

GÖKTAN KUŞPINAR

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2016



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE
EMBRİYOLOJİ ANABİLİM
DALI



FARKLI NÜKLEAR MATÜRASYON AŞAMALARINDA
OOSİT, KUMULUS HÜCRELERİ VE FOLLİKÜL
SIVISINDA EKSPRESE EDİLEN MATÜRASYON
FAKTÖRLERİNİN ROLÜ

GÖKTAN KUŞPINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA- 2016



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**FARKLI NÜKLEAR MATÜRASYON AŞAMALARINDA
OOSİT, KUMULUS HÜCRELERİ VE FOLLİKÜL SIVISINDA
EKSPRESE EDİLEN MATÜRASYON FAKTÖRLERİNİN
ROLÜ**

GÖKTAN KUŞPINAR

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç. Dr. Berrin AVCI

BURSA-2016

**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI




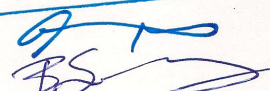

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum;

“Farklı Nükleer Matürasyon Aşamalarında Oosit, Kumulus Hücreleri Ve Follikül Sıvısında Eksprese Edilen Matürasyon Faktörlerinin Rolü” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığımı ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Göktan KUŞPINAR

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Gökten KUŞPINAR tarafından hazırlanan "Farklı Nükleer Matürasyon Aşamalarında Oosit, Kumulus Hücreleri Ve Follikül Sıvısında Ekspres Edilen Matürasyon Faktörlerinin Rolü" konulu Yüksek Lisans tezi 05/08/2016 günü, 10:00-11:30 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	İmza
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Berrin AVCI	
Üye	Prof. Dr. Semiha ERSOY	
Üye	Prof. Dr. Gürkan UNCU	
Üye	Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU	
Üye	Yar. Doç. Dr. F. Bahar SUNAY	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ülgen GÜNAY
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

27/07/2016

Adı Soyadı:Göktan KUŞPINAR

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

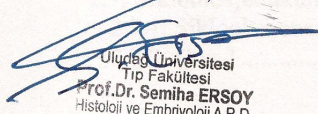
Tez Konusu: Çalışma matürasyonunu tamamlayamamış oositlerde ve kumulus hücrelerinde Kisspeptin ve reseptörü (Kiss1R) ile Cox-2 ekspresyon düzeyinin ve follüküler sıvı ile serum düzeyindeki konsantrasyonlarının oosit matürasyonundaki rollerini değerlendirmektedir.

ÖZELLİKLER	<u>UYGUN</u>		<u>ACIKLAMA</u>
	<u>UYGUNDUR</u>	<u>DEĞİLDİR</u>	
Tezin Boyutları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

ANABİLİM DALI ONAYI

ENSTİTÜ ONAYI

Prof.Dr. Semiha ERSOY


Uludağ Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Prof.Dr. Semiha ERSOY
Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.
Başkanı

