektedir.

Kötü yanıt veren tanımı onlarca yıl sonra bile devam eden bir tartışma halindedir. Kötü yanıt verenin ne olduğu konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır ve bu durumun çalışmalar arasında karşılaştırma yapması imkansız değilse de zordur.

Kötü yanıt verenleri tanımlamak için en sık kullanılan kriter artmış bir bazal FSH seviyesi, suboptimal ovaryan cevap nedeniyle önceki bir siklus iptali, human koryonik gonadotropin (hCG) günü 3-5'ten daha az preovulatuvar follikül sayısı veya 3-5'ten daha az oosit elde edilmesidir. Kötü ovaryan yanıtı temsil etmesi bakımından artmış (>300 IU/gün) gonadotropin kullanımı önerilmektedir. <40 yaş kadınlarda, kötü ovaryan yanıt,

günlük >300 IU FSH (<3 preovulatar follikül gelişimi) ile siklus iptali veya oosit toplama için yeterli follikül gelişimi elde etmek için >3000 IU FSH ihtiyacı ile tanımlanmalıdır [27].

Otörler, kötü over yanıtın tanısının mevcut en az bir sıklusa dayanarak konulması gerektiğini ortaya koymakta ve bu çalışmanın sonuçları bir ila iki oosit elde edilen bu kadınların kötü yanıtı olduğunu göstermektedir. Bu durum, artan FSH dozlarına rağmen, ikinci ve üçüncü IVF sikluslarında kötü yanıtın devam etmesi ile desteklenmektedir [28].

Son bir Cochrane derlemesinde (Pandian ve ark., 2010), kötü yanıtı tanımlamak için, 17 mm ve daha büyük ölçüde 3'ten az follikül olması ve bunun sonucunda elde edilen oosit sayısında azalma (3'ten az) kullanıldı [29].

European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) multidisipliner görüş toplantısında alınan karara göre (BOLOGNA kriterleri) aşağıdaki kriterlerden üçünden ikisinin mevcut olması kötü over yanıtı tanısı konulması için yeterli kabul edilmiştir:

1. AOC için ortalama maternal yaş veya herhangi bir diğer risk faktörü
2. Stimülasyona önceki bir kötü yanıt
3. Anormal over rezerv testleri [4].

Tanım, daha önce ovaryan stimülasyon geçirmemiş veya kaydedilen bir önceki cevabı bulunmayan hastalarda ‘beklenen’ teriminin eklenmesi ile modifiye edilmiştir. Risk faktörleri içerisinde 4 veya daha az oosit elde edilmesi AOC için cut off değer olarak kabul edilmektedir (ESHRE SIG) [4].

Mevcut literatürde geniş farklılıklar olması nedeniyle kontrollü ovaryan stimülasyona kötü over cevabının insidansını saptamak zordur. Ancak, IVF tedavisi alan hastaların %9-24, siklusların %9-18'i KOH uygulanan kadınların %2-30'unda bulunduğu ortaya koyulmaktadır [28].

Stimülasyona ovaryan cevabı etkileyen pek çok faktör bulunmakta bunların bazıları genetik olmakla birlikte bazıları da sonradan kazanılmaktadır. Bu faktörler, ya elde

edilebilen follikül popülasyonunun büyüklüğü üzerinde ya da bu folliküllerin gonadotropinlere hassasiyeti üzerinde etki etmektedir [28].

KOH'a kötü over yanıtı geliştirmesi beklenen hasta grubu

>37 yaş

1. İleri kadın yaşı, canlı doğumun en önemli prediktörüdür

<37 yaş

1. Önceki ovaryan cerrahi
2. İlerlemiş endometriozis, endometrioma
3. Yüksek BMI
4. Önceki pelvik enfeksiyon/adezyon
5. Çevresel faktörler-sigara kullanımı
6. İatrojenik-kemoterapi/radyoterapi sonrası

KOH'a kötü ovaryan yanıt geliştirmesi beklenmeyen hasta grubu

Bu gruptaki hastalar genellikle genç yaş ve normal bazal tetkiklere sahip ve agresif uyarılma protokollerine düşük over yanıtı geliştirmesi herhangi bir sebeple açıklanmayan hastaları kapsamaktadır. Bu genç infertil hastaların yönetimi, üreme tıbbi için en zor ve hayal kırıklığı yaratan konulardan biridir.

Çok sayıda etyolojik faktör ortaya konulmasına rağmen, kötü ovaryan yanıtın başlıca faktörünün azalmış bir over rezervi olduğu düşünülmektedir.

İleri sürülen diğer olası etyolojik faktörler:

1. Mevcut granüloza hücrelerindeki FSH resptörlerinin azalan sayısı
2. FSH reseptör bağlanmasından sonra defektif sinyal iletimi
3. Folliküler sıvıda özel bir FSH reseptör bağlayıcı inhibitörünün varlığı
4. Gonadotropinlerin dağılımı için uygun olmayan bir lokal vasküler çevre
5. Granüloza hücrelerine karşı otoantikor varlığı ve
6. Gonadotropin dalgalanma faktörlerinin azalmış biyoaktivitesi (GnSAF)

IVF’te FSH stimülasyonuna kötü ovaryan cevap ile ilişkili olan, matür folliküller üzerinde anti-FSH IgA ve IgG ile potansiyel olarak lokal bir FSH antagonistik etki uygulayan serum anti-FSH antikoru olduğu dair bazı fikirler mevcuttur [28].

FSH reseptör gen polimorfizmi

FSH, normal ovaryan folliküler gelişim için anahtar bir rol oynamaktadır. Bu gonadotropin, overdeki granüloza hücrelerinde spesifik bir reseptörde bulunan bağlanma ile gametogenez üzerinde stimülatör ve trofik etkiye sahiptir [30].

Kötü ovaryan cevabın araştırılması/tahmini

Primordial ovaryan folliküller, insan hayatının ilk beş ayında belirlenmekte ve bu fetal evredeki primordial folliküllerin sayısı, bireysel ovaryan rezervi belirlemektedir. Başlangıçta primordial folliküllerin sayısı yaklaşık 10 milyondur ve git gide azalmaktadır ve azalma in utero başlamaktadır. Sonuç olarak bu sayı doğumda 1-2 milyona düşmektedir ve pubertede 300.000-500.000 olup ovulasyon için kullanılabilir olanlar bunlardır. Bu nedenle, her ay yaklaşık 1000 tane olmak üzere istikrarlı bir folliküler kayıp meydana gelmekte ve folliküllerde başlayan bu azalma oranı 35 yaş civarında artış göstermektedir. Ovaryan rezervdeki anlamlı düşüş 37 yaşta veya primordial folliküller 25.000 e ulaştığında meydana gelmektedir. Yaklaşık 50 yaş civarında primordial follikül sayısı sadece 1500 civarındadır ve menapoz ile (+3 yıl) tamamen sona ermektedir. Primordial folliküldeki azalmanın bu havuzdaki azalma hızında ve bu oranda, bireysel varyasyonların geniş bir aralığı mevcuttur.

Açıkçası, yaş, yardımcı üreme ve canlı doğumun başarısında en önemli ve en iyi prediktör olmaya devam etmektedir. Oosit kalitesi yaşa bağlıdır bu nedenle hem yaş hem de oosit kalitesi telafi edilemeyecek düzeye gelmektedir. Bu durum, kadınların çocuk yapmayı ertelediği ve klinisyenlerin her gün daha büyük sorunlarla karşılaştığı mevcut toplum için son derece önemlidir.

2.2. Biyokimyasal Markerlar

Persiste eden yüksek bazal serum FSH (>12-15 mIU) azalmış ovaryan rezerv hakkında fikir verebilir. Ancak FSH, gebelik sonuçları ile güçlü bir ilişkiden yoksundur ve bu durum FSH seviyelerindeki aylık değişimi daha az güvenli kılmaktadır. Son bir

sistematik derlemede, düzenli siklusa sahip kadınlarda, bazal FSH değeri değerlendirilmiş ve FSH ölçümünün, ancak yalnızca çok yüksek eşik seviyelerinde, kötü yanıtın tespit edilmesi için yeterli doğrulukta olduğu ortaya konulmuştur [32]. 40 yaşın üzerindeki kadınlarda, 3. gün persiste eden yüksek FSH seviyeleri, çok büyük oranda normalin altında bir ovaryan cevap ile ilişkili olmaktadır bu durum elde edilen oositlerin sayısında azalma, yüksek siklus iptal oranları, bozulmuş embriyo kalitesi ve düşük implantasyon ve gebelik oranları ile açıklanmaktadır.

Yüksek 3. gün estradiol seviyeleri (>75 pg/ml) IVF'e kötü over yanıtı ve düşük gebelik oranları ile ilişkilidir [33].

AMH (Anti Mülleriyan Hormon) granüloza hücrelerinde sekonder, preantral ve toplanan folliküller FSH'ya duyarlı olmaya başlayana kadar 6 mm ölçüsünde erken antral folliküllerden salgılanır [28]. AMH seviyeleri, düşük siklus içi değişkenlik ve erken evrelerde follikül azalması ve antral follikül sayısı ile kuvvetli korelasyon sağlaması nedeniyle ovaryan rezerv için rutin kullanılan diğer markerlara göre en iyi hormonal faktör gibi görünmektedir.

AMH ile yaştan bağımsız olarak elde edilen oosit sayısı arasında güçlü bir korelasyon görülmekte ve bu nedenle aşırı cevap verenler ve kötü cevap verenleri saptama kapasitesi bulunmaktadır [28]. Otörler ilk ovaryan stimülasyondan önce kişilerin AMH seviyelerine göre katagorize edilip optimal stimülasyon protokolü ve tedavi stratejilerinin buna göre belirlenmesini önermektedir.

İnhibin B granüloza hücrelerinde preantral ve erken antral folliküllerden üretilen, FSH'ya cevap veren büyüyen folliküllerden üretilmektedir. İnhibin B'nin serum bazal seviyeleri <45 pg/ml olması kötü over yanıtı, yüksek IVF siklus iptal oranı, düşük sayıda oosit elde edilmesi ve azalmış gebelik oranları ile ilişkili bulunmuştur [28]. İnhibin B, azalmış follikül havuzunun oldukça geç bir markerıdır ve büyüyen folliküller ile direkt ilişkili olduğu için, ovaryan aktivite için ovaryan rezervden daha iyi bir indikatördür.

Ultrasound Markerları

Antral follikül sayısının da dahil olduğu ovaryan rezervin mevcut uygulanabilir ultrasound belirteçleri, ovaryan volüm ölçümü ve ovaryan kan akımının Doppler değerlendirilmesidir. Gibreel ve ark tarafından 2009 yılında yapılan son bir sistematik derlemede, ovaryan rezervin USG ile değerlendirilmesinde, AFS 4'ten az ise yardımla üremede siklus iptalinde yüksek spesifite için cut off değer oluşturmaktadır [34]. Bu değer ovaryan volüm için 3 ml'dir ve yardımla üremede siklus iptali ve gebelik oluşmayacağını saptamak için yüksek spesifite göstermektedir. Ovaryan stromal kan akımına ait Doppler çalışmaları umut vadetmektedir ancak daha fazla çalışma temin edilmelidir. Bu 3 USG testinin, AFS, ovaryan volüm ve ovaryan vasküler kan akımı, ya arka arkaya veya paralel olarak ölçümünün, gebelik veya kötü yanıt açısından AFS'nin saptayabilirliğini geliştirip geliştirmeyeceğini belirlemek için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır. Antral follikül sayısı ve ovaryan volümünün IVF hastalarında bir prediksiyon aracı olarak karşılaştırıldığı bir meta-analizde, antral follikül sayısının ovaryan cevabı belirlemede ovaryan volüme göre daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir [35].

AFS, elde edilebilir follikül kohortunu yansıtmakta ve ovaryan cevabın önemli bir belirleyicisi olduğu gösterilmektedir [35]. Bazı çalışmalar, folliküler duyarlılığın ovaryan kan akımının derecesi ile ve gonadotropinlerin folliküller üzerindeki etkisi ile olabildiğini göstermektedir [28].

Ovaryan rezerv belirleyicileri olan AMH, İnhibin-B ve 3D USG'nin karşılaştırıldığı son bir prospektif çalışmada Kannamannadiar ve ark., 2010 yılında tedavi öncesi AFS ve AMH'nin toplanan oosit sayısı ve yardımla üreme sürecinde ovaryan stimülasyona kötü ovaryan cevap geliştirenlerin saptanmasında en anlamlı belirteç olduklarını göstermiştir [36].

KOH'a kötü cevap verenler için yönetim seçenekleri/müdahaleleri

Kötü yanıt verenlerin sonuçlarını iyileştirmek için çeşitli değişik yaklaşımlar önerilmektedir (Sum. Tablo 1-4) ancak çalışmaların büyük ölçekli olmaması, farklı yönetim stratejilerine ait prospektif randomize kontrollü çalışmalar olması ve popülasyonların ortak bir tanıma sahip olmaması heterojen grupların elde edilmesi ile

sonuçlanmış ve bu durum kesin sonuç elde etmeyi zorlaştırmıştır. Önerilen müdahalelerin fazla sayıda olması problemin kompleksliğini yansıtmakta ve henüz KOH'da kötü yanıt için ideal etkili bir tedavi bulunmadığını göstermektedir. Sonuçları, yani canlı bir doğumu, arttırmak için çeşitli stratejiler öne sürülmüştür fakat çalışmaların esas çoğunluğu canlı doğuma primer sonuç gibi bakmamıştır. Son bir Cochrane derlemesinde 10 çalışma dışında sadece bir canlı doğum bildirilmiştir [29].

Gonadotropinlerin artan dozları

Belkide kötü over yanıtlılardan oosit elde etmek için en sık kullanılan strateji, günlük gonadotropin dozlarını arttırmaktır. Pek çok otöre göre kötü over yanıtlılar için en uygun başlangıç dozu en az 300 IU/gün fakat tüm kötü over yanıtlı protokolleri yüksek doz gonadotropin dozları (tipik olarak 300-450 IU/gün) kullanılmasına rağmen Klinik Etkinlik Merkezine göre (2000) yüksek doz protokolün avantajı görülmemiştir.

Pürifiye üriner FSH'ya karşı rekombinant FSH kullanımı

Pek çok çalışma, elde edilen oosit sayısı, matür oositlerin yüzdesi, daha iyi kalitede embriyo yüzdesi ve gebelik oranı bakımından rFSH kullanımı için başlangıçta bir heyecan göstermiştir [37] fakat başlangıçta elde edilen bu olumlu sonuçlar diğerleri tarafından desteklenmemiştir [38]. Bir meta-analizde IVF/ICSI sikluslarında rFSH ve pürifiye üriner FSH arasında klinik anlamlı farklılık izlenmemiştir [39]. Bu nedenle rFSH'nın kötü over yanıtlılarda daha iyi sonuçlar elde ettiğine dair iyi kanıtlar bulunmamaktadır.

Luteal FSH başlanması

Bu yaklaşım ilk olarak 1980'lerin sonlarında ortaya koyulmuştur [28]. Hipotez, FSH'nın daha erken eklenmesi, önceki siklusun luteal fazında geri alım penceresini erken açarak toplanan follükül sayısında artış meydana getirebilirdi. Ancak, prospektif randomize bir çalışmada bu otörler bu yaklaşımın herhangi bir faydasını gösterememişlerdir [28].

Diğer bir ön hazırlık niteliğindeki çalışma, kötü yanıt veren kadınlarda, rFSH'nın GnRH (long protokol) agonist ile eş zamanlı olarak luteal başlanması, short protokol, GnRH α ve ek yüksek doz FSH rejimleri ile karşılaştırıldığında, daha yüksek sayıda metafaz 2

oosit üretildiğini ortaya koymaktadır [40]. İkinci bir grup [41], luteal faz FSH ve folliküler faz FSH kullanımının karşılaştırıldığında IVF sonuçlarının benzer olduğunu ve sonuç olarak luteal fazda başlanan FSH'nin kötü yanıt verenlerde güvenli bir potansiyel alternatif protokol olduğunu belirtmişlerdir.

Şimdiye kadar yapılmış çalışmalar küçük ve sonuçlar tutarsızdır. Bu konuyu aydınlatmak için daha geniş prospektif randomize çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kötü yanıt verenlerde GnRH agonistler

GnRH agonistler prematür ovulasyon ve luteinizasyonu önlemekte fakat kullanımları hala yüksek gonadotropin gereksinimi ilişkili olmaktadır. Standart yaklaşım mid-luteal fazda GnRH agonist başlamaktır fakat özellikle kötü yanıt verenlerde GnRH dozunun azaltılması veya siklus içerisinde başlama zamanında değişiklik yapmak faydalı olabilir. Bu durum agonist dozun azaltılması üzerinde çok sayıda değişiklikte sonuçlanmıştır.

GnRH agonist stop protokol

Bir GnRH agonist mid-luteal fazda başlatılır fakat hipofizer down regülasyon olur olmaz durdurulur ve ovaryan stimülasyon başlar. Kötü over yanıtılılarda prospektif randomize bir çalışmada [42], geleneksel long GnRH agonist protokol ve GnRH agonist stop protokolü karşılaştırıldı. Çalışmada iki protokol arasında klinik gebelik oranlarında anlamlı bir fark bulunmadı zaten çalışma da böyle bir güce sahip değildi. Bu nedenle bu güne kadar GnRH agonist stop protokolün kötü cevap verenlerde sonuçları önemli ölçüde geliştirdiğine dair çok az kanıt mevcuttur ve spontan LH artışı ve prematür ovulasyon için potansiyel artmış bir insidansa sahiptirler.

Flare up GnRH agonist rejimler: short ve ultra-short protokoller

Flare-up rejimler, Gn başlanmasından önce çok az bir gecikme ile GnRH agonist'in başlanmasını erken folliküler faza dahil eder. Bu yaklaşımın avantajı, ovaryan supresyon aşırı olmamakta ve GnRH reseptörlerinin ilk stimülasyonu ve endojen Gn'lerin takip eden sekresyonları, eksojen eklenen Gn'lerin etkilerini arttırmaktadır [28]. Eski bir çalışma, flare rejim kullanıldığında, siklus iptali üzerinde değişken etki ile birlikte daha yüksek gebelik oranları elde edildiğini de bildirmişlerdir [28]. Ancak, diğerleri bir flare protokolün ya KOH cevabını veya siklus sonuçlarını geliştirmekte

başarısız olduğunu ortaya koymuşlardır. Daha yeni prospektif randomize kontrollü bir çalışma [43] önceki siklusunda kötü cevap veren 60 hastayı dahil ederek iki protokolü karşılaştırdı (geleneksel long GnRHa protokol ile flare GnRHa protokol) ve geleneksel long protokolde, anlamlı olarak daha fazla oosit elde edildi ve gebelik oranları anlamlı olarak daha fazla bulundu (22.5 ile 3.4%).

GnRHa Mikrodoz flare protokol

21 günlük monofazik bir OKS ile tedaviyi takiben GnRH agonistin son derece düşük dozu leuprolide asetatı günde iki kez 20-40 mikrogram, siklusun 2-3. günleri başlanır. GnRHa'ten 1-2 gün sonra ardından Gn'ler başlanır. Prospektif randomize olmayan bir çalışmada, GnRHa dozlarının mikrodoz flare protokolde azalması, kötü yanıtılılar için tekrarlayan iptal insidansını azaltmakta ve folliküler fazda takip eden bir progesteron veya LH artışı olmaksızın gebelik oranlarını arttırmaktadır.

GnRHa minidoz protokol

Diğer bir alternatif yaklaşım, ovaryan stimülasyon öncesi, luteal faz sürecinde başlatılan GnRHa dozunun azaltılmasıdır. Feldberg ve colleagues (1994) daha öncesinde 2 IVF siklusunda 3. Gün FSH seviyeleri >15 olan, 2'den fazla follikül geliştirmekte başarısız olarak kötü cevap veren 106 hastayı değerlendirdiler. Bu retrospektif analizde Gn stimülasyonundan önce 3 yaklaşım uygulandı: (1) GnRHa D-Trp6 3.75 mg tek bir enjeksiyon, (2) Mense kadar günlük D-Trp 0.5 mg takiben günlük 0.1 mg azaltarak, (3) D-Trp 6 0.1 mg günlük mense kadar takiben günlük 0.05 mg azaltarak, E2 seviyelerinde artış, toplanan oosit sayısı ve transfer için kullanabilecek embriyo sayısı, azaltılan GnRHa dozları ile birlikte not edildi. İptal oranları ayrıca azalmıştı. Minidoz protokolde implantasyon ve gebelik oranlarındaki artıştaki doğru eğilim kaydedildi. Çalışmanın retrospektif olması, önyargı meydana getirdiği için dezavantaj oluşturmakta idi.

Bu bulgular, standart uzun GnRHa protokole yetersiz cevap veren 98 hastanın analizi ile oluşan prospektif bir çalışma ile teyit edildi (Olivennes ve ark., 1996). Leuprolide asetat, mid luteal fazda günlük 0.5 mg sc dozda başlandı ve mensten sonra Gn stimülasyonu başladığında günlük 0.25 mg azaltıldı. Otörler, E2 seviyelerinde artış, toplanan oosit ve iyi kalitedeki embriyo sayılarında artış ile KOH cevabında gelişme

olduğunu bildirdiler. Ek olarak, Gn stimülasyon süresi ve ihtiyaç duyulan dozda azalma olduğu bildirildi.

Kötü yanıt verenlerde GnRH antagonist protokol

Antagonistlerin keşfi ile klinisyenler kötü yanıt veren hastalara yeni bir perspektiften bakabildiler. Stimülasyon protokolüne GnRH'ların eklenmesi ile birlikte erken follüküler fazda uzamış supresyona neden olmaksızın AOC'lar için önemli bir zaman olan prematür LH piki engellenmiş oldu. GnRH antagonistlerin ilk kullanımı 1999 yılında olmuştur.

Sadece çok az prospektif randomize çalışma GnRH antagositler ile değişik agonist protokolleri karşılaştırdı. Bunların hiçbiri gebelik oranlarındaki farklılıkları değerlendirecek güce sahip değildi ve 4 vakanın hepsinde de IVF sonuçları benzerdi.

Araştırmacılar GnRH antagonist protokol ile mikrodoz flare rejimi prospektif randomize çalışmalarda karşılaştırdılar. 48 AOC ile yapılan randomize bir çalışmada 24 hasta tedaviyi tamamladı. Schmidt ve ark'nın., 2005 yılında yaptıkları bu çalışmada, kötü over yanıtı hastalarda herhangi bir parametre dikkate alındığında protokoller arasında anlamlı bir fark tespit etmediler. Kötü over yanıtlılardan oluşan her iki grupta da %41'i aşkın önemli ölçüde siklus iptali kaydedildi.

Malsumi ve ark. Tarafından 2005 yılında yapılan randomize prospektif bir çalışmada GnRH antagosnist ve GnRH agonist flare up (full doz) protokol karşılaştırıldı. Transfer edilen embriyoların en iyi kalitede olması, fertilizasyon oranları ve toplanan matür oositler açısından flare up protokolün daha efektif olduğunu buldular. İmplantasyon ve gebelik oranları benzerdi [44].

Doğal siklus [45]

Kötü over yanıtı kadınların bu grubunda efektif alternatif opsiyonların eksikliği nedeniyle geleneksel IVF, doğal siklus IVF deneme yoluna gitmiştir. Ancak, henüz iyi kalitede veri belirlemek için veri yetersizdir.

Letrozol eklenmesi

Aromatazın seçici inhibisyonu estrogenin tüm üretimini önlemektedir ve folliküler sensitivite veya IGF-1 stimülasyonunu geliştirebilecek olan folliküler androjen akümülyasyonunu uyarmaktadır. Yardımlı üremede Letrozol eklenmesi hakkında daha sonra tamamen dayanaksız bulunmasına rağmen güvenlik endişesi duyulması önem arz etmektedir ve sonra kaldırılmıştır ve bu nedenle bu endikasyon ile Letrozol kullanımı henüz onay almamıştır.

Garcia-Valesco ve ark.'nın, 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada önceden iptal edilen IVF siklusu olan toplamda 147 kötü over yanıtı hastanın bulunmakta, bunlardan 71 hastaya FSH/HMG-antagonist rejim ile birlikte 2.5 mg letrozol verildi (ovaryan stimülasyonun ilk 5 günü) ve 76 hasta sadece FSH/HMG-antagonist rejim uygulandı. Letrozol ile elde edilen oosit sayısı anlamlı olarak daha yüksekti (6.1-4.3; p=0.03) fertilizasyon oranında fark yoktu fakat istatistiksel anlamlı olmasa da gebelik oranları daha yüksekti (41.6-28.9%) [46].

Yarali ve ark., tarafından 2009 yılında geniş bir retrospektif vaka kontrol çalışması yapıldı. Bu çalışmada, kötü over yanıt öyküsü olan ve şüphesi olan 885 hastada GnRH antagonist/letrozol protokolünün etkisi mikrodoz GnRH agonist flare up protokol ile karşılaştırıldı. Fertilizasyon ve transfer edilen iyi kalitede en az bir embriyo oranı GnRH antagonist/Letrozol grubunda daha yüksek olmasına rağmen klinik gebelik oranı her iki grupta karşılaştırılabilir düzeyde idi [47].

Letrozolün güvenliği ile ilgili olarak, infertilite için letrozol tedavisi hakkında teratojen (kemik ve kardiyak anomalilerde artış riski), olabileceği ile ilişkili olarak geçmişte olan bazı endişeler rafa kaldırılmaktadır. Ancak bu düşünce daha ileri çalışmalar ile teyit edilmedi. 45 saatten daha kısa yarı ömrü implantasyon öncesi vücuttan hemen hemen tamamen elimine edilir bu nedenle teratojenite potansiyeli düşük gibi görünmektedir. Klomifen sitrat veya letrozol tedavisi sonrası gebe kalan kadınlardan doğan çocuklarda konjenital malformasyon insidansını değerlendirmek için 911 yeni doğan araştırıldı. Letrozol alan kadınlarda doğan çocuklarda tüm kromozomal anomali ve konjenital malformasyonların oranı %2.4 iken klomifen sitrat kullananlarda bu oran %4.8 idi. Tüm kardiyak anomali oranı klomifen sitrat kullananlarda %1.8 iken letrozol kullananlarda

%0.2 (Tulandi ve ark., 2006) idi ki bu durum letrozolün güvenliği ile ilgili olarak rahatlatmıştır [48].

Tedavi öncesi KOKP (kombine oral kontraseptif pil), progesteron veya estrogen

DHEA (dihidroepiandrosteron)

Aspirin

ICSI ve asiste hatching

Mild Protokol

Klasik protokole alternatif olarak oluşturulmuştur. ISMAAR'a göre 'mild' protokol denilmesi için ya GnRH antagonist ile birlikte veya tek başına Gn uygulamasının başlangıçta düşük doz d-sonrasında normal dozda ama kısa süreli devam edilmesi ya da oral ilaçların (anti-estrogenler gibi) ya tek başına ya da Gn ve GnRH antagonist kombinasyonu ile birlikte kullanılması gerekmektedir.

Mild protokol overde daha yumuşak bir etki oluşturmakta daha iyi tolere edilmekte, daha düşük risk oluşturmakta, daha hızlı, daha ucuz ve daha az ilaç ile daha kısa sürede tedavi sağlamaktadır. Diğer taraftan mild stimülasyon protokolü daha az sayıda oosit eldesi sağlamakta ki bunun bir nedeni bu protokolün genç ve iyi cevap veren hastalar için önerilmiş olmasıdır [49].

Mild protokolün beklenen kötü over yanıtı hastalarda uygulanıp uygulanmamasını kontrol amaçlı bazı çalışmalar planlanmıştır. Birkaç küçük çalışmada CC, Gn ve GnRH antagonistlerle kombinasyonları test edilmiştir.

Son çalışmalar, kötü ovaryan cevap için en önemli işaretin ovaryan yaşlanma olduğunu göstermektedir [50]. Ancak, KOH'a 'kötü yanıt verenler' olarak nitelendirilen bu hasta grubundan sorumlu tutulan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır [2].

2.3. Apoptozis

Memelilerde, ovaryan follikülogenezis, kompleks, endokrin, parakrin ve otokrin faktörler ile düzenlenen bir süreçtir [6]. Bir follikül, üç farklı hücre tipinden

oluşmaktadır: bir oosit ve iki farklı tip somatik hücre olan granüloza hücreleri ve teka hücreleri [6].

Kümüls hücrelerindeki gen ekspresyonu ile ilgili çalışmalar sadece oositin büyümesinin ve matürasyonunun anlaşılmasını sağlamakla kalmayıp aynı zamanda, oositin büyümesindeki moleküler mekanizmalara ulaşmayı da sağlamıştır çünkü kümüls hücrelerindeki gen ekspresyonundaki anormallik, oositin büyümesi ve gelişmesinde de anormalliklere yol açacaktır [7]. Apoptozis, ovaryan folliküler atrezi ve luteal regresyon ile ilişkili hücrel bir mekanizmadır. Bir follikül popülasyonundaki granüloza hücrelerinin yüksek oranda atreziye uğraması, follikülü apoptotik hücre ölümüne karşı son derece duyarlı bir hale getirmektedir [8]. Granüloza hücrelerindeki apoptosis, IVF sonuçları üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Apoptotik granüloza hücrelerinin artmış sayısı, boş follikül, az sayıda ve kötü kalitede oosit elde edilmesi, kötü kalitede embriyo oluşumu ve kötü fertilizasyon sonuçları ile de ilişkilidir. Stratum granulozum tabakasından köken alan hücreler iki tipe farklılaşır: sitoplazmik iz düşümler yoluyla gelişmekte olan oosit ile fiziksel temas halinde olan ve oosit gelişmesi ile ilişkili kumulus granüloza hücreleri ve teka interna üzerinde yerleşmiş olan ve follikül rüptürü ve östrojen üretimi için esansiyel olan mural granüloza hücreleri [6]. Yetişkin insan overinde, oosit ve ovaryan follikülün büyümesi ve gelişmesi sürecinde granüloza hücreleri ve oosit arasında parakrin bağlantılar bulunmaktadır. Primordial folliküllerden oosit oluşumunda granüloza hücrelerinin yokluğunda in vitro büyüme başarısız olmaktadır. Kümüls granüloza hücreleri, oosit matürasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve oosit, kümüls granüloza hücre fonksiyonunun önemli bir düzenleyicisidir [51].

Apoptozis, ovaryan folliküler atrezi ve lutealiz ile ilişkili hücrel mekanizmadır [51]. Folliküler büyümenin erken evrelerinde (primordial, primer ve küçük preantral), atrezi, granüloza hücrelerinin ölümünü takiben oosit apoptozisi ile başlatılmaktadır [51]. Gelişmekte olan (geç preantral, antral) ve gelişmiş (sekonder preovulatar) folliküllerin atrezisi, granüloza hücre apoptozisi tarafından ilk kez sınırlandırılmaktadır. Bu folliküllerde atrezi devam ettiği için, ölen granüloza hücre sayısı dramatik şekilde artmaktadır ve apoptotik cisimlerin geniş kitleleri antral boşluğa dökülmektedir [51]. Apoptozis farklı mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Bunlardan en önemli olanı Gn'lerin ve gonadal steroidlerin üretiminin ayarlanmasıdır. Androjenler, granüloza

hücre ölümünü apoptozis ile arttırırken, gonadotropinler ve östrojenler, granüloza apoptozisini önlemekte ve mitotik aktivitelerini stimüle etmektedir. Ek olarak, farelerde, lanosterol metabolik ürünlerinin folliküler gelişim esnasında apoptozisi düzenlediği bulunmuştur [9]. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon follikülogenezinin farmakolojik manüplasyonu ile elde edilmektedir. Major farmakolojik araçlar, Gn'ler, GnRH agonistler ve GnRH antagonistlerdir. GnRH agonistler, hücre zarı üzerinde yer alan GnRH reseptörlerin down-regülasyonu vasıtasıyla Gn hormonlara pitüiter desensitizasyon meydana getirmesi için YÜT'lerine dahil edilmiştir. Tersine, GnRH antagonistler, GnRH reseptörlerde yarışmalı bir blokaj ile Gn sekresyonunda hızlı bir azalma meydana getirmektedir. Dahası, farklı ovaryan stimülasyon protokolleri, apoptotik granüloza hücrelerinin insidansındaki farklılığa da etki etmektedir [52]. Apoptozis inhibisyon proteinleri (IAP), apoptozisin regülasyonunda kaspas aktivasyon yolundaki akış komponentlerini inhibe edebilir ve apoptozisin devam etmesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayabilir [52].