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN	
KABUL ONAY	
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	
İÇİNDEKİLER	I
TÜRKÇE ÖZET	III
ABSTRACT	IV
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Ovaryan Folliküllerin Embriyolojik Gelişimi	4
2.2. Ovaryan Folliküllerin Histolojisi	4
2.2.1. Primordiyal Folliküller.....	5
2.2.2. Büyümekte Olan Folliküller.....	6
2.2.2.1. Primer folliküller.....	6
2.2.2.2 Sekonder folliküller (Antral folliküller).....	7
2.2.2.3. Matür (Graaf) folliküller.....	8
2.2.3. Atretik Folliküller:.....	9
2.3. Folliküler Gelişim Başamaklarında Etkin Moleküler Mekanizmalar	9
2.3.1 Primordiyal Follikül Aktivasyonu.....	9
2.3.2. Primer Follikülden Sekonder Follikül Aşamasına Geçiş.....	12
2.3.3. Preantral Aşamadan Erken Antral Follikül Aşamasına Geçiş.....	13
2.3.4. Antral Gelişim ve Gonadotrofinleri Rolü.....	14
2.4. Oosit Matürasyonu	16
2.4.1. Mayotik Matürasyon.....	16
2.4.2. Oositin Sitoplazmik Matürasyonu.....	17
2.4.3. Oosit Membran Matürasyonu.....	19
2.5. Oosit Matürasyon Yetmezliği	20
2.6. Kisspeptin	21
2.6.1. Kisspeptin ve Reseptörünün Moleküler Yapısı.....	21
2.6.2. İnsanda Kisspeptin Nöron Lokalizasyonu.....	22
2.6.3. Kisspeptin Nöron Topluluklarının Farklı Fizyolojik Fonksiyonları.....	23
2.6.4. Kisspeptin ve GnRH Sekresyon Düzenlenimi.....	24
2.6.5. Kisspeptin ve Gonadotrofinlerin Ovaryan Döngüde Sekresyonları.....	24
2.6.6. Kisspeptin ve Gonadotrofinlerin Ovaryum Ekspresyonları.....	24
2.6.7. Kisspeptin ve Puberte.....	25
2.6.8. Kisspeptin ve Final Oosit Matürasyonu.....	25
2.7. Siklooksijenazlar (COX)	26
2.7.1. Siklooksijenaz: Yapı ve Fonksiyonları.....	27
2.7.2. Cox-1.....	27

2.7.3. Cox-2.....	28
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Hasta Popülasyonu ve Gruplar	29
3.2. Ovaryan Stimülasyon Protokolü.....	30
3.3. Serum, Folliküler Sıvı ve Oosit Eldesi.....	31
3.4. Oosit Nükleer Matürasyon Değerlendirmesi ve İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu.....	32
3.5. RNA İzolasyonu	33
3.6. RNA Saflık Tayini	34
3.7. cDNA Eldesi	34
3.8. RT - PZR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	34
3.9. ELISA	35
3.10. İstatistiksel Yöntem.....	36
4.BULGULAR	37
4.1. Hasta Karakteristik Özellikleri Dağılımı	37
4.2. Folliküler Ortalama Çap	39
4.3. Serum ve Follikül Sıvısı Sonuçları.....	41
4.4. Kumulus Hücre Grupları Sonuçları.....	49
4.5. Oosit Grupları Sonuçları	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
6.KAYNAKLAR.....	67
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	80
8.EKLER.....	82
8.1. Şekil Listesi	82
8.2. Grafik Listesi	82
8.3. Tablo Listesi.....	82
9.TEŞEKKÜR.....	84
10.ÖZGEÇMİŞ.....	85

TÜRKÇE ÖZET

İn vitro fertilizasyon uygulamalarında kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrası yaklaşık % 8.6-15.2 oranında en az bir adet mayoz bölünmesini tamamlamamış oosit gelişimi gözlemlenir. Mayotik gelişim kilit düzenleyici proteinlerin kontrolü altındadır ve herhangi bir değişim matürasyon yetmezliği ile sonuçlanır.

Kisspeptin (Kiss1) KISS1 geninin ürünü olan peptittir. Merkezi sinir sistemi düzeyinde ovaryan fonksiyonları düzenlemesindeki rolleri tanınmış olsa da, ovulasyonun kontrolündeki lokal rolleri tam olarak tanımlanamamıştır. İlk veriler hayvan çalışmalarında final oosit matürasyonundaki rolünü göstermiştir.

Folikül rüptüründe ve kumulus ekspansiyonunda siklooksijenaz-2 (Cox-2) enzimatik olarak önemli rol oynamaktadır. Ovulasyonu ve follikül atılımını engellediği bilinen Cox-2 inhibitörünün, sıçan ovaryumunda seçici şekilde KISS1 ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu veriler Kisspeptin ekspresyonunun Cox-2 ekspresyonu ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada matürasyonunu tamamlayamamış oositlerde ve kumulus hücrelerinde Kisspeptin ve reseptörü (Kiss1R) ile Cox-2 ekspresyon düzeyinin ve folliküler sıvı ile serum düzeyindeki konsantrasyonlarının oosit matürasyonundaki rollerini değerlendirmek hedeflendi.

Kontrollü ovaryan stimülasyon döngülerinden elde edilen immatür ve matür oositler, follikül sıvıları ve kumulus hücreleri, hasta serum örnekleri çalışma kapsamında incelendi. Serum ve follikül sıvılarında ELİZA yöntemiyle, oosit ve kumulus hücrelerinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile Kiss1 ve Kiss1R ve Cox-2 seviyelerine bakıldı. Elde edilen sonuçların birbirleriyle ve hastaların klinik verileriyle korelasyonları değerlendirildi.

Serum ve folliküler sıvı düzeyinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının oositin matürasyon seviyesi ile korele olmadığı görüldü. İmmatür oositlerde ve kumulus hücrelerinde Kiss1 ve reseptöründe azalma görülürken, Cox-2 ekspresyonunda artış gözlemlendi.

Kontrollü ovaryan stimülasyon döngülerinde Kiss1 ve reseptörünün oosit matürasyon sürecinde mikroçevre düzeyinde etkin olduğu, Cox-2'nin negatif etkisinin ovulasyon öncesi final matürasyon basamağında kontrol edici rolünün olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Kisspeptin, Kisspeptin Reseptörü, Siklooksijenaz-2, Final Oosit Matürasyonu.

ABSTRACT

In *in vitro* fertilization treatment following controlled ovarian hyperstimulation protocols, approximately 8.6% to 15.2% of all infertility patients at least produce one meiotically incompetent oocyte. Meiotic development is under the control of critical regulatory proteins and any alterations in this process results in meiotic maturation defects.

Kisspeptin (Kiss1) is a peptide expressed by the KISS1 gene. Its role in the regulation of ovarian function at the level of central nervous system is known, however its local roles in the control of ovulation have not exactly been identified. Initial data from animal studies demonstrated the role of Kisspeptin in the final maturation of the oocyte.

Cyclooxygenase-2 (Cox-2) has an important enzymatic role in cumulus expansion and follicle rupture. Cox-2 inhibitors, known as an inhibitor of ovulation and follicle rupture, has been shown to selectively suppress KISS1 expression in rat ovaries. All these data give rise to the thought that kisspeptin expression may be associated with Cox-2 expression.

In this study, it is aimed to reveal the role of Kisspeptin, Kisspeptin receptor (Kiss1R) and Cox-2, on the oocyte maturation by evaluating the expression levels of Kiss1, Kiss1R and Cox-2 in immature oocytes and cumulus cells, as well as their concentration levels in serum and follicle fluids.

In this study, immature and mature oocytes, cumulus cells and follicular fluids obtained from controlled ovarian stimulation cycles and serum from patients were examined. Kiss1, Kiss1R and Cox-2 levels were evaluated in oocytes and cumulus cells by real-time polymerase chain reaction, and in serum and follicle fluid by ELISA. The results were evaluated as the correlation to each other and to the clinical data of the patients.

The levels of Kiss1, KissR1 and Cox-2 concentration were shown to not correlate with oocytes maturation level in serum and follicular fluid. While a decrease in the expression of Kiss1 and its receptor was seen in immature oocytes and cumulus cells, an increase in Cox-2 expression was observed.

The results of this study suggested that, in controlled ovarian stimulation cycles, Kiss1 and its receptors are effective in oocytes maturation process at the level of microenvironment, and that the negative effects of Cox-2 may control the final maturation step before ovulation.

Key Words: Kisspeptin, Kisspeptin Receptor, Cyclooxygenase-2, Final Oocyte Maturation

1.GİRİŞ

İn vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrası yaklaşık % 8.6-15.2 oranında en az bir adet mayoz bölünmesini tamamlamamış oosit gelişimi gözlemlenir (Bar-Ami S ve ark., 1994; Avrech ve ark., 1997). Oositlerin %25'inden fazlası immatür olduğunda fertilizasyon ve klinik gebelik oranı azalmaktadır (Avrech ve ark., 1997). Hiç matür oositin üretilmediği mutlak oosit matürasyon yetmezliği nadiren gözlemlense de, bu olgularda primer infertilite, tekrarlayan immatür oosit üretimi, in vitro matürasyon (IVM) ile oosit matürasyonunun sağlanamaması ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulamasına (ICSI) rağmen fertilizasyon başarısızlığı gözlemlenmektedir (Jamnongjit 2005). Kontrollü ovaryan stimülasyon protokolünü değiştirmek de IVM veya ICSI sonuçlarını iyileştirmemektedir.