IAP gen ailesinin bir üyesi olan survivin, 17q 25 nolu kromozomda lokalize ve 142 aminoasit'ten oluşan bir protein kodlamaktadır, moleküler ağırlığı 16.5 kD olup 4 ekson, 3 introna bölünmüştür. Survivin gen transkript prosedürlerinin alternatif birleşimi, çok sayıda, farklı proteinler kodlayan farklı survivin variant mRNA'sının uçlarının birleştirilmesidir. Survivin, apoptozisin regülasyonuna, efektör hücre ölüm proteazları olan kaspas-3 ve kaspas-7'nin direkt ve indirekt inhibisyonu ile ve mitotik işi mikrotübüller ile ilişkili olarak G2/M fazında hücre siklusunu düzenleyerek katılmaktadır [52]. Survivin fetal gelişim esnasında çok fazla miktarda eksprese edilmektedir fakat çok sayıda yetişkin dokusunda, deri, timus, endotelial hücreler, proliferatif ve sekretuar endometrium ve granüloza hücreleri gibi normal dokular dışında down-regüle olmaktadır. Survivin, mide, kolorektal, akciğer, meme, pankreas, prostat ve non-Hodgkin lenfomanın da dahil olduğu çok geniş yelpazede insan kanserleri tarafından da %3-%11 arasında bir prevalansla eksprese edilmektedir [53]. Retrospektif olarak analiz yapıldığında, tümörleri survivin eksprese eden kanser hastalarında, hastalığın progresyonunu olumsuz etkileyen markerlar ile ilişkili olarak daha kısa hayatta kalım ve tedaviye artmış direnç sergilemektedir [52]. Fujino ve ark., (2008) infertil hastalarda survivin ekspresyonu üzerinde çalıştılar ve endometriozisli hastalarda survivin gen ekspresyon seviyelerinin, male faktör nedeniyle tedavi alan

hastalara göre anlamlı derecede daha düşük olduğunu buldular. Survivin gen ekspresyon seviyeleri, gebe hastalarda, gebe olmayanlara göre, gebe olmayanlarda da male faktör infertil olanlara göre daha fazla olduğunu buldular [54].

Apopitozis, genetik bir tanımdır ve hücre ölümünün biyolojik fonksiyonel biçimidir. Memelilerde, ovaryan folliküler atrezi, desidualizasyon ve embriyo implantasyonu esnasındaki plasantasyonun da dahil olduğu pek çok fizyolojik olayda ve aynı şekilde pek çok patolojik durumda önemli bir rol oynamaktadır [52]. Apopitozisin majör özelliği, internukleozomal DNA fragmentasyonu, hücre büzüşmesi, plazma membranında kabarma, apopitotik cismin formasyonu ve makrofajlar tarafından fagositozudur. Folliküler büyüme sürecinde, granüloza hücrelerindeki apopitozis nedeniyle foliküllerin %99'dan fazlası kaybolmaktadır. Folliküler atrezi hormonal olarak regule edilmektedir ve ovaryan folliküler büyümenin farklı evrelerde ölmeleri için değişik faktörler etki etmektedir [52]. Kaspas, prot bax, tümör nekroz faktör ailesi üyeleri (TNF- α , Fas, FasL, TRAIL), tümör supresör protein P53, TGF-beta ailesi üyeleri (faktör NODAL ve AMH), c-Myc, endotelinler, androjenler ve nRH'nın da dahil olduğu faktörler.

Başarılı follikül gelişimi, follikül büyümesini destekleyecek ve hücreyi apopitozdan koruyacak survival faktörlerin varlığına bağlıdır. Bunlar overde üretilen faktörlerin yanı sıra gonadotropinleri yani LH ve FSH'yi da içermektedir. Follikül büyümesi ve farklılaşması sürecinde survival süreci başlatan bazı parakrin faktörler; kinase Akt, bcl-2 ailesi üyeleri, KIT-ligand ve c-KIT reseptörleri, stem cell faktör (SCF), TGF-beta ailesi üyeleri (aktivin, BMP-4 ve BMP-7 faktörler, protein diferansiyasyon faktör-9, estrogen, insülin ve IGFs, EGF, bFGF, TGF- α , interlökin 1b, GH, ve apopitoz inhibisyonu üyeleri ve survivin. Follikül atrezi inhibitörlerinin çoğu FSH ve LH tarafından düzenlenmektedir. Büyüyen follikül antral evreye ulaştığı zaman, FSH için reseptör eksprese eder ve FSH stimülasyonuna bağımlı hale gelir. Yeterli FSH konsantrasyonu, follikülün antral evre veya daha ilerisine geçerek yaşayabilmesi için kritiktir. Aynı reproduktif siklus boyunca artan FSH konsantrasyonu, büyüyen follikülü kurtarmaktadır. LH, ovulasyona yaklaşan ve LH reseptörü eksprese eden follikül için önemlidir. FSH ve LH, farelerde sterol yolu boyunca oosit büyümesi ve matürasyonuna etki etmektedir. Lanesterol 14 α -demetilaz (LDM), farelerde lanesterolü FF-MAS2a çeviren fertilizasyon için oosit plazma matürasyonu ve erken embriyo gelişimi için bir

anahtar enzim gibi görülürken, folliküler sıvı mayozis-aktivatör sterol (FF-MAS), insanın da dahil olduğu memelilerin gonadotropinlere cevap veren folliküler sıvısında yüksek konsantrasyonlarda bulunmuş ve oosit mayotik yeniden başlamayı stimüle ettiği ispatlanmıştır [52]. Ek olarak, domuzlarda protein kinaz C (PKC) sinyal yolu ile EGFR aktivasyonu, FSH-nedenli oosit matürasyonuna katılmaktadır [52]. Kumulus hücrelerinde LH reseptör (LHR) ekspresyonu, oositi çevreleyen kumulusların (CEOs) FSH-nedenli mayotik devamı ile ilişkilidir. Oosit matürasyonu sürecinde gonadotropinlerin fizyolojik etklerini anlamaya yönelik önemli bir yeni adım, farelerde kümülüs hücrelerinde LHR ekspresyonu, büyük ihtimalle MAPK kaskadı tarafından regüle edilen, FSH-nedenli oosit matürasyonu sürecinde fonksiyonel bir role sahip olduğu bulgusudur. Tüm bunlara ek olarak, farelerde, FSH, cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA) seviyelerini arttırmakta ve oosit mayotik başlama öncesi kümülüs hücrelerinde sitokrom P450 lanesterol 14 α -demetilaz (CYP51) ekspresyonu ve cAMP'a cevap veren element bağlayıcı protein (CERB) fosforilasyonuna neden olmaktadır. Survival faktörlerin yokluğunda, endojen apoptozis yolu follikülün oluşumu ile birlikte aktive olmakta ve folliküller atreziye gitmektedir.

IVF veya ICSI sikluslarında ovulasyon indüksiyonu sürecinde oosit kalitesinin belirteci olarak luteinize granüloza hücrelerindeki apoptozisin etkisi hakkında literatürde yer alan tartışmalara rağmen bu hücrelerdeki survival faktörlerin prognostik role sahip olduğu tahmin edilmektedir. Örneğin, prognoz için survival faktörlerin geçerliliği IGFs ailesi tarafından sağlanmaktadır. ICF1, ICF2 ve reseptörleri, IVF tedavisi altındaki kadınlarda normal over yanıtılılar ile karşılaştırıldığında azalmış over yanıtılı kadınların ovaryan granüloza hücrelerinde down-regüle edildiği bulunmuştur [52]. Ancak, luteinize granüloza hücrelerinde diğer bazı survival faktörlerin ekspresyonuna ait klinik işaretler hakkında daha fazla çalışma gerekmektedir.

Apoptozis, hipoksiye bir cevap olarak da artabilmektedir. Hipoksinin şiddeti, hücreleri ölmeye veya hipoksiye adapte olup hayatta kalmaya zorlamaktadır [13]. Hipoksik hücrelerden salınan hipoksi ile indüklenen factor-1 (HIF-1); vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiopoetin 1 (ANGPT1) ve ANGPT2, plental büyüme faktörü (PGF) ve trombosit aracılı büyüme faktörü B'nin (PDGFB) de dahil olduğu anjiogenik büyüme faktörlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu aktive etmekte ve anjiogeneze yol açan endotel hücrelerini stimule etmektedir. Heterodimerik bir protein

olan HIF-1, HIF-1 α ve HIF-1 β denilen iki subünitten oluşmaktadır [14]. HIF-1 β 'ya aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator de denilmektedir. HIF-1 α , hipoksi ve HER-2/neu, v-src ve ras gibi onkojenler ile indüklenmektedir. HIF-1 β yapısal olarak üretilmesine rağmen, HIF-1 α 'nın ekspresyonu O₂ konsantrasyonu azaldığında artmaktadır. Hücreler, hipoksiye hızlıca cevap verebilmek için, nonhipoksik şartlarda, HIF-1 α 'nın sentez ve ayrılması için enerji ayırmaktadırlar. Hipoksik şartlar altında, HIF-1 α 'nın bozulması inhibe olur bu durum protein akümüasyonu, HIF-1 β ile dimerizasyon, hedef genlerdeki hipoksiye cevap elementleri ile bağlanma ve CPB ve p300 koaktivatörlerinin alınması yoluyla transkripsiyonun aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. HIF-1'in hipoksi ile indüklenmesi, protein seviyesinde meydana gelmektedir çünkü HIF-1 α mRNA ekspresyonu değişmeden kalmaktadır [13].

HIF-1 α 'daki bozulma, proteozomal bozulma için HIF-1 α 'yı hedef alan E3 ubikütinin-protein bağlayıcı komponent olarak kabul edilen von Hippel-Lindau (VHL) proteininin bağlanması ile kontrol edilmektedir [14]. Farelerde HIF-1 α 'nın tamamen kaybı, yaygın hücre ölümü nedeniyle dramatik vasküler regresyon ile ilişkili olarak midgestasyon embriyo kaybı ile sonuçlanmaktadır. Yine farelerde, HIF-1 α 'nın nöral dokulada üretilmemesine bağlı olarak vasküler regresyon nedeniyle serebral atrofi meydana gelmektedir [14]. İnsanlarda, HIF-1, iskemik kalp hastalığı, kanser, inme ve kronik akciğer hastalığına koruyucu ya da patojenik cevap ile ilişkilendirilmiştir.

HIF-1, VEGF, anjiopoetin 1 (ANGPT1) ve ANGPT2, plesental büyüme faktörü (PGF) ve platelet ilişkili büyüme faktörü (PDGFB)'nin dsa dahil olduğu anjiogenik büyüme faktörlerinin transkripsiyon genlerini aktive etmesinde kritik bir rol oynamaktadır. ANGPT1, ANGPT2, PGF ve PDGFB'yi direkt veya indirekt olarak regüle edip etmediği bilinmemesine rağmen, HIF-1, VEGF transkripsiyonunu direk olarak aktive etmektedir. Bu genlerin regülasyonu hücre tipine spesifiktir. ANGPT2 ekspresyonu, arteryel düz kas hücreleri ve kardiak fibroblastlar ve myositler ile birlikte, arteryel endotel hücrelerindeki hipoksi ile artmaktadır. VEGF, hipokside bu 4 hücre tipinde de artmaktadır. Bu sonuçlar, belirli hücre tiplerinde, HIF-1 hedef genlerinin alt kümesinin belirlenmesindeki önemin altını çizmektedir [14].Fare beyninde yapılan çalışmalar, hipoksi tedavisi sonrasında survivin ve HIF-1 artışı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sonuçlar, HIF-1 α ve survivinin hipoksi bağımlı hücre apoptozisinde koruyucu rol

oynadığını ve hipoksi tarafından survivinin upregüle edilmesinin HIF-1 α bağımlı olduğunu ortaya çıkarmıştır [10].

Sağlıklı bir insanın vücudunda Reaktif oksijen Türleri(ROS) ve antioksidanlar bir denge durumundadır. Bu doğal denge ROS artışı yönünde bozulduğunda oksidatif stres meydana gelir. Reaktif oksijen çeşitleri iki ucu keskin kılıç gibidir; fizyopatolojik süreçte anahtar sinyal molekülü olarak görev alırken aynı zamanda dişi üreme sistemi ile ilgili patolojik süreçte rol alır. Reaktif oksijen çeşitleri oosit oluşumundan döllenmeye, embriyo gelişiminden hamileliğe kadar bir çok fizyolojik süreci etkiler. Endometriosis, tubal and peritoneal faktör infertilitesi ve açıklanamayan infertilitede rol aldığına ilişkin birkaç kanıt vardır [15].

Oksidatif stres yaşla birlikte azalan fertilitiyi modüle eder. Birçok çalışmada infertilite ve fertilitenin değerlendirilmesinin patofizyolojisinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Pek çok çalışma, kadın infertilitesinin prevalansını, vücudun çeşitli kritik mikro ve makro çevresindeki oksidatif stres seviyelerindeki artış ile ilişkilendirmişlerdir. Hücrelerin antioksidan kapasitesi, bu serbest radikalleri ortadan kaldırmak ve temizlemek için azaldığından ötürü, oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı ile sonuçlanmaktadır [55]. ROS'lerindeki dengesizlik, eninde sonunda hücresel yolda ve transkripsiyon faktörlerinde epigenetik farklılıklara ve değişikliklere yol açabilmektedir. Çalışmalar, oksidatif stresin, kadın infertilitesinin patofizyolojisini oluşturan belirli bazı protein yollarında değişikliklere ve çeşitli proteinlerin anormal ekspresyonuna neden olduğunu ortaya koymuştur [55].

Oxidative stress responsive 1 (OXSR1) gen ürünü Serin/Treonin protein kinaz ailesi üyesidir. Çevresel strese cevapta kinazların downstreamini regüle eder ve aktin hücre iskeletinin regülasyonunda rol alır. Ayrıca bu gen oksidatif stres nedeniyle gerçekleşen hücre ölümü ve proliferasyonunun kontrolünde önemli rol oynar [16]. Literatürde OXSR1 geni ile granülosa hücreleri ve infertilite arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma bu tarihe kadar yapılmamıştır. Nitrik Oksit (NO), memeli vücudundaki yararlı veya zararlı birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynayan önemli bir sinyal molekülüdür. Uygun dozlarda NO üretimi, birçok organın zarar görmesinin engellenmesinde (karaciğerin iskemik hasardan korunması gibi) önemlidir. Damarın içteki endotel tabakası NO sinyaliyle kendisini kuşatan damar düz kasını gevşetir bu da

vazodilatasyon ve artmış kan akımı ile sonuçlanır. Yüksek rakımlı yerlerde yaşayan insanlarda hipoksi oluşumunu önlemek için NO sentezi artar. Bu molekül çok sayıda nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin yardımıyla arjinin ve oksijenden veya inorganik nitrat gruplarının indirgenmesiyle nitrovazodilatör ilaç moleküllerinden sentezlenmektedir. NO'yu sentezleyen Endotelial Nitrik Oksit Sentaz(eNOS3) enzimi teka, granüloza hücrelerinde ve oositin yüzeyinde foliküler gelişim boyunca sentezlenir ve birçok biyolojik süreçte önemli rollere sahiptir [15].

SMAD aile üyesi-5 (SMAD5) geni ise granüloza hücrelerinin fonksiyonunu direkt olarak etkileyebilir. SMAD5 geni granüloza hücrelerinin gelişiminde de önemli rol oynayan bir regülatördür. SMAD5 geni Bone morphogenetic protein (BMP), sinyal yolağının anahtar genlerinden birtanesidir ve bu sinyal yolağı apoptozis mekanizmasında görev alır. SMAD5 geni dişi fertilitenin regülasyonunda da önemli role sahiptir. SMAD5'in ovaryan granüloza hücrelerinde gerçekleşen apoptozisteki rolünü araştırmak için yapılan bir çalışmada, SMAD5 mRNA'sı kullanılarak kültüre edilmiş granüloza hücrelerinde bu gen inhibe edilmiştir. SMAD5 inhibisyonu ile birlikte Fas, Fas1, kaspaz 8 ve 3 gibi apoptozisin arttığı işaretleri olan genlerin ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar granüloza hücrelerinde apoptozisin regülasyonunda SMAD5'in önemli rol oynadığını göstermiştir [17].

Literatürde foliküler gelişim boyunca granüloza hücrelerinin kök hücre popülasyonundan köken aldığı birçok çalışmada rapor edilmektedir. Granüloza hücrelerinin kök hücre karakteristiği göstermelerinin ana kanıtı ise telomer bölgeleri ve telomeraz enzimidir. Telomer bölgeleri kromozomların uç kısmında yer alan kromozomun bütünlüğünü ve stabilizasyonunu sağlayan tekrar bölgeleridir. Hücreler bölündükçe her bölünmede telomer bölgeleri telomeraz enzimi tarafından sentezlense de hücre yaşlandıkça bu bölgeler kısalır. Telomeraz enzimi Telomeraz Revers Transkriptaz (TERT) ve Telomeraz RNA (TERC) olmak üzere iki alt ünitelerden oluşur. TERT geni telomeraz enziminin aktivitesinin primer regülatörüdür. Ayrıca TERT geni, Telomeraz enziminin aktivasyonunun mekanizmasında görev almasının yanında, telomeraz enziminden bağımsız olarak apoptozisin regülasyonunda görev alır. Artan apoptozis ile azalan TERT geni ekspresyonu ile koreledir [18, 19]. 3.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Kayseri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezinde Şubat 2016-Nisan 2017 tarihleri arasında, İVF/İCSİ-ET için kontrollü over hiperstimulasyonu uygulanan, kötü over yanıtı olduğu kabul edilen 20 kadın ve normal over yanıtı 16 kadından oluşmaktadır. Tüm hastalardan çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair bilgilendirilmiş yazılı onam alınmıştır. Çalışma için, Kayseri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar ve Etik Kurul onayı alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- İleri maternal yaş (>40)ya da zayıf ovaryan yanıt için diğer risk faktörlerini taşıması
- Daha önceki İVF denemesinde zayıf ovaryan yanıt öyküsünün olması(konvansiyonel ovaryan hiperstimulasyon yöntemleri ile 3'den az oosit elde edilmiş olması)
- Anormal ovaryan rezerv testi olmasıdır [4]

İnfertilite şikayeti ile başvuran tüm hastaların ayrıntılı tıbbi ve reproduktif öyküleri alındı. Hastalar, geçirilmiş ya da mevcut hastalıkları, geçirilmiş ameliyatlar, kullandıkları ilaçlar, sigara, alkol kullanımı, menstrual düzenleri, infertilite süresi, öncesinde gebelik elde edilip edilmediği, elde edildi ise nasıl sonuçlandığı, daha önce yardımla üreme tedavisi alıp almadığı, aldı ise nasıl bir tedavi olduğu ve ne şekilde sonuçlandığı, erkek faktörü olup olmaması yönünden sorgulandı.

Yaş, boy, vücut ağırlığı, BMI kaydedildi. Menstrasyonun 3. günü FSH, LH, E2, Progesteron, TSH, Prolaktin ve tetikleme günü E2 ve Progesteron değerleri ölçüldü ve

TV USG ile endometrium ve AFS'ları değerlendirildi. Ovaryan stimülasyon süresi, kullanılan toplam gonadotropin dozu, aspire edilen folikül sayısı, elde edilen oosit sayısı ve toplanan matür oosit sayıları kaydedildi. Erkeğin spermogram değerleri not edildi.

Tüm hastalara gonadotropinlerle kontrollü ovaryan hiperstimülasyon uygulandı. Kötü over yanıtı olarak kabul edilen 11 kadına yüksek doz (menstrual siklusun 3. günü 375 IU FSH +75 IU LH başlandı, dominant folikül çapı >14 mm ve veya E2 400 pg/ml olduğunda hCG gününe kadar 0.25 mg/gün GnRH antagonisti eklendi), yine kötü over yanıtı olduğu kabul edilen 9 kadına da mild protokol (menstrual siklusun 2. gününden başlayarak 5 gün süreyle 100 mg Klomifen sitrat başlandı, siklusun 6. günü 187.5 IU/gün rFSH +75 IU/gün rLH başlandı ve dominant folikül çapı> 14 mm veya E2 >400 pg/ml olduğunda hCG gününe kadar 0.25 mg/gün GnRH antagonisti eklendi) uygulandı. Normal over yanıtı 16 kadından oluşan kontrol grubuna ise 225 IU FSH +75 IU LH uygulandı. Folikül boyutunu takip etmek amacıyla günlük TV USG yapıldı. Çapı >18 mm iki ya da daha fazla folikül saptandığında ovulasyonu uyarmak amacıyla human chorionic gonadotropin alpha (hCG, Ovitrelle 250 mcg enjektör, Serono) yapıldı.

hCG yapıldıktan 36 saat sonra TV USG eşliğinde yumurta toplama (oocyte pick-up, OPU) işlemi aynı kişiler (ŞAHİN Y., AYGEM E.M, ULUDAĞ S.) tarafından gerçekleştirildi. OPU işleminden 2-5 gün sonra ET gerçekleştirildi. Transferden sonraki 14. günde kanda kantitatif beta-human chorionic gonadotropin (hCG) ölçümü yapıldı. Test sonucunun pozitif olduğu durumda gebeliğin sağlıklı olup olmadığını değerlendirmek için 2 gün sonra test tekrarı yapıldı. Sağlıklı bir artış gözlenen hastalar 15 gün sonra USG kontrolüne çağırıldı. USG kontrolünde endometrial kavitede fetal kardiyak aktivite izlenen olgular klinik gebelik olarak değerlendirildi.

OPU işlemi yapıldıktan sonra granüloza hücreleri hyaluronidaz içeren modifiye insan tubal sıvısı ortamında oositin açığa çıkarıldı. Granüloza hücrelerinden RNA izolasyonları yapıldı, elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı ve sentezlenen cDNA -20 dercede saklandı. Çalışmanın sonunda cDNA örneklerinden Real Time PCR ile genlerin ekspresyonu belirlendi.

3.1. Granüloza Hücrelerinden RNA İzolasyonu

1. Ependorf tüp içine alınan folikül sıvısı üzerine 800µl Trizol eklendi.
2. Daha sonra aynı tüp içerisine 0,8 µl glikojen eklendi ve enjektör yardımı ile hücreler homojenize edildi
3. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 160 µl kloroform eklenmiştir ve 15 sn kuvvetli şekilde vortekslendi.
4. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 12.000 g' de 20 dk +4'C de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan aköz faz yeni bir tüpe alındı.
5. Alınan aköz faz miktarı kadar (1:1) tüpün içerisine isopropanol eklendi ve vortekslendi. Örnekler 5dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında 12.000 g' de 10 dk +4' C de santirfuj edildi.
6. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant atıldı. Pellet üzerine yıkama işlemi için 1000 µl %75' lik etanol eklendi ve kısa bir vortex yapıldı. Sonrasında 7500 g' de 5 dk +4' C de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Pellet üzerine tekrar 1000 µl %75' lik etanol eklendi ve kısa bir vortex yapıldı. Tekrar 7500 g' de 5 dk +4' C de santrifüj edildi. Santifüj sonunda üstte olan supernatant kısım atıldı.
8. Geriye kalan dipteki pellet kısım tüpün ağzı açık bir şekilde oda sıcaklığında 10dk bekletildi. Etanolün uçması sağlanmıştır. Sonrasında pellet üzerine 60 µl Nükleaz Free Water eklendi ve resüspanse edildi.
9. Nanodrop cihazında RNA konsantrasyonu ölçüldü ve çalışılincaya kadar örnekler - 80°C 'ye kaldırıldı.

3.2. cDNA Eldesi

Çalışmaya başlamadan önce hastalara ait bütün RNA örnekleri numaralandırıldı. PCR tüpleri üzerine bu numaralar yazıldı. cDNA sentezi için ROCHE marka Transcriptor High Fidelity cDNA sentezKit (Katalog No: 05091284001) kullanıldı.

(**NOT:** cDNA sentezi yapabilmek için RNA konsantrasyonları 10ng – 100ng arasında olmalıdır.)

cDNA sentezi ROCHE marka Transcriptor High Fidelity cDNA Kit protokolüne göre yapıldı.

1. Reaksiyon Mixinin hazırlanması

	Her bir örnek için (hasta sayısı X tablodaki miktarlar)
Random Primer	1 µl
Oligo Primer	1 µl
dH ₂ O	4,4 µl
RNA	5 µl

Hazırlanan miks çok kısa süre vortekslendikten sonra, tekrar çok kısa süre santrifüj edildi. Ardından her bir PCR tüpüne 6,4 µl miks mikropipet aracılığı ile dağıtıldı. Daha sonra her bir tüpün üzerine 5'er µl RNA örneği eklendi ve hazırlanan tüpler PCR cihazına konuldu.

PCR Programı;

65 °C	10 dakika
-------	-----------

2. Mix Hazırlanışı;

	Her bir örnek için (hasta sayısı X tablodaki miktarlar)
Reaction Buffer	4 µl
Protector RNase Inhibitör	0,5 µl
Deoxynucleotid mix	2 µl
DTT	1 µl
Revers Transkriptaz	1,1 µl

PCR sonunda çıkan ürünler üzerine hazırlanan 2. Mix daha önceki tüpler üzerine 8,6 µl dağıtıldı. Ardından da tekrar PCR cihazına konuldu.

PCR Programının devamı;

29 °C	10 dakika
48°C	60 dakika
85°C	5 dakika
4°C	∞

PCR sonunda elimizde 20µl cDNA ürünü oluşmuştur.

3.3. Preamplifikasyon Aşaması

PreAmplifikasyon için Roche marka cDNA Pre-AMP Master Kit (Katalog No: 06720455001) kullanıldı. Elde ettiğimiz cDNA' lar 1:5 oranında RNase Free Water ile sulandırıldı. Ekspresyon için çalışılacak olan her bir gen yeni bir ependorf tüpte %10 seyreltildi. Sonrasında seyreltilen herbir genden 1,4 µl alındı ve ependorf tüpe primer mix hazırlandı.

		Primer mix
Primerler	% 10 Actin	1,4 µl
	% 10 Birc5	1,4 µl
	% 10 OXSR1	1,4 µl
	% 10 Hif1α	1,4 µl
	% 10 Tert	1,4 µl
	% 10 Nos3	1,4 µl
	% 10 Smad5	1,4 µl
Pre-AMP Master Mix	5 µl	
dH₂O	5,2 µl	
cDNA	5 µl	

Miks hazırlandıktan sonra vortekslendi ve kısa santrifüj yapıldı. Ardından herbir PCR tüpüne 20 µl miks dağıtıldı. Daha sonra üzerlerine 5 µl cDNA eklendi ve PCR cihazına konuldu.

PCR Programı;

95 °C	1 dakika	
95 °C	15 saniye	
60 °C	4 dakika	13 döngü
4 °C	∞	

PCR sonunda 25µl PreAMP cDNA ürünü elde edildi.

3.4. Real-Time PCR

Real Time PCR’da belirlenen genlerin mRNA ekspresyonlarını belirleyebilmek için Roche marka LightCycler® 480 Probes Master Kit (Katalog No: 04707494001) kullanıldı. Daha önceden elde ettiğimiz PreAMP cDNA ürünleri 1/40 oranında sulandırıldı.

	Her bir örnek için (hasta sayısı X tablodaki miktarlar)
Probes Master	10µl
Primer Prob	1µl
dH2O	4µl
PreAMP cDNA örneği(1/40)	5µl
Toplam Hacim	20µl

PreAMP cDNA ürün hariç diğer malzemeler (hasta sayısı X tablodaki miktarlar) 1,5ml’ lik ependorf tüpe konuldu ve reaksiyon miksi hazırlandı. Hazırlanmış olan miks 96’ lık plate içine 15’er µl dağıtıldı. Daha sonra üzerlerine hastalara ait PreAMP ürünlerden 5 µl eklendi. Ardından plate üzeri seffaf kapatıcı ile kapatılıp kısa santrifüj yapıldı. Daha sonra Roche LightCycler® 480 II Real Time PCR cihazına yerleştirildi.

House-keeping gen olarak β-Actin kullanıldı. Bütün örnekler manipasyondan dolayı doğabilecek hataları önleyebilmek için her bir örnek çift çalışıldı.

Roche LightCycler® 480 II Real Time PCR Programı;

Pre-İnkübasyon	95 °C 10 dakika	
Amplifikasyon	95 °C 10 saniye 60 °C 30 saniye 72 °C 1 saniye	45 Döngü
Soğutma	40 °C 30 saniye	

3.5. Analiz

Elde edilen CT değerleri Roche LightCycler® 480 II Real Time PCR cihazında normalize edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Karakteristikleri

Hastaların demografik özellikleri tablo 1’de verilmiştir. Hastaların ortalama yaşı, yüksek doz uygulanan grup için 34.73 ± 5.82 , düşük doz uygulanan grup için 34.89 ± 6.43 , kontrol grubu için 25.56 ± 2.92 (yıl \pm s.s.) olup, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). BMI değerleri aynı sıra ile 24.59 ± 2.44 , 26.61 ± 4.04 ve 25.56 ± 4.29 kg/m^2 olup istatistiksel anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Hastaların ortalama infertilite sürelerine bakıldığında yüksek doz uygulanan grupta 8.82 ± 5.75 yıl, düşük doz uygulanan grupta 4.26 ± 3.96 yıl ve kontrol grubunda ise 4.44 ± 2.19 yıl olup yüksek doz uygulanan gruptaki daha uzun infertilite süresi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). 1.grup ve 2.grup hastaların bazal FSH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemesine rağmen ($p > 0.05$), yüksek doz Gn başlanan grupta FSH değerlerinin daha yüksek olduğu izlenmiştir.

AFS sayısı kontrol grubunda, diğer iki gruba göre önemli ölçüde yüksek olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Tüm gruplar arasında ortalama bazal E_2 , TSH ve Prolaktin için üç grup arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 1).

Tablo 1.Hastaların demografik özellikleri ve bazal hormon değerleri

	Kötü Over Yanıtlı Hastalar				Normal Over Yanıtlı Hastalar		P
	YüksekDoz (Grup 1) n=11		DüşükDoz (Grup 2) n=9		Kontrol grubu n=16		
	Ort±s.s Med. (25p-75p)		Ort±s.s Med. (25p-75p)		Ort±s.s Med. (25p-75p)		
Yaş (Yıl)	34.73 ± 5.82	36 (29- 40) ^a	34.89 ± 6.43	37 (28.5- 39) ^a	25.56 ± 2.92	24.5 (23 - 28) ^b	<0.001
BMI (kg/m2)	24.59 ± 2.44	24 (23- 27)	26.61 ± 4.04	26 (23.5-30.5)	25.56 ± 4.29	24.5 (2.25 - 28)	0.590
İnfertilitesüresi (Yıl)	8.82 ± 5.75	10 (3.5 - 14)	4.26 ± 3.96	3 (1.67 - 7)	4.44 ± 2.19	4.5(2- 6.5)	0.070
FSH (mU/ml)	10.37± 5.98	9.1 (7- 13.7)	7.94 ± 4	7.1(4.7- 10.85)	7.09 ± 1	7.04(6.6-8)	0.200
LH (mU/ml)	6.75 ± 2.07	7.2 (5 - 8.6)	5.56 ± 2.79	5.6 (3.72 - 7.45)	6.52 ± 2.17	6.45(4.15-8.2)	0.632
PROLAKTİN (µg/L)	16.44 ± 3.35	16.4 (14 - 18)	19.95 ± 6.81	18.4 (14.3 - 26.5)	16.39 ± 10.27	14.5(9.25-21.9)	0.330
TSH (mIU/L)	2.08 ± 0.88	2.33 (1.17 - 2.82)	3.6 ± 2.29	3.8 (1.55 - 4.8)	2.32 ± 1.06	2.095(1.6 -2.82)	0.190
AFS	6.18 ± 4.64	5 (3- 9) ^a	5.89 ± 2.32	6 (3.5 - 7.5) ^a	14.81 ± 5.33	14.5 (10.2- 20) ^b	<0.001
2-3. Gün E2 Düzeyi (pg/ml)	72.41 ± 103.86	46 (27 - 58)	79.33 ± 98.52	47 (38.5 - 64)	68.81 ± 96.54	32 (24 - 56)	0.350
2-3. Gün Progesteron Düzeyi (ng/ml)	0.48 ± 0.36	0.4 (0.3 - 0.6)	0.3 ± 0.22	0.15 (0.15 - 0.5)	0.29 ± 0.26	0.17 (0.1 - 0.52)	0.236

*BMI: Body Mass Index (vücut kitle indeksi), FSH: Follikül Stimulan Hormon, LH: Luteinizan Hormon, TSH: Tiroid Stimulan Hormon, AFS: Antral Follikül Sayısı, E2: Estradiol

*Aynı harfler gruplar arasındaki istatistiksel benzerliği gösterirken (p>0,05), farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0,05).

4.2. Siklus Parametreleri

Hastaların ortalama FSH başlangıç dozu yüksek doz uygulanan grup için $375+75$ IU, Düşük doz uygulanan grup için $187.5+75$ IU ve kontrol grubu için $225+75$ IU idi. Ortalama stimülasyon süresi 1. grup için 9.09 ± 1.92 gün, 2.grup için 8.89 ± 0.6 gün ve kontrol grubu için 8.63 ± 1.15 gün ve siklus süresince uygulanan toplam Gn dozu ortalama aynı sıra ile 3726.14 ± 894.09 IU, 1137.5 ± 262.5 IU, 2582.69 ± 334 IU idi. Uygulanan gonadotropin dozundaki fark 1. grupta diğer iki gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.05$).