Oositin gelişiminde mayoz bölünmenin duraksadığı germinal vezikül (GV) ve metafaz-I (mayoz-1) aşamalarında mayoz bölünmenin yeniden devam etmesi ile oosit nüklear matürasyonu tamamlanır. (Jamnongjit 2005; Dekel 2005) Oosit gelişim fazında mayoz bölünmeyi tamamlayabilmek için gerekli mRNA ve proteinleri üretir ve biriktirir. Mayotik gelişim kilit düzenleyici proteinlerin kontrolü altındadır. Kilit noktalardaki herhangi bir değişim matürasyon yetmezliği ile sonuçlanır. (Nakanishi ve ark., 2006; Liang ve ark., 2007) İnsanlarda özellikle tekrarlayan oosit matürasyon hasarlarının sebepleri henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, olası diğer düzenleyici proteinler ve bu süreçlerdeki rollerini tanımlamak için çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kisspeptin, malign melanoma hücrelerinde metastaz-supressör gen olarak keşfedilen, KISS1 geninin ürünü olan peptitlerdir (Lee ve ark., 1996). Hipogonadotropik hipogonadizm'li insan ve farelerde kisspeptin reseptörü (Kiss1R veya GPR54) gen mutasyonlarının varlığının saptanması ve bu olgularda hasarlı pubertal gelişimin de gözlemlenmesi ile birlikte kisspeptin ve reseptörünün üreme sistemindeki rolü gösterilmiştir (de Roux ve ark., 2003; Seminara ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarla Kiss1; hiyerarşik bir şekilde üreme aksisinin ana düzenleyicisi (Roa ve ark., 2006) ve insanı da kapsayan bir çok memeli türünde GnRH-

gonadotropin salgılatıcı en potansiyel molekül olarak kabul edilmiştir. Kiss1'in öncelikli olarak merkezi sinir sistemi düzeyinde ovaryan fonksiyonları düzenlemesi iyi tanınmış olmasına rağmen, ovulasyonun kontrolündeki lokal rolleri henüz tam olarak her yönüyle tanımlanamamıştır. İlk veriler kisspeptin uygulamasının hayvan çalışmalarında final oosit matürasyonunda ki rolünü göstermiştir. Buna ek olarak in vitro fertilizasyon tedavisi gören hastalara, kisspeptin uygulaması ile efektif olarak Luteinizan hormon (LH) yükselişini başlatarak final oosit matürasyonunu indüklediği ve bu uygulama elde edilen oositlerin fertilizasyonu ve transferi sonucunda başarılı canlı doğum rapor edilmiştir (Abbara ve ark. 2013).

İnflamatuvar reaksiyonlarda merkezi rol oynayan prostaglandinlerin ovulasyonda rol oynadıklarının anlaşılması, siklooksijenazların keşfinden sonraki dönüm noktalarından biridir. İki farklı siklooksijenaz tanımlanmıştır; Siklooksijenaz-I (Cox-1) ve siklooksijenaz-II (Cox-2) farklı genler tarafından eksprese edilse de dizi homolojisi ve katalitik aktivite gösterir. Büyükbaş hayvanlardan sığır pre-ovulatuvar folliküllerinin granüloza ve kumulus hücrelerinde Cox-2 ekspresyonu gösterilmiştir (Nuttinck ve ark., 2002). Cox-1 ekspresyonu izole edilen kumulus-oosit kompleksinin in vitro matürasyon süreçlerinde gözlemlenmemiştir (Nuttinck ve ark., 2002). Ovaryan folliküllerde ovulasyon sürecinde prostaglandin sentezinde sınırlayıcı basamağın Cox-2 enzim aktivitesi olduğu raporlanmıştır. Ovulasyonun mürin modelinde, follikül rüptüründe ve kumulus ekspansiyonunda Cox-2 enzimatik olarak önemli rol oynamaktadır (Hizaki ve ark., 1999; Matsumoto ve ark., 2001; Ochsner ve ark., 2003; Sirois ve ark., 2004). Maymunlarda ovulasyon sürecinde Cox-2 inhibitörü uygulamasının matür oositlerin fertilizasyon oranının düşmesine sebep olması, Cox-2 aktivitesinin oosit nüklear matürasyonu sonrasındaki fertilizasyon kapasitesi için de gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