Ovulasyon tetikleme günü ortalama E2 değeri yüksek doz uygulanan grup için 1016 ± 849.95 pg/mL (365-1027 aralığında), düşük doz uygulanan grup için 764.56 ± 552.16 pg/ml (429.5 – 1182 aralığında) iken kontrol grup için 1444.63 ± 1177.05 pg/ml (681 – 2168 aralığında) idi. Kontrol grubundaki hastalar için ovulasyon tetikleme günü ortalama E₂ değeri yüksek olsa da diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tetikleme günü aspire edilen toplam follikül sayısı aynı sıra ile 5.45 ± 5.12 , 1.67 ± 0.71 , 6.88 ± 3.01 olarak görüldü. Kontrol grubunda aspire edilen follikül sayısı ve alınan oosit sayısı, yüksek doz ve düşük doz gonadotropin uygulanan diğer iki gruba karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 2).

Tetikleme günü TVUSG ile ölçülen ortalama endometrium kalınlıkları yüksek doz uygulanan grup için 9.64 ± 2.11 mm, düşük doz uygulanan grup için 7.94 ± 2.35 mm, kontrol grubu için 10.69 ± 3.66 mm olarak ölçüldü. Ancak her üç grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Grupların kullanılan r-FSH dozu ve stimülasyon süreleri, HCG günü E₂ ve P açısından karşılaştırılması. Aspire edilen folikül sayısı, Toplanan oosit sayısı, Matür oosit sayısının gruplara göre dağılımı

	Kötü Over Yanıtlı Hastalar		Normal Over	p
			Yanıtlı Hastalar	
	Yüksek Doz (Grup 1) (25p-75p) n=11	Düşük Doz (Grup 2 (25p-75p) n=9	Kontrol / (25p-75p) n=16	
Ovaryan stimülasyon süresi (gün)	9 (8 - 10)	9 (8.5 - 9)	9 (8 - 9)	0.705
Total gonadotropin dozu(IU)	4050 (3150 - 4500) ^a	1050 (918.75 - 1312.5) ^b	2700 (2400 - 2700) ^c	0.000
HCG_günü E2 düzeyi(pg/ml)	760 (365 - 1207)	530 (429.5 - 1182)	989.5 (681 - 2168)	0.394
HCG günü progesterone düzeyin(ng/ml)	0.62 (0.5 - 1.07) ^a	0.32 (0.195 - 0.51) ^a	0.71 (0.28 - 1.14) ^b	0.047
Aspire edilen follikül sayısı	5 (1 - 6) ^{a,b}	2 (1 - 2) ^a	7 (5.25 - 8.75) ^b	0.001
Alınan oosit sayısı	1 (1 - 3) ^a	1 (1 - 2) ^a	4.5 (3 - 7.75) ^b	0.001
Toplanan oosit sayısı	1 (0 - 4) ^{a,b}	2 (0 - 2) ^a	3 (2.25 - 4) ^b	0.020
Endometrium kalınlığı(mm)	10 (9 - 11) ^{a,b}	8 (5.75 - 10) ^a	11 (9.25 - 13) ^b	0.035

* Aynı harfler gruplar arasında istatistiksel benzerliği gösterirken (p>0,05), farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Stimülasyon süreleri, düşük ve yüksek doz tedavi verilen hastalar ve normal over yanıtli hastalar arasında benzer olarak izlendi.

Düşük doz gonadotropin uygulanan grup için kullanılan toplam gonadotropin dozu yüksek doz gonadotropin uygulanan grup ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede az olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p<0,05$).

HCG günü E₂, P, aspire edilen folikül sayısı, toplanan oosit sayısı ve matür oosit sayısı yüksek doz tedavi alan hastalarda düşük doz tedavi alan hastalara göre daha yüksek saptanmasına rağmen, fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir ($p>0,05$). Bu parametreler normal over yanıtli hastalarda, diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

4.3. Oosit ve Embriyo Sonuçları

Çalışmaya toplamda 36 siklus dahil edildi. Çalışmaya alınan hastaların 13'ünde (%36,1) embriyo transferi yapılamadı. Bu oran 1. grupta 6/36 (%16,6), 2. grupta 4/36 (%11,1) ve kontrol grubunda ise 3/36 (%8,3) idi. Düşük doz tedavi alan grupta 3 hastada matür oosit çıkmaması ve 1 hastada fertilizasyon olmaması nedeni ile toplam 4 hastada, yüksek doz tedavi alan grupta 2 hastada fertilizasyon olmaması, 4 hastada ise matür oosit çıkmaması nedeniyle toplam 6 hastada, normal over yanıtli hastalardan ise 3 hastada sperm çıkmaması sebebiyle siklus iptali yapılmıştır. ET yapılamayan hastaların dağılımını inceleyecek olursak 1. grupta 6/11 (%54,5), 2. grupta 4/9 (%44,4) kontrol grubunda ise 3/16 (%18,7) teşkil etmektedir

4.4. Gebelik Sonuçları

Embriyo transferi gerçekleştirilen 23 siklusta toplam gebelik oranı %39,1 (s=9) olarak tespit edildi. Bu hastaların 3'nün (%13) β hCG değerleri tekrar düşüş gösterdi ve biyokimyasal gebelik olarak değerlendirildi. Anembriyonik gebelik oranı 1/23 (%4,34) olarak bulundu. Embriyo transferi gerçekleştirilen siklularda toplam 9 (%39,1) klinik gebelik elde edildi. Klinik gebelik gelişen bir hastada (%4,34) 8. gebelik haftasında rutin kontrol esnasında, fetal polün 8 hafta ile uyumlu olduğu ve fetal kalp atışının durduğu gözlemlendi. Hasta missed abort tanısı ile kürete edildi. Yüksek doz tedavi alan grupta hiçbir hastada gebelik elde edilemezken, düşük doz tedavi alan grupta sadece 1

hastada (%11.1) biyokimyasal gebelik oluşmuştur. Kontrol grubunda ise 2'si (%12,5) biyokimyasal, 1'i (%6.25) anembrionik, 1'i (%6,25) missed abort, 4'ü (%25) klinik gebelik olmakla toplam 8 (%50) hastada gebelik elde edilmiştir. Yüksek doz tedavi alan grupta hiçbir hastada gebelik elde edilemezken, düşük doz tedavi alan grupta sadece 1 hastada (%11.1) biyokimyasal gebelik elde edilmiştir. Kontrol grubunda ise 2'si (%12,5) biyokimyasal, 1'i (%6.25) anembrionik, 1'i (%6,25) missed abort, 4'ü (%25) klinik gebelik olmakla toplam 8 (%50) hastada gebelik elde edilmiştir

Klinik gebelik elde edilen hastalar, klinik gebelik elde edilemeyen hastalar ile karşılaştırıldığında, ortalama yaşları (sırası ile, 26,25, 25 $P = 0.270$) ve BMI değerleri (sırası ile, 23.9-25.6 kg/m², $P = 0.208$) benzer olarak bulundu. Klinik gebelik elde edilen hastalarda en sık infertilite nedeni oligoastenospermi (%44,4) iken, klinik gebelik elde edilemeyen hastalarda ise ayrı ayrı tek başına azalmış over rezervi (%41,7) ve tek başına açılanamayan infertilite (%41,7) idi.

Tüm gruplarda matür oosit elde edilen hastalarda fertilizasyon oranları, transfer edilen embriyo sayıları, transfer günü, transfer başına ve siklus başına klinik gebelik oranları arasında fark bulunmadı ($p > 0.05$). Yüksek doz gonadotropin uygulanan grup ile düşük doz gonadotropin uygulanan grup arasında oluşan ve transfer edilen embriyo sayılarında fark yokken, kontrol grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 3. Fertilizasyon oranı, oluşan embriyo sayısı, transfer edilen embriyo sayısı ve transfer gününün gruplar arasında karşılaştırılması

	Kötü Over Yanıtlı Hastalar		Normal Over Yanıtlı Hastalar	P
	Yüksek Doz Grup1	Düşük Doz Grup2	Kontrol Grubu	
	Ort±s.s Med. (25p-75p) n=11	Ort±s.s Med. (25p-75p) n=9	Ort±s.s Med. (25p-75p) n=16	
Fertilizasyon oranı (%)	61.81 ± 46	33.3 ± 43.3	51.46 ± 34.04	0.310
Oluşan embriyo sayısı	1.18 ± 1 ^{a,b}	0.78 ± 0.83 ^a	1.75 ± 0.93 ^b	0.037
Transfer edilen embriyo sayısı	0.64 ± 0.81 ^a	0.67 ± 0.71 ^a	1.63 ± 0.81 ^b	0.005
Transfer günü	1.64 ± 1.36	1.67 ± 1.58	2.38 ± 1.41	0.402
Klinik gebelik/siklus başına%	0 ^a	11.11 ^a	43.75 ^b	0.010
Klinik gebelik/transfer başına%	0	11.11	18.75	0.059

*Aynı harfler gruplar arasında istatistiksel benzerliği gösterirken ($p>0,05$), farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

Yüksek doz tedavi uygulanan 11 hastanın 2'sinde, düşük doz tedavi uygulanan 9 hastanın 3'ünde, kontrol grubu hastalarının da 3'ünde granüloza hücrelerinden survivin eksprese edilemedi. Survivin ekspresyon düzeyinde 1. grup ve 2. grup hastalar arasında fark izlenmemiştir, ancak kontrol grubunda survivin ekspresyonu 2. gruba göre daha yüksek, 1. gruba göre ise daha düşük olarak bulunmuştur ($p>0.05$).

HIF-1 α düzeyi kontrol grubunda 2. gruba göre yüksek, 1. gruba göre düşük olarak bulunmasına rağmen gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. ($p>0.05$).

OXR1 geni yüksek doz gonadotropin uygulanan grupta en düşük düzeyde eksprese edilirken, en yüksek olarak düşük doz gonadotropin uygulanan grupta eksprese edilmiştir. Ancak üç grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

SMAD5 geni en düşük 2. grupta eksprese edilirken, en yüksek ekspresyon seviyesine 1. grupta ulaşılmıştır. Fakat gruplar arası ekspresyon seviyelerindeki fark istatistiksel olarak anlamlı sayılmamıştır ($p>0.05$).

Granüloza hücrelerinde TERT ve eNOS3 genleri hiçbir grupta eksprese edilememiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Kötü over yanıtı ve normal over yanıtı hastalarda granüloza hücrelerinde genlerin ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması

	Kötü Over Yanıtı Hastalar				Normal Over Yanıtı Hastalar		p
	Yüksek Doz (Grup 1)		Düşük Doz (Grup 2)		Kontrol		
	Ort±s.s Med. (25p-75p) n=11		Ort±s.s Med. (25p-75p) n=9		Ort±s.s Med. (25p-75p) n=16		
BIRC5	0.43 ± 0.39	0.32 (0.12 - 0.85)	0.86 ± 1.51	0.22 (0.04 - 1.07)	2.42 ± 6.54	0.26 (0 -0.84)	0.989
	0.62 ± 1.24						0.898
HF1A	0.79 ± 0.8	0.63 (0.19 - 1)	0.34 ± 0.2	0.26 (0.19 - 0.47)	0.72 ± 1.23	0.35 (0.25 - 0.44)	0.312
	0.59 ± 0.64						0.75
OXSRI	0.63 ± 0.47	0.45 (0.25 - 1)	0.54 ± 0.32	0.54 (0.28 - 0.8)	0.81 ± 1.22	0.49 (0.29 - 0.76)	0.951
	0.59 ± 0.4						0.987
SMAD5	0.7 ± 0.97	0.4 (0 - 1)	0.32 ± 0.44	0 (0 - 0.72)	0.33 ± 0.39	0.26 (0 - 0.4)	0.559
	0.53 ± 0.78						0.73

Tablo 5. Düşük ve yüksek doz tedavi verilen ve matür oosit elde edilen, matür oosit elde edilemeyen hastalarda Survivin, HIF-1 α , SMAD5, OXSR1, gen seviyelerinin karşılaştırılması

Yüksek Doz tedavi (Grup 1)				
	BIRC5 Ort \pm s.s.	HIF1 α Ort \pm s.s.	OXSR1 Ort \pm s.s.	SMAD5 Ort \pm s.s.
Matür oosit Var	0.38 \pm 0.37	0.63 \pm 0.45	0.53 \pm 0.34	0.59 \pm 0.66
Matür oosit Yok	0.56 \pm 0.48	1.24 \pm 1.45	0.89 \pm 0.75	1 \pm 1.73
p	0.919	0.682	0.306	0.676
Düşük Doz Tedavi (Grup 2)				
Matür oosit Var	1.14 \pm 1.8	0.38 \pm 0.24	0.63 \pm 0.36	0.48 \pm 0.47
Matür oosit Yok	0.29 \pm 0.49	0.25 \pm 0.1	0.36 \pm 0.15	0
p	0.195	0.697	0.197	0.09

Düşük ve yüksek doz tedavi uygulanan gruplarda matür oosit elde edilen ve elde edilemeyen hastalarda BIRC5, HIF1 α , OXSR1 ve SMAD5 genlerinin ekspresyonları arasında anlamlı farklılık izlenmedi.

Grup 1 (yüksek doz), grup 2 (düşük doz) ve kontrol grupları arasında granüloza hücrelerinde genlerin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

Fig. 1

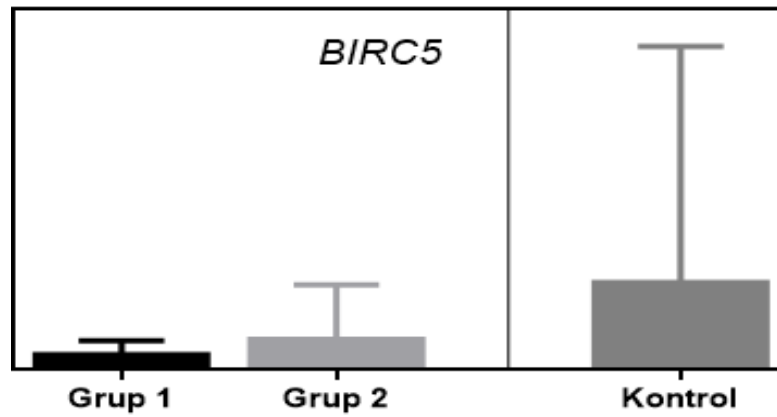
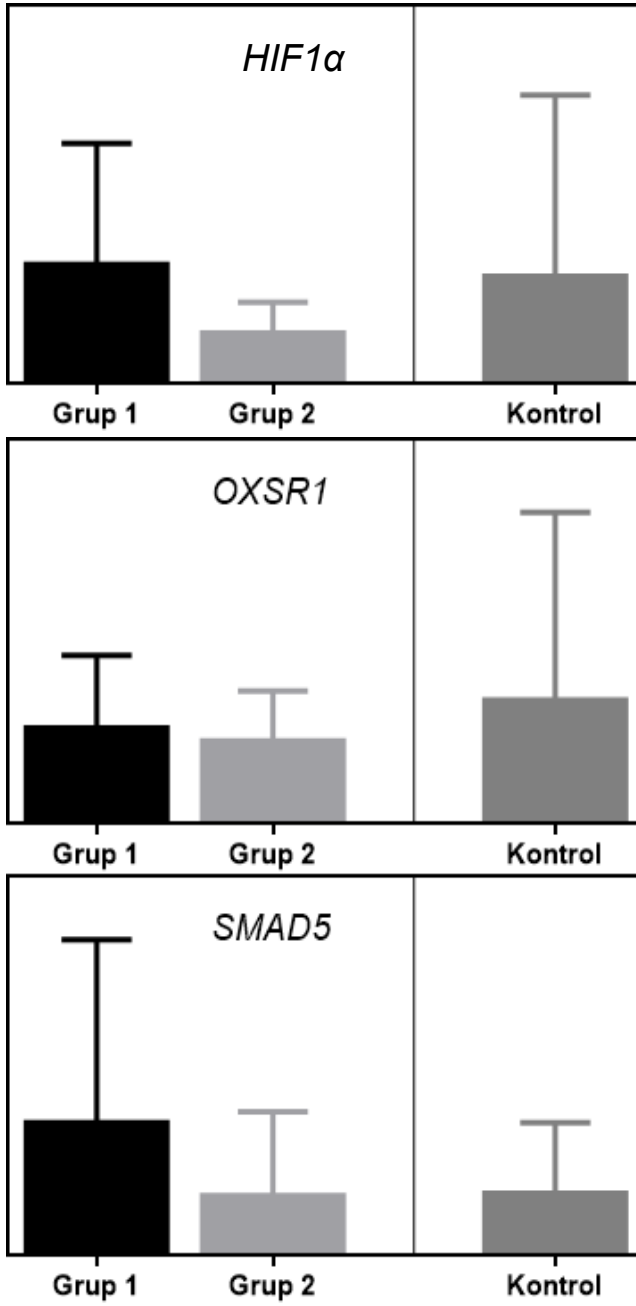
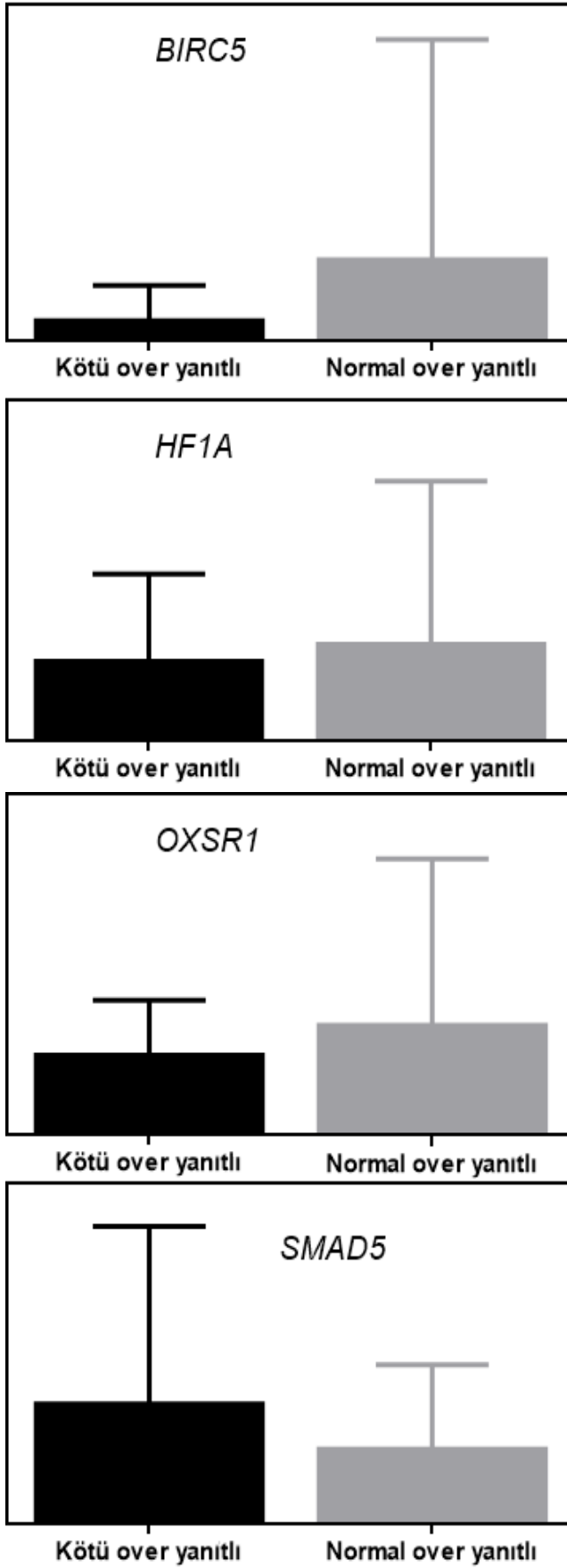


Fig. 2, 3 ve 4



Kötü over yanıtı ve normal over yanıtı hastalarda genlerin ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması

Fig 5, 6, 7 ve 8



5. TARTIŞMA

İnfertilite tüm dünyada çiftlerin %13-15'ini etkilemektedir [1]. Prevalansı değişkenlik göstermek ile birlikte, gelişmiş ülkelerde daha az görülürken, araştırma ve tedavi imkanlarının kısıtlı olması nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde daha fazla görülmektedir.

İlk IVF bebeğin doğumundan itibaren 30 yıldan fazla zamandır, gebelik sonuçlarını geliştirmek için çok çeşitli KOH protokolleri kullanılmaktadır. GnRH antagonist veya agonist ko-tedavisi ile birlikte veya tek başına, farklı dozlarda farklı gonadotropin preparatları ile değişik protokoller geliştirilmiştir. Dahası, gebelik sonuçlarını arttırmak için çeşitli adjuvanlar tedaviye eklenmiştir. Şuanda, kullanılan KOH protokollerinde ülkelerdeki demografik yapılar, finansman akışı ve mevcut yönergeler/mevzuatlara göre değişiklikler mevcuttur.

Bazı otörler, klasik stimülasyon protokollerini hastaların karakteristiklerine göre modifiye ederken, ki buna bireyselleştirilmiş KOH denir, diğerleri standart, hasta dostu, düşük Gn dozları içeren düşük yoğunlukta stimülasyon protokollerini benimsemektedir.

Açıķçası, herkese hitap edecek bir protokol bulunmamaktadır bu nedenle KOH bireyselleştirilmelidir. Hormonal, fonksiyonel ve genetik biyomarkerlar ile en uygun KOH protokolünü uygulamak için çaba sarfedilmektedir. Bireyselleştirilmiş KOH'un amacı: 1) kötü veya aşırı cevap yüzünden siklus iptallerinin engellenmesi 2) stimülasyon yükünü en aza indirmek 3) artmış canlı doğum oranları 4) azalmış çoğul gebelik oranlarıdır [26].

KOH'un bireyselleştirilmesi için stimülasyona verilen ovaryan cevabın bilinmesi ya da öngörülmesi gerekmektedir. Bunun için hastalar kötü over yanıtı, normal over yanıtı ve artmış over yanıtı olarak ayrılmaktadır.

Bir çok faktör, ovaryan stimülasyona yetersiz cevap ile ilişkili olabilir. Yaşlı hastalarda over rezervinin azalması veya genç hastalarda erken ovaryan yaşlanma, daha önce geçirilmiş ovaryan cerrahi ve pelvik adezyonlar bu sebepler arasında sayılabilir [3]. Ancak, etyolojisi ne olursa olsun, hastaya doğru stimülasyon rejimi uygulayabilmek için, kötü over cevabının önceden tespit edilmesi olağanüstü önem arz etmektedir. Over rezerv testleri genellikle azalmış over rezervi için tarama testi olarak kullanılmaktadır. Gonadotropin stimülasyonuna verilen yanıtı ve klinik gebelik elde edebilme şansını öngörebilmek için günümüze kadar yaş, bazal serum FSH, bazal serum estradiol, bazal serum inhibin-B, bazal antimüllerian hormon, bazal ovaryan hacim, bazal antral folikül sayısı, ovaryan stromal kan akımı, ovaryan biyopsi, Klomifen sitrat challenge test (CCCT), GnRH agonist stimülasyon test (GAST), eksojen FSH ovaryan rezerve test (EFORT) gibi over rezervinin indirekt göstergesi olan birçok test kullanılmıştır. Maalesef, çok sayıda test önerilmesine rağmen, hiçbirisi ovaryan cevabı belirleyebilmek için doğru prediktif test olmamaktadır. Bununla birlikte ideal test, ovaryan stimülasyona overlerin cevabı gibi görünmektedir [3].

Bu çalışmada over rezervini değerlendirmek için, yaş, bazal FSH, bazal estradiol, bazal antral folikül sayısı kullanılmıştır.

Mevcut literatürde geniş farklılıklar olması nedeniyle kontrollü ovaryan stimülasyona kötü over cevabının insidansını saptamak zordur. Ancak, IVF tedavisi alan hastaların %9-24, siklusların %9-18'i KOH uygulanan kadınların %2-30'unda kötü over cevabı bulunduğu ortaya koyulmaktadır [28].

Stimülasyona kötü over yanıtı veren kadınları tanımlamak için ilk sistematik girişim 2011 yılında the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) tarafından yayınlanmış ve 'Bologna kriterleri' olarak adlandırılmıştır [4]. Bologna kriterlerine göre, aşağıdaki 3 maddeden 2 sine sahip olmak, POR tanımı için yeterli kabul edilmektedir [4];

- (i) Ortalama maternal yaş (≥ 40 yıl) veya herhangi bir başka risk faktörü,
- (ii) Daha önce uygulanan tedaviye kötü ovaryan cevap geliştirmek (siklus iptali veya klasik protokol ile ≤ 3 oosit gelişmesi),
- (iii) Anormal bir over rezerv testi (ORT) AFS $< 5-7$ follikül veya AMH $< 0.5-1.1$ ng/ml – ESHRE'ye göre AFS ve AMH, ovaryan rezervi predikte etmekte 3. gün follikül stimüledici hormon (FSH) düzeyine göre daha anlamlı olmaktadır.

Bu çalışmada, hastalar Bologna kriterleri esas alınarak dahil edilmiştir.

Yaş faktörü ve anormal ORT yokluğunda ise, daha önce maksimum stimülasyon sonrasında iki kez kötü ovaryan cevap geliştirmiş olması da hastanın kötü over yanıtı olarak tanımlanması için yeterli olarak kabul edilmektedir (Bologna kriterlerinin 4. özelliği olarak kabul edilmektedir) [5].

Reproduktif yaşlanma, primordial follikül havuzunun azalması ve oosit kalitesinin kaybı ile ilişkilidir. Bir IVF programında ovaryan yaşlanma azalmış ovaryan cevap ve azalmış gebelik oranları ile karakterizedir [24].

Bu çalışmada yaş ve AFS açısından gruplar arasında anlamlı fark izlenmektedir. Hastaların ortalama yaşı, yüksek doz uygulanan grup için 34.73 ± 5.82 , düşük doz uygulanan grup için 34.89 ± 6.43 , kontrol grubu için 25.56 ± 2.92 (yıl \pm s.s.) olup, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). AFS sayısı kontrol grubunda, diğer iki gruba göre önemli ölçüde yüksek olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

IVF başarısı için overlerin stimülasyona verdikleri cevap son derece önemlidir. Kötü over yanıtı hastalarda stimülasyona yetersiz cevap geliştiği için kullanılan toplam Gn dozu, stimülasyon süresi, siklus iptal oranı artmakta bununla birlikte elde edilen oosit sayısı, transfer edilen embriyo sayısı ve gebelik oranı azalmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan toplam Gn dozu yüksek doz gonadotropin uygulanan grup için ortalama 3726.14 ± 894.09 IU, düşük doz uygulanan grup için 1137.5 ± 262.5 IU, kontrol grubu için 2582.69 ± 334 IU idi. Her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p < 0.05$).

Kötü over yanıtı hastalarda siklus iptal oranlarının fazla olması, tedavi sürecini olumsuz etkilemekte ve hayal kırıklığı meydana getirmektedir. Ovaryan stimülasyona kötü yanıt daha çok yaş ile ilişkili olsa da genç kadınlarda da görülebilmektedir. Bazen normal FSH değerlerine sahip genç kadınlarda da agresif tedavi protokolüne rağmen siklus iptalleri meydana gelebilmektedir [42].

Bu çalışmada siklus iptal oranlarının yaş ile dağılımına baktığımızda 20-35 yaş grubu hastalar için bu oran %38,5 (s=5), 35-45 yaş grubunda ise % 61,5 (s=8) olup iki katına yakın bir fark izlenmiştir. Bu durum kötü over yanıtı hastalarda en önemli prognostik faktörün yaş olduğu gerçeği ile uyumludur.

Klinisyenler, kötü over yanıtı hastalar için, GnRHa'in farklı dozlarını kullanarak, Gn düzeylerini arttırarak, estrojen, GH, CC veya kontraseptif tablet ekleyerek ya da doğal siklus takibi yaparak çok değişik yöntemler denemişlerdir [42].

İlk başarılı İVF gebeliği naturel siklusta elde edilen tek bir oositten gelişen embriyonun canlı doğumu ile elde edilmiştir. Naturel siklusta İVF uygulamalarında düşük başarı oranının nedeni, erken LH piki ve ovulasyona bağlı yüksek oranda siklus iptalleri idi. GnRH agonistlerinin ve daha sonra antagonistlerinin İVF pratiğinde uygulanabilirliği daha az monitörizasyon ve daha yüksek gebelik oranları ile başarının artmasına sağlamıştır. GnRH agonist uygulaması kısa bir süre gonadotropin hipersekresyonundan sonra hipofizer desensitizasyon ile gonadotropin supresyonu yapar. Antagonistler ise GnRH reseptörlerinin kompetitif inhibisyonu ile hızlı gonadotropin supresyonuna neden olurlar. Antagonist kullanımının endojen gonadotropinlerin akut stimülasyonu olmaması, analog tedavilerin kısa sürmesi, gonadotropin ihtiyacının azalması, folikül kisti gelişim riski olmaması ve daha az oranda OHSS gelişmesi gibi gösterilmiş avantajları vardır. Antagonistlerin agonistlere göre dezavantajları ise klinik gebelik oranlarının düşük olması, günlük uygulamaya uyulması gerekliliği ve bazı hastalarda LH takviyesi gerekliliğidir. Karşılaştırılmalı çalışmalarda randomize edilen hasta başına canlı doğum oranlarında fark olmadığı unutulmamalıdır ve protokol seçimi avantajlar ve dezavantajlar gözetilerek hastaya yönelik olmalıdır.

Weismann A. ve ark.'nın, yapmış oldukları bir çalışmada yüksek doz ve flare protokol uygulayarak randomize edilen 60 hasta dahil edilmiştir. Yüksek doz uygulanan grupta elde edilen oositlerin ve siklus başarısının daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur [43].

Malmusi S. ve ark.'nın, yaptığı diğer bir çalışmada GnRH agonist ve GnRH antagonist rejimler karşılaştırılmış, elde edilen matür oosit, fertilizasyon oranı ve transfer edilen iyi kalitedeki embriyo sayısının GnRH flare protokolde anlamlı ölçüde yüksek bulunduğu gözlenmiştir [43].

Merviel P. ve ark.'nın, yaptığı bir diğer çalışmada 440 kötü over yanıtı hasta çalışmaya alınmış ve bu hastalara ilk IVF sikluslarında long GnRH agonist protokolü (P1) uygulanmıştır. Bu siklusta hiçbir hastada gebelik elde edilememiştir. Bu hastalar 2. IVF siklusuna süresince takip edilmiştir. Sonrasında hastalar eşit olarak iki gruba ayrılmış, P2 grubunda kontraseptif hap+flare-up GnRH agonist protokol uygulanırken, P3 grubunda GnRH antagonist protokol uygulanmıştır. Elde edilen ve transfer edilen oosit sayısı P2 grubunda anlamlı derecede yüksek olmasına rağmen, implantasyon ve devam eden gebelik oranı her 2 grupta (P2, P3) eşit olarak saptanmıştır [56].

Schimberni M. ve ark.'nın, yaptığı bir diğer çalışmada 3 grup hastaya farklı protokoller uygulanarak karşılaştırılmıştır. 1. gruptaki 68 hastaya CC+FSH+ GnRH antagonist, 71 hastanın dahil edildiği 2. gruba FSH+ GnRH antagonist, 3. gruptaki 75 hastaya ise FSH+GnRH agonist uygulanmıştır. GnRH agonist protokol CC ve GnRH antagonist grubuna kıyasla önemli derecede yüksek gebelik oranı (%29,3, %5,9 ve 14,1, sırasıyla), daha fazla oosit eldesi, yüksek estradiol seviyesi ve endometrial kalınlık artışı göstermiştir. Her doğan bebek için ilaçların maliyeti GnRH agonist protokolü için diğerlerine göre daha düşük olduğu görülmüştür [57].

Bununla birlikte Avrupa Orta Doğu Orgalutran® çalışma grubu tarafından gerçekleştirilen çok merkezli, randomize bir çalışmada, 0.25 mg ganirelix'in etkinliğini ve güvenilirliğini değerlendirmek için, long protokolde triptorelin kullanımı referans alınmıştır. Toplamda 236 kadın ganirelix (0,25 mg), 119 kadına ise triptorelin tedavisi uygulanmıştır (2:1 oranında). Ganirelix tedavisi siklusun 6. gününde başlanırken, triptorelin önceki siklusun 21-24 günleri arasında verildi (yani midluteal fazda). Ganirelix rejimi triptorelin rejimine kıyasla ortalama 17 gün daha kısa sürdü (9 güne karşı 26 gün). Ortalama total recombinant FSH dozu ganirelix protokolünde 450 IU

daha az kullanıldı. Başlangıçta folliküler gelişim hızı daha fazla idi, bu nedenle HCG günü E₂ düzeyi daha yüksek olarak tespit edilmiştir. HCG günü ≥ 11 mm follikül sayısı ganirelix ve triptorelin için sırasıyla 10.1 ve 10.7, ortalama serum E₂ düzeyi ise 1090 pg/mL ve 1370 pg/mL olmuştur. Deneme başına ganirelix ve triptorelin için 7.9 ve 9.6 osit elde edilmiştir. Fertilizasyon oranı ve iyi kalitede embriyo eldesi ve implantasyon oranının her 2 grup için benzer olduğu tespit edilmiştir. Tedavi sonrası elde edilen gebelik oranlarının da karşılaştırılabilir düzeyde olduğu saptandı. Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde ovaryan stimülasyon süresinin kısalığı, güvenilirliği, hastalar tarafından daha iyi tolere edilmesi nedeniyle ganirelix yeni tedavi rejimi olarak düşünülmektedir [58].