İn vitro matürasyon sürecinde domuz oosit ve kumulus hücrelerinde Kiss1'in IVM periyodu süresince sadece oositlerde, Kiss1R'in ise hem oosit hem de kumulus hücrelerinde eksprese olduğu gösterilirken, bu ekspresyon düzenlenimi Kiss1'in oosit ve kumulus hücreleri arasındaki otokrin-parakrin etkileşimlerle sürekli ve direk olarak reseptörü aracılığı ile etkinliğini tüm matürasyon sürecinde gösterdiği

şeklinde yorumlanmıştır. Ovulasyonu ve follikül atılımını engellediği bilinen Cox-2 inhibitörünün, sıçan ovaryumunda seçici şekilde KISS1 ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Gaytan ve ark., 2009). Tüm bu veriler, ovulasyon sürecinde de Kisspeptin'in lokal rolünü işaret ederken, henüz tam olarak tanımlanmamış olsa da oosit matürasyonunda etkinliği olduğu tahmin edilen Kisspeptin ekspresyonunun da, Cox-2 ekspresyonu ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu kapsamda, çalışmamızda matürasyonunu tamamlayamamış oositlerde, bu oositlerin metabolik ve hücrel etkileşim içerisinde bulunduğu kumulus hücrelerinde Kisspeptin ve reseptörü ile Cox-2 ekspresyon düzeyinin ve folliküler sıvı ile serum düzeyinde konsantrasyonlarının değerlendirilerek oosit matürasyonunda ki rollerinin açığa çıkarılması hedeflenmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Ovaryan Folliküllerin Embriyolojik Gelişimi

Dişi germ hücresi oosit, ovaryumda folliküller içinde destekleyici somatik hücreler ile çevrili olarak follikül sıvısı içinde bulunur. Oositin diferansiye olmamış ilkel formu olan primordiyal germ hücrelerinin (PGH) embriyolojik kökeni vitellus kesesinin endoderminin altında bulunan ekstraembriyonik mezenşim hücreleridir. İlk olarak fertilizasyondan sonra 3. haftada vitellus kesesinin allantoise komşu duvarında endoderm hücreleri arasında görülürler. Embriyon diskinin kıvrılması sırasında vitellus kesesinin dorsal kısmı embriyonun içine alınır. Gelişimin 5. haftasında, PGH son barsağın mezenteri yoluyla ameboid hareketlerle ovaryumları oluşturacak olan gonadal kabartılara göç eder. Gonadal kabartıda intermediyet mezoderm kökenli somatik hücrelerle iç içe karışmış olarak bulunurlar. PGH zamanla oogonyumlara, gelişimin 12. haftasında primer oositlere dönüşürler. Primer oosit gelişimi ile birlikte mayoz bölünme başlar. En basit follikül yapısı olan primordiyal follikül, I. mayoz bölünmenin profaz safhasında duraklamış primer oosit ve çevresini saran yassı tek sıra granüloza hücrelerinden oluşur. Gestasyonun 18. haftasında pregranüloza hücrelerinin aktivasyonu ile birlikte oosit gelişimi başlar. Fetal hayatta yaklaşık 7 milyon oogonyum olmasına rağmen, yeni doğanda 1 milyon primordiyal follikül mevcuttur. Folliküllerin büyük bir çoğunluğu atreziye uğrar ve ovaryumlarda puberte başlangıcında yaklaşık 300-500 bin follikül kalır. Her menstruel döngüde bir dalga şeklinde primordiyal folliküller aktive olarak büyümeye ve gelişimlerine devam ederler. Döngünün ortasında folliküllerden bir tanesi dominant follikül olarak seçilir ve ovulasyona uğrar. Birçok otkrin, parakrin ve endokrin faktör bu primordiyal follikül gelişiminden dominant follikül seçilimi ve bu folliküldeki sekonder oositin ovulasyonuna kadar rol alır (Coticchio ve ark., 2013).

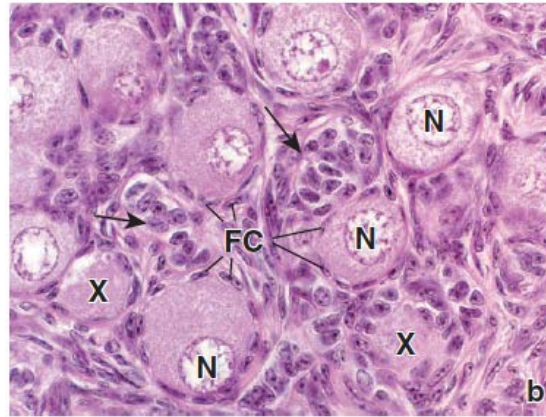
2.2. Ovaryan Folliküllerin Histolojisi

Ovaryum korteksi gelişiminin değişik evrelerindeki follikülleri içerir. Folliküller ovaryan rezervi oluşturan gelişimin en ilkel basamağındaki primordiyal folliküller ve dişi üreme kabiliyetinin yerine gelmesini sağlayan gelişmekte olan folliküller olmak üzere sınıflandırılırlar. Gelişim basamağına bağımlı olarak, her bir

follikül içinde bulunan farklı matürasyon aşamalarındaki oosit için bir mikroçevre oluşturur. Bu mikroçevrede oosit matürasyon süreçlerinde önemli rol oynayan ve oosit çevresinde yerleşim gösteren hücre grupları mevcuttur. İleri gelişim basamaklarında ise oositi çevreleyen hücrelerin yanı sıra hücreler arasındaki boşlukları dolduran follikül sıvısı birikimi gerçekleşir.

2.2.1. Primordiyal Folliküller

Folliküler gelişimin ilk evresi olan bu folliküller inaktiftir. Puberteden önce bulunan tek follikül tipidir ve ovaryan rezervi oluştururlar. Gelişimleri gonadotrofinlerden bağımsızdır (Ross 2011). Ovaryan korteks stromasında tunika albuginea altında yerleşim gösterirler. Her biri yaklaşık 30 µm çapında primer oosit ve onu çevreleyen tek katlı yassı follikül hücrelerinden (pregranüloza) oluşmuştur (Şekil 1). Büyük nükleus ve belirgin nükleolusa sahip primer oosit 1. mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten alt evresinde duraklamıştır. Sitoplazmik organelleri nükleusa yakın kümelenmeler oluşturmuştur. Golgi kompleksi, endoplazmik retikulum, mitokondrion ve lizozom gibi organellerin oluşturduğu bu kümeler “Balbani Cismi” olarak adlandırılır. Buna ek olarak, nüklear zarf kesitleri dizisi olarak tanımlanan “Anüler Lameller” ile küçük, küre şekilli mitokondrionlar ve çok sayıda küçük vezikül sitoplazmada dağınık halde bulunur. Oositi çevreleyen yassı follikül hücreleri birbirlerine desmozomlarla bağlıdır. Stromal hücreler ile yassı follikül hücrelerini birbirinden ayıran bazal lamina mevcuttur (Ross 2011; Kierszenbaum ve Tres 2012).