Bu çalışmada, daha kısa tedavi süresi, daha düşük doz ilaç uygulaması, hastalar tarafından daha iyi tolere edilmesi bunun yanısıra yapılan çalışmalarda GnRH_a ve GnRH antagonist protokol arasında fertilizasyon oranı, iyi kalitede embriyo eldesi ve gebelik oranları arasında anlamlı bir fark bulunmaması nedeniyle hastalara düşük dozda (187.5 +75 IU) ve yüksek dozda (375 + 75 IU) Gn ile birlikte GnRH antagonist (0.25 mg/gün Cetrotite) uygulandı.

Kuang Y. ve ark.'nın, yaptığı ilginç bir çalışmada ise kötü over yanıtı (Bologna kriterlerine göre tanımlanmış) 38 kadında folliküler ve luteal fazlar boyunca çift stimülasyonun etkinliği araştırılmıştır. 38 hastaya mild stimülasyon başlanmıştır. İlk oosit elde edildikten sonra follikül gelişimini artırmak için HMG ve letrozol uygulanıp, dominant follikül olgunlandığında ikinci kez oosit toplanmıştır. Birinci aşamada elde edilen oositlerin sayısı: 1.7 ± 1.0 ; İkinci aşamada 3.5 ± 3.2 idi. Çifte stimülasyondan toplam 167 oosit toplandı ve 38 kadından 26'sının (% 68.4) embriyoları daha sonra transfer için donduruldu. Çalışma 13 klinik gebelik ile sonuçlandı. Çalışma, aynı menstrual siklustaki çift over stimülasyonunun, kötü cevap verenlerde oosit eldesi için daha fazla fırsat sağladığını tespit etmiştir (Shanghai protokol) [59].

Prapas Y. ve ark.'nın, yaptığı randomize kontrollü bir çalışmada 162 normal ovaryan yanıtı kadında uzun GnRH agonist protokolü ve 168 kötü over yanıtı kadında ise GnRH antagonist protokolü karşılaştırılmıştır. Transfer edilen embriyo sayısı ve implantasyon oranları her 2 grup için de benzer olarak tespit edilmiştir. Transfer başına klinik gebelik oranları da her 2 grup için farklı bulunmazken, agonist uygulanan grupta

siklus başına gebelik oranı antagonist gruba karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek bulunmuştur (%35,8 ile % 25,6, $P<0,05$) [60].

Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Siklus başına gebelik oranı yüksek doz uygulanan grup için %0, düşük doz uygulanan hastalar için %11.11 olup iki grup arasında istatistiksel fark izlenmemiştir ($p>0.05$), kontrol grubunda ise %43,75 olup diğer iki grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($P<0,05$).

2007 yılında Baart ve ark.'nın yaptığı çalışmada, mild ovaryan stimülasyon protokolü ile elde edilen oosit sayısının daha az olduğu fakat aynı zamanda oosit ve embriyo kalitesinin daha iyi olduğunu ortaya koyulmuştur [61]. Devroey 2004 yılında mild protokolün endometrial reseptiviteyi arttığını göstermiştir [62].

Yoo ve ark.'nın, 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada 285 kötü over yanıtı kadın retrospektif olarak analiz edilmiştir. Toplamda 119 siklus mild ovaryan stimülasyon, 270 siklus ise klasik ovaryan stimülasyon ile gerçekleştirilmiş. Analiz retrospektif olarak yapılmıştır. Sonuç olarak, m-IVF grubunda stimülasyon süresi, kullanılan total Gn dozu, hCG günü serum E2 seviyeleri, elde edilen oosit sayısı ve matür oosit sayısı daha düşük olarak bulunmuştur. 37 yaş üstü kadınlarda m-IVF grubunda klinik gebelik oranı ve canlı doğum oranı c-IVF grubundan daha yüksek olarak bulunmuştur ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sonuç olarak kötü over yanıtı hastalarda mild ovaryan stimülasyon protokolü, klasik stimülasyona göre daha düşük maliyetli ve hasta dostu bir protokoldür. Bu nedenle 37 yaşın üzerindeki kötü over yanıtı hastalarda bu protokolün uygulanması önerilmektedir [63].

Kötü over yanıtı hastaların tedavisindeki zorluk ve anlaşılmazlık konu ile ilgili moleküler düzeydeki araştırmaları önemli hale getirmiştir. Memelilerde, ovaryan follikülogenezis, kompleks, endokrin, parakrin ve otokrin faktörler ile düzenlenen bir süreçtir [6]. Bir follikül, üç farklı hücre tipinden oluşmaktadır: bir oosit ve iki farklı tip somatik hücre olan granuloza hücreleri ve teka hücreleri [6].

Kümüls hücrelerindeki gen ekspresyonu ile ilgili çalışmalar sadece oositin büyümesi ve matürasyonunun anlaşılmasını sağlamakla kalmayıp aynı zamanda, oositin büyümesindeki moleküler mekanizmalara ulaşmayı da sağlamıştır çünkü kümülüs hücrelerindeki gen ekspresyonundaki anormallik, oositin büyümesi ve gelişmesinde de

anormalliklere yol açacaktır [7]. Apoptozis ovaryan folliküler atrezi ve luteal regresyona yol açan hücrel bir mekanizmadır. Apoptotik granüloza hücrelerinin artmış sayısı, boş follikül, az sayıda ve kötü kalitede oosit elde edilmesi, kötü kalitede embriyo oluşumu ve kötü fertilizasyon sonuçları ile de ilişkilidir [9].

Ovaryan apoptozis için androjenler, GnRH ve analogları uyarıcı rol oynarken estrogen, FSH, LH ve hCG inhibitör rol oynamaktadır [64]. IVF sonuçları için apoptozisin derecesi prediktif bir değer oluşturmaktadır. Diğer organlarda vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve apoptozis arasında bir ilişki tanımlanmış olmasına rağmen bu durum henüz insan overinde çalışılmamıştır [64].

Survivin, apoptozis inhibitör proteinlerinin (AIPs) en küçük üyesidir ve caspas inhibitör fonksiyonu için esansiyeldir [6]. İnsan kanserlerinde ve fetal dokuda ekspresyon edilir hastalığın agresifliği ile ve kötü sonuçlanması ile de ilişkili bulunmuştur [65]. Yapılan çalışmalar, survivin'in görevlerinin sadece apoptozisin inhibisyonu ile sınırlı olmadığını aynı zamanda, mitotik bölünmede de bir kontrol noktası olduğunu ortaya koymuştur. Son çalışmalar survivin ekspresyonunun hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda çok sayıda kanser için survivin ekspresyonu araştırılmıştır. Survivin'in kanserlerin istenmeyen sonuçları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Fujino ve ark., (2008) infertil hastalarda survivin ekspresyonu üzerinde çalıştılar ve endometriozisli hastalarda survivin gen ekspresyon seviyelerinin, male faktör nedeniyle tedavi alan hastalara göre anlamlı derecede daha düşük olduğunu buldular. Survivin gen ekspresyon seviyeleri, gebe hastalarda, gebe olmayanlara göre, gebe olmayanlarda da male faktör infertil olanlara göre daha fazla olduğunu buldular [54].

Yapılan çalışmalarda hücre döngüsü regülasyonu ile ilişkili bir protein ve apoptozun inhibitörü olarak hareket eden survivin geninin granüloza hücrelerinde önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, survivin granüloza hücrelerinin apoptozdan korunmasıyla yakından bağlantılı ve IVF-ET sonucunu etkiliyor olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada yüksek doz ve düşük doz Gn tedavisi ile randomize edilen hastalarda survivin gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve en yüksek ekspresyon oranı yüksek doz uygulanan grupta görüldü 0.32, mild protokol alan grup için 0.22 ve kontrol grubunda ise 0.26 olarak bulundu. Yüksek doz ve düşük doz tedavi alan kötü over yanıtı hastalar tek grup altında birleştirildiğinde survivin gen ekspresyonu 0.62 ± 1.24 olup kontrol grubunda ise $2.42\% \pm 6.54$ olarak tespit edilmiştir. Tüm bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Gebelik elde edilen 9 hastadan 7 sinde (%77.7) survivin ekspresyonu sağlanmıştır. Bu da azalmış survivin ekspresyonunun, azalmış over rezervi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde farklı stimülasyon protokollerinin survivin üzerine etkisini gösteren ve kötü ve normal over yanıtı hastalarda survivin ekspresyonunu karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Hipoksik hücrelerden salınan hipoksi ile indüklenen factor-1 (HIF-1); anjiogenik büyüme faktörlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu aktive etmekte ve anjiogenezise yol açan endotel hücrelerini stimule etmektedir. Heterodimerik bir protein olan HIF-1, HIF-1 α ve HIF-1 β denilen iki subünitten oluşmaktadır [14]. Son yapılan çalışmalar parsiyel HIF-1 α eksikliğinin konjenital kalp hastalıkları ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır [66]. HIF-1 α , beyin, kalp, böbrek ve akciğerdeki HIF-1 α mRNA ve protein seviyelerindeki değişiklik ile oluşan hipoksi tarafından arttırılmaktadır.

Fare beyninde yapılan çalışmalar, hipoksi tedavisi sonrasında survivin ve HIF-1 artışı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sonuçlar, HIF-1 α ve survivinin hipoksi bağımlı hücre apoptozisinde koruyucu rol oynadığını ve hipoksi tarafından survivinin upregüle edilmesinin HIF-1 α bağımlı olduğunu ortaya çıkarmıştır [10].

Bu çalışmada yüksek doz uygulanan hastalarda HIF 1 α gen ekspresyon düzeyi 0.79 ± 0.8 , düşük doz uygulanan hastalarda 0.34 ± 0.2 ve kontrol grubunda 0.72 ± 1.23 olarak bulunmuştur. Kötü over yanıtı hastalar bir grupta toplandığında 0.59 ± 0.64 'tür. Ancak tüm bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Başarılı follikül gelişimi, follikül büyümesini destekleyecek ve hücreyi apoptozdan koruyacak survival faktörlerin varlığına bağlıdır. IVF veya ICSI sikluslarında ovulasyon

indüksiyonu sürecinde oosit kalitesinin belirteci olarak luteinize granüloza hücrelerindeki apoptozisin etkisi hakkında literatürde yer alan tartışmalara rağmen bu hücrelerdeki survival faktörlerin prognostik role sahip olduğu tahmin edilmektedir. Örneğin, prognoz için survival faktörlerin geçerliliği IGFs ailesi tarafından sağlanmaktadır. ICF1, ICF2 ve reseptörleri, IVF tedavisi altındaki kadınlarda normal over yanıtılılar ile karşılaştırıldığında azalmış over yanıtılı kadınların ovaryan granüloza hücrelerinde down-regüle edildiği bulunmuştur [52]. Ancak, luteinize granüloza hücrelerinde diğer bazı survival faktörlerin ekspresyonuna ait klinik işaretler hakkında daha fazla çalışma gerekmektedir.

Serbest radikal türleri değişken ve yüksek ölçüde reaktiftir. Nükleik asit, lipit, protein, karbonhidrat veya hastalık ya da hücrel yaralanma ile sonuçlanan zincir reaksiyon kaskadına neden olan moleküllerden elektron aldıktan sonra kararlı hale gelmektedir. Serbest radikal türlerinin iki ana tipi vardır; reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (NOS) [67].

ROS 100'den fazla hastalık ile ilişkilendirilmektedir. Bu durumlar kadın infertilitesinde fizyolojik ve patolojik role sahiptir. Çok sayıda hayvan ve insan ile yapılan çalışmalarda kadın üreme sisteminde (overler, fallop tüpleri ve embriyolarda) ROS'un varlığı tanımlanmıştır. ROS, oosit matürasyonu, ovaryan streoidogenezis, korpus luteum fonksiyonu ve luteolizis gibi fizyolojik reproduktif fonksiyonların tüm spektrumunun düzenlenmesi ile ilişkilidir [67]. ROS-ilişkili kadın fertilitesindeki bozukluklar ortak etiopatogenik mekanizmalara sahip olabilir. Literatürde OXSR1 geni ile granüloza hücreleri ve infertilite arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma bu tarihe kadar yapılmamıştır. NO, L-arjininin, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi ile L-sitrüline enzimatik dönüşümü sürecinde meydana gelmektedir. Reaktif nitrojen ürünleri astım, iskemik/reperfüzyon hasar, septik şok ve ateroskleroz ile ilişkilidir. 3 tip NOS vardır; endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS). eNOS, teka hücrelerinden, granüloza hücrelerinden ve folliküler gelişim sırasında oositin çevresinden eksprese edilmektedir [70]. Ancak literatürde infertil hastalarda granüloza hücrelerinden eNOS ekspresyon düzeyine dair bir çalışma bulunmamaktadır.

Khorram O. ve ark.'nın, yapmış oldukları immünohistokimyasal analizde, eNOS, ağırlıklı olarak glandüler epitel ve vasküler endotelde eksprese edilmiştir.

Endometriyozisli kadınların ötopik endometriumunda, fertil kontrol grubu ile kıyaslandığında eNOS ekspresyonunun gerçekleştiği bildirilmiştir. Endometriyal proteinin ekspresyonunun bu anormal kalıpları bu gibi durumlarda sık görülmektedir ve bu hastalığın patofizyolojisinde daha fazla bilgi sağlayabilmektedir. Ayrıca, embriyo implantasyonu boyunca yüksek eNOS ekspresyonu, endometriumun implantasyona daha az duyarlı olmasına neden olabildiği öne sürülmüştür [68].

Wang J.H. ve ark.'nın, yaptığı bir çalışmada endometriozis kaynaklı infertil grup ve kontrol grubu arasında eNOS seviyeleri karşılaştırılmıştır. Endometriozis kaynaklı infertil olan 30 hastada eNOS'un endometriyal ekspresyon düzeyi in situ serviks karsinomu olan 19 kadının dahil edildiği kontrol grubuna göre daha yüksek tespit edilmiştir. Endometriozisli kadınlarda 3 aylık GnRH-a tedavisi sonrası eNOS ekspresyonunu azaldığı da bildirilmiştir. Ayrıca serum E₂ veya P konsantrasyonlarının in vivo endometriumda eNOS'un ekspresyon seviyeleri ile korele olduğu ilk kez Wang J.H. ve ark.'nın yaptığı bu çalışmada gösterilmiştir [69].

Bizim çalışmamızda ise granüloza hücrelerinden eNOS ekspresyonu kontrol grubu dahil hiçbir hastada sağlanamamıştır.

Oksidatif stres yaşla birlikte azalan fertilitiyi modüle eder. Birçok çalışmada infertilite ve fertilitenin değerlendirilmesinin patofizyolojisinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Pek çok çalışma, kadın infertilitesinin prevalansını, vücudun çeşitli kritik mikro ve makro çevresindeki oksidatif stres seviyelerindeki artış ile ilişkilendirmişlerdir.

Oxidative stress responsive 1 (OXSR1) gen ürünü Serin/Treonin protein kinaz ailesi üyesidir. Çevresel strese cevapta kinazların downstreamini regüle eder ve aktin hücre iskeletinin regülasyonunda rol alır. Ayrıca bu gen oksidatif stres nedeniyle gerçekleşen hücre ölümü ve proliferasyonunun kontrolünde önemli rol oynar [16]. Literatürde OXSR1 geni ile granüloza hücreleri ve infertilite arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma bu tarihe kadar yapılmamıştır.