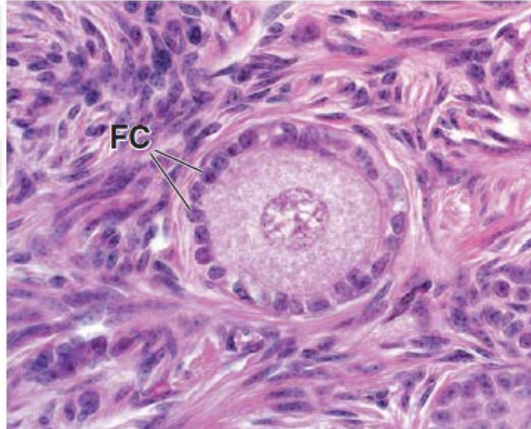
Şekil 1: Primordial Follikül (Ross 2011)

2.2.2. Büyümekte Olan Folliküller

2.2.2.1. Primer folliküller

Puberte başlangıcı ile birlikte, folliküllerin büyümesi endokrin değişiklikler ile uyarılır. Oosit ve folliküler hücreler yapısal olarak değişim göstermeye başlar. Oosit çapı yaklaşık 40-45 μm ölçülerine ulaşır. Oositi çevreleyen yassı folliküler hücreler kübik hücrelere dönüşerek granüloza hücreleri olarak isimlendirilirler (Ross 2011; Kierszenbaum ve Tres 2012). Endokrin değişikliklerin yarattığı uyarılar sonucunda, folliküller granüloza hücrelerinin bölünme oranına bağlı olarak iki farklı aşamada değerlendirilirler.

Ünilaminar primer folliküller: Bir oositi çevreleyen tek tabakalı kübik granüloza hücrelerinden oluşur. Bu evrede, oosit ve follikül hücreleri arasında glikojenden zengin zona pellucida (ZP) oluşmaya başlar (Şekil 2).



Şekil 2: Ünilaminar primer folliküller (Ross 2011)

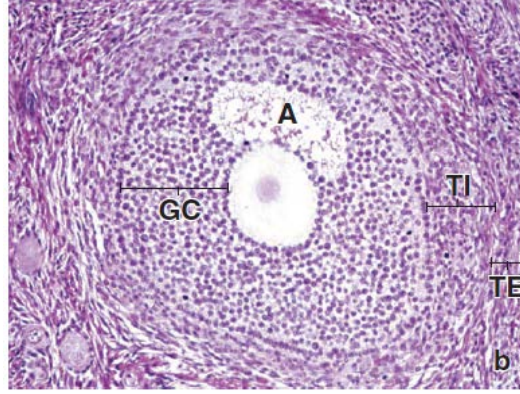
Multilaminar primer folliküller (Pre-antral folliküller): Bir oositi çevreleyen 3-5 kat hücre tabakalı kübik granüloza hücrelerinden oluşmuştur. Bu evrede zona pellucida kalınlaşır ve follikülü çevreleyen stromal hücreleri farklılaşarak, follikülü kılıf gibi sarmalayan teka follikülü oluşmaya başlar (Şekil 3).



Şekil 3: Multilaminar primer follüküller (Ross 2011)

2.2.2.2 Sekonder follüküller (Antral follüküller)

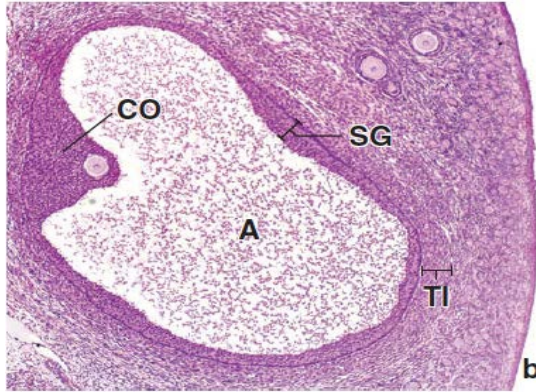
Multilaminar primer follükül gelişmeye devam ederken follükül çapı yaklaşık olarak 200 μm ve üzerine ulaşır. Hacimsel olarak artış gösteren follükülden granüloza tabakasını oluşturan follükül hücre tabakası 6-12 hücre katına ulaştığında hücreler arasında oluşan boşluklar (Call-Exner cisimleri) sıvı (liquor folliculi) ile dolmaya başlar. Hyalüronandan zengin, follükül sıvısı olarak adlandırılan bu sıvı granüloza hücreleri arasında birikmeye devam eder. Kaviteler birleşerek tek, yarımay şeklinde, antrum adı verilen bir boşluğa dönüşür. Bu follüküle sekonder ya da antral follükül adı verilir. Asentrik çekirdekli oositin çapı yaklaşık 125 - 130 μm 'ye ulaşır ve daha fazla büyümmez. Follükülü çevreleyen stromal hücrelerin oluşturduğu teka follüküli tabakası iç ve dış olmak üzere 2 tabaka olarak görülür. İç kısımda yer alan teka interna bol miktarda agranüler endoplazmik retikulum içeren ve steroid sentezleyen kübik hücrelerden oluşur. Bol miktarda kan damarı içerir. Dış kısımdaki tabaka başlıca vasküler bağ dokusundan oluşmuş teka eksternadır (Şekil 4) (Ross 2011; Kierszenbaum ve Tres 2012; Carneiro 2002)



Şekil 4: Sekonder follüküller (antral) (Ross 2011)

2.2.2.3. Matür (Graaf) follüküller

Büyük boyutta (yaklaşık 10 mm ve üzeri çapında) oluşuyla sekonder follükülden ayırt edilir. Ovulasyondan hemen önceki bu evrede antrum giderek büyür. Oosit follükülün bir tarafına çekilir ve etrafını birkaç sıra granüloza hücresi (korona radiata) çevreler. Granüloza hücrelerinin oositle ilişkili olduğu yerde, granüloza hücreleri antruma doğru uzanan kumulus ooforus adı verilen tepeciği oluştururlar (Şekil 5).



Şekil 5: Matür (graaf) follüküller (Ross 2011)

2.2.3. Atretik Folliküller:

Normal şartlarda, doğum sonrasında yenidoğanda yaklaşık olarak 350.000-500.000 primordiyal follikül olmasına karşın (Hansen ve ark., 2008), bunlardan yaklaşık 400 tanesi olgunluğa erişir. Büyük bir çoğunluğu gelişimin değişik evrelerinde atreziye uğrar. Primordiyal folliküllerin atrezisi sonucu oluşan boşluk hemen stroma tarafından doldurulur. Bu nedenle erişkin ovaryumunda atretik primordiyal folliküller görülmez. Büyük primer folliküller ve sekonder folliküllerin kalıntıları da makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır ve kalan boşluk stromal hücreler tarafından doldurulur. Ovaryumda kollajenöz skar dokusu oluşur. Skar aşamalı olarak kaybolur ve normal stromal dokuya dönüşür. Atretik follikülde bazı tekal hücreler kalır ve aktif olarak steroid (özellikle androjenler) salgılayan interstisyel hücrelere dönüşürler.

2.3. Folliküler Gelişim Başamaklarında Etkin Moleküler Mekanizmalar

2.3.1 Primordiyal Follikül Aktivasyonu

Primordiyal folliküller, ovaryumda gözlemlenebilen ilk ve en küçük folliküllerdir. Pre-granüloza hücreleri adı verilen yassı somatik hücreler ile çevrili, mayoz-I diploten evresinde duraklamış immatür oosit primordiyal follikül içerisinde (Borum K 1961; Peters H 1969). Primordiyal folliküller dişi üreme hayatı boyunca mevcut germ hücre rezervini oluşturur. Alternatif bir bakış açısı olarak, son çalışmalarda, dişi erişkin döneminde de oosit formasyonunun, dolaylı olarak follikül formasyonunun gerçekleştiği ileri sürülmüştür (Johnson ve ark., 2005). Ancak dişilerin genel olarak sınırlı sayıda oosit ile dünyaya geldiği ve yaşa bağımlı olarak bu sayının azaldığı fikri daha kabul görmektedir (Broekmans ve ark., 2007; Hansen ve ark