Bu çalışmada yüksek doz uygulanan hastalarda OXSR1 gen ekspresyon düzeyi 0.63 ± 0.47 , düşük doz uygulanan hastalarda 0.54 ± 0.32 ve kontrol grubunda 0.81 ± 1.22 olup bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

SMAD aile üyesi-5 (SMAD5) geni ise granüloza hücrelerinin fonksiyonunu direkt olarak etkileyebilir. SMAD5 geni granüloza hücrelerinin gelişiminde de önemli rol oynayan bir regülatördür. SMAD5 geni Bone morphogenetic protein (BMP), sinyal yolağının anahtar genlerinden birtanesidir ve bu sinyal yolağı apoptozis mekanizmasında görev alır. SMAD5 geni dişi fertilitenin regülasyonunda da önemli role sahiptir. SMAD5'in ovaryan granüloza hücrelerinde gerçekleşen apoptozisteki rolünü araştırmak için yapılan bir çalışmada, SMAD5 siRNA'sı kullanılarak kültüre edilmiş granüloza hücrelerinde bu gen inhibe edilmiştir. SMAD5 inhibisyonu ile birlikte Fas, FasL, kaspaz 8 ve 3 gibi apoptozisin arttığı işaretleri olan genlerin ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar granüloza hücrelerinde apoptozisin regülasyonunda SMAD5'in önemli rol oynadığını göstermiştir [17].

SMAD5 anjiyojenik süreçle ilişkilendirilmiştir, çünkü SMAD5 eksikliği olan embriyoların, yolk kesesi ve damarların gelişiminde başarısız olunmuştur.

Ayrıca SMAD5, kan damarlarının hem endotel hücresinde hem de çevreleyen mezenkimal hücrelerde anjiyojenezin erken aşamalarında eksprese edilmekte, bu da SMAD5'in kan damarlarının oluşumu sırasında endotel ile mezenşimin arasındaki etkileşime aracılık edebileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada SMAD5 gen ekspresyonu için yüksek doz uygulanan hastalarda 0.7 ± 0.97 , düşük doz uygulanan hastalarda 0.32 ± 0.44 ve kontrol grubunda 0.33 ± 0.39 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Literatürde foliküler gelişim boyunca granüloza hücrelerinin kök hücre popülasyonundan köken aldığı birçok çalışmada rapor edilmektedir. Granüloza hücrelerinin kök hücre karakteristiği göstermelerinin ana kanıtı ise telomer bölgeleri ve telomeraz enzimidir. Telomer bölgeleri kromozomların uç kısmında yeralan kromozomun bütünlüğünü ve stabilizasyonunu sağlayan tekrar bölgeleridir. Hücreler bölündükçe her bölünmede telomer bölgeleri telomeraz enzimi tarafından sentezlense de hücre yaşlandıkça bu bölgeler kısalır. Telomeraz enzimi Telomeraz Revers Transkriptaz (TERT) ve Telomeraz RNA (TERC) olmak üzere iki alt üniteden oluşur. TERT geni telomeraz enziminin aktivitesinin primer regülatörüdür. Ayrıca TERT geni, Telomeraz enziminin aktivasyonunun mekanizmasında görev almasının yanında,

telomeraz enziminden bağımsız olarak apoptozisin regülasyonunda görev alır. Artan apoptozis ile azalan TERT geni ekspresyonu ile koreledir [18, 19].

Telomerlerin yaşlanma ve kanser ilişkisindeki rolü oldukça önemlidir. Kanser tedavisi ve teşhisinde geleneksel yöntemlerin yanısıra telomeraz aktivitesinin ölçümü için özgün bir belirteç olarak kullanılabilir. Telomeraz enzimleri ile ilgili yapılmış olan çalışmalar, kanser tedavisinde etkili bir şekilde kullanılacaklarını göstermiştir. Ayrıca telomerlerin yaşlanma üzerindeki rolleri de birçok araştırmamanın odak noktası olmuştur. Telomer kısalmasının, insan hücrelerinin ömrünün kısalmasında evrensel bir rol oynadığı yapılan çalışmalar ile doğrulanmıştır. Telomerlerin kanser tedavisinde ve yaşlanmayı geciktirici olarak kullanıma geçmiş olması umut verici bir gelişme olmuştur [70].

Bu çalışmada kontrol grubu dahil hiçbir hastada TERT geni eksprese edilememiştir.

6. SONUÇLAR

- 1- Düşük ve yüksek doz gonadotropin kullanan kötü over yanıtı hastaların klinik sonuçları benzerdir.
- 2- Yüksek doz gonadotropin kullanımı klinik sonuçlara katkı sağlamamakla birlikte maliyetin artmasına neden olmaktadır.
- 3- Yüksek doz gonadotropin kullanımı granüloza hücrelerinde antiapoptotik survivin gen ekspresyon seviyelerini artırmış ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- 4- Kötü over yanıtı hastalarda, normal over yanıtı hastalara göre survivin ekspresyonunun daha düşük seviyelerde olmasının azalmış over rezervine bağlı olduğu düşünülmektedir.
- 5- Yüksek doz gonadotropin kullanımı granüloza hücrelerinde HIF-1 α düzeyini arttırmıştır ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir.
- 6- Düşük doz tedavi uygulanan hastalarda istatistiksel anlamlı olmamak ile birlikte OXSR1 ve SMAD5 gen ekspresyonlarının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.
- 7- Hem kötü over yanıtı hem de normal over yanıtı hastalarda granüloza hücrelerinde eNOS ve TERT ekspresyonu elde edilememiştir.

KAYNAKLAR

1. Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence based protocol. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:21
2. Karakaya C, Güzeloğlu-Kayışlı Ö, Uyar A, et al., Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered micro RNA expression in cumulus cells. *Fertil Steril* 2015;103:1469-76.
3. Ubaldi FM, Rienzi L, Ferrero S, et al., Management of poor responders in IVF. *Reproductive BioMedicine Online* 2005;10:235-46.
4. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, et al., ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria†. *Hum Reprod* 2011;26:1616-24.
5. Ferraretti AP, Gianorali L. The Bologna criteria for the definition of poor ovarian responders: is there a need for revision? *Hum Reprod* 2014;1-4.
6. Jiang Z-Z, Hu M-W, Wang Z-B, et al., Survivin is essential for fertile egg production and female fertility in mice. Citation: *Cell Death and Disease* 2014;5.
7. Zhang X, Jafari N, Barnes RB, et al., Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril* 2005;83:1169-79.
8. Glamoclija V, Vilovic K, Saraga-Mamic B, et al., Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertil Steril* 2005;83:426-31.
9. Varras M, Polonifi K, Mantzourani M, et al., Expression of antiapoptosis gene survivin in luteinized ovarian granulosa cells of women undergoing IVF or ICSI and embryo transfer: clinical correlations. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:74.
10. Zhang B, Yin C-P, Zhao Q, Yue S-W. Upregulation of HIF-1 α by Hypoxia Protect Neuroblastoma Cells from Apoptosis by Promoting Survivin Expression. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15: 8251-7.
11. Vaira V, Lee CW, Goel HL, et al., Regulation of survivin expression by IGF 1/mTOR signaling. *Nature Publishing Group* 2007;26:2678-84.

12. Noton EA, Colnaghi R, Tate S, et al.,Molecular Analysis of Survivin Isoforms. J. Biol. Chem. 2005;81:1286-95.
13. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*2014;1009-14.
14. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al., Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *The American Society of Hematology* 2005;105:659-69.
15. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:28.
16. Stiegler P, Sereinigg M, Puntschart A, et al.,Oxidative stress and apoptosis in a pig model of brain death (BD) and living donation (LD). *Journal of Translational Medicine* 2013;11:244
17. Nie M, Yu S, Peng S, et al., miR-23a and miR-27a Promote Human Granulosa Cell Apoptosis by Targeting SMAD5. *Biology of Reproduction* 2015;98:1-10
18. Chronowska E. Regulation of telomerase activity in ovarian granulosa cells. *Indian Journal of Experimental Biology* 2012;50:595-601.
19. Russo V, Berardinelli P, Martelli A, et al., Expression of telomerase reverse transcriptase subunit (TERT) and telomere sizing in pig ovarian follicles. *J Histochemistry & Cytochemistry* 2006;54:443-55.
20. Yumru AE, Öndeş B. İnfertil Çifte Yaklaşımve İn Vitro Fertilizasyon’a Doğru Hasta Seçimi. *JAREM* 2011;1:57-60.
21. American Society of Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:302-7.
22. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW and Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and İVF outcome.*Hum Reprod* 2006;12:685-718.
23. Hendriks DJ, Ph.D, Mol B-WJ et al., The clomiphene citrate challenge tests for the prediction of poor ovarian response and nonpregnancy in patients undergoing in vitro fertilization: a systematic review. *Fertil Steril* 2006;86:807–18.

24. Hendriks DJ, M.D., Mol B-W.J et al. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 2005;83:291–301.
25. Trevor GC, Noonan E, Eckardsteins SV et al., World Health Organization reference value for human semen characteristics. *Hum Reprod* 2010;16: 231–245.
26. Polat M, Bozdag G, Yarali H. Best Protocol for Controlled Ovarian Hyperstimulation in Assisted Reproductive Technologies: Factor Opinion? *Semin Reprod Med* 2014;32:262–
27. Kailasam C, Keay SD, Wilson P, Ford WCL and Jenkins JM. Defining poor ovarian response during IVF cycles, in women aged <40 years and its relationship with treatment outcome. *Hum Reprod* 2004;19:1544-7.
28. Kamble L, Guidi A, Shah A and Homburg R. Poor responders to controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilisation (IVF). *Human Fertility* 2011;14:230–45.
29. Pandian Z, McTavish AR, Aucott L, Hamilton MPR, Bhattacharya S. Interventions for ‘poor responders’ to controlled ovarian hyperstimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF) (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010;1:CD004379.
30. Boekmans FJ, Knauff EAH., Velde ER, Macklon NS. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2007;18:58-6
31. Simoni S, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod* 2002;8:413-21.
32. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod* 2006;12:685–718.
33. Domingues TS, Rocha AM, Serafini PC. Tests for ovarian reserve: reliability and utility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2010;22:271–6.

34. Gibreel A, Maheshwari A, Bhattacharya S & Johnson NP. Ultrasound tests of ovarian reserve; A systematic review of accuracy in predicting fertility outcomes. *Human Fertility* 2009;12:95-106.
35. Hendriks DJ, PH.D., Kwee J et al., Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril* 2007;87:764-75.
36. Deb S, Mbbs, Mrcog et al., The interovarian variation in three-dimensional ultrasound markers of ovarian reserve in women undergoing baseline investigation for subfertility. *Fertil Steril* 2011;95:667-72.
37. Placido GDe, Alviggi C, Mollo A, Strina I, Varricchio MT and Molis M. Recombinant follicle stimulating hormone is effective in poor responders to highly purified follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 2000;15:17-20.
38. Eskandar M, Jaroudi K, Jambi A, Archibong EI, Coskun S, Sobande AA. Is recombinant follicle-stimulating hormone more effective in IVF poor responders than human menopausal gonadotrophins? *MedSciMonit* 2004;10:16-9.
39. Al-Inany H, Aboulghar MA, Mansour RT, & Serour GI. Ovulation induction in the new millennium: Recombinant follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin. *Gynecology Endocrinology* 2009;20:161-9.
40. Kucuk T, Sozen E. Luteal start of exogenous FSH in poor responder women. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:635-8.
41. Kalra SK, Ratcliffe S, Gracia CR, Martino L, Coutifaris C, Barnhart KT. Randomized controlled pilot trial of luteal phase recombinant FSH stimulation in poor responders. *RBM Online* 2008;17:745-50.
42. Garcia-Velasco JA, Isaza V, Requena A et al., High doses of gonadotropins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomised, controlled trial. *Hum Reprod* 2000;15:2292-6.
43. Weissman A, MD, Farhi J et al., Prospective evaluation of two stimulation protocols for low responders who were undergoing in vitro fertilization—embryo transfer *Fertil Steril* 2003;79:886-92.

44. Malsumi S, MD, La Marca et al., Comparison of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist and GnRH agonist flare-up regimen in poor responders undergoing ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2005;84:402-6.
45. Morgia F, BS, Sbracia M Et al., A controlled trial of natural cycle versus microdose gonadotropin-releasing hormone analog flare cycles in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;81:1542-7.
46. Garcia-Velasco JA, MD, Moreno L et al., The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves in vitro fertilization outcome in low responder patients: a pilot study. *Fertil Steril* 2005;84:82-7.
47. Yarali H, MD, Esinler İ, et al., Antagonist/letrozole protocol in poor ovarian responders for intracytoplasmic sperm injection: a comparative study with the microdose flare-up protocol. *Fertil Steril* 2009;92:231-5.
48. Tulandi T, MD, Martin J et al., Congenital malformations among 911 new borns conceived after infertility treatment with letrozole or clomiphene citrate. *Fertil Steril* 2006; 85:1761-5.
49. Revelli A, Chiadò A, Dalmaso P et al., “Mild” vs. “long” protocol for controlled ovarian hyperstimulation in patients with expected poor ovarian responsiveness undergoing in vitro fertilization (IVF): a large prospective randomized trial. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:809–15.
50. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G and Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod* 2003;9:61-76.
51. Glamoclija V, MD, MSc et al., Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertil Steril* 2005; 83:426-31.
52. Tomoko K, Saito H, Takahashi T, Ohta N, Saito T and Hiroi M. Effects of Controlled Ovarian Hyperstimulation on Oocyte Quality in Terms of the Incidence of Apoptotic Granulosa Cells. *J Assist Reprod and Genet* 2000;17:580-5.

53. Li F, Ling X. Survivin Study: An Update of “What is the Next Wave?” *J Cell Physiol* 2006; 208:476–86.
54. Fujino K, Yamashita Y, MD et al., Survivin gene expression in granulosa cells from infertile patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2008;89:60-5
55. Gupta S, Ghulmiyyah J, Sharma R, Halabi J and Agarwal A. Power of Proteomics in Linking Oxidative Stress and Female Infertility. *BMR Article* 2014;1-26.
56. Merviel P, Cabry-Goubt R, Lourdele E et al., Comparative prospective study of 2 ovarian stimulation protocol in poor responders: Effect on implantation rate and ongoing pregnancy. *BioMed Central* 2015;1-7.
57. Schimberni M, Ceardo F, Schimberni M, Giallonardo A, Pratti VD, Sbracia M, Short gonadotrophin-releasing hormone agonist versus flexible antagonist versus clomiphene citrate regimes in poor responders undergoing in vitro fertilization a randomized controlled trial. *European review for medical and pharmacological sciences* 2016;20:4354-61.
58. The European Middle East Orgalutran® study group. Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist Ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Human Reproduction* 2001;16:644-51.
59. Kuang Y, Chen Q, Hong Q et al., Double stimulation during the follicular and luteal phases of poor responders in IVF /ICSI programmes (Shanghai protocol). *Reproductive biomedicine online* 2014;29:684-91.
60. Propas Y, Petousis S, Dagklis T et al., GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor IVF responders a randomized clinical trial. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2012;166:43-6.
61. Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Obstal DV et al., Milder ovarian stimulation for in vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo a randomized controlled trial. *Human reproduction* 2007;4:980-8.

62. Devroey P, Bourgain C, Macklone NS, Fauser BCJM. Reproductive biology and IVF ovarian stimulation and endometrial receptivity. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2004;2:84-90.
63. Yoo JH, Cha SH, Park CW, et al., Comparison of mild ovarian stimulation with conventional ovarian stimulation in poor responders. *Clin Exp Reprod Med* 2011;38:159-63.
64. Quitana R, Kopcou L, Marconi G, Sueldo C, Speranza G, Baranao RI. Relationship of ovarian stimulation response with vascular endothelial growth factor and degree of granulosa cell apoptosis. *Human Reproduction* 2001;6:19:1814-8.
65. Sui L, Dong YY, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K and Tukido M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *International Journal of Oncology* 2002;21:315-20.
66. Semenza GL. Hypoxia-Inducible factor 1 and cardiovascular disease 2014;76:39-56.
67. Agarwal A, Gupta S and Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology* 2005;3:28.
68. Khorram O, Lessey BA. Alterations in expression of endometrial endothelial nitric oxide synthase and $\alpha_v\beta_3$ integrin in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:860-4.
69. Wang JH, Zhou F, Dong MY, Wu R, Qian YL. Prolonged gonadotropin releasing hormone agonist therapy reduced expression of nitric oxide synthase in the endometrium of women with endometriosis and infertility. *Fertil Steril* 2006;85:1037-44.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Günel ELİYEVA'ya ait “Düşük Doz ve Yüksek Doz Gonadotropinler ile Ovulasyon İndüksiyonu Yapılan Kötü Over Yanıtlı Hastalarda Luteinize Granüloza Hücrelerinde Survivin ve HIF-1 α Gen Ekspresyonunun Araştırılması” adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından **Kadın Hastalıkları ve Doğum** Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: .../.../2017

JÜRİ

İmza

Başkan : Prof. Dr. Ercan Mustafa AYGEN

.....

Üye : Prof. Dr. İbrahim Serdar SERİN

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Savaş KARAKUŞ

.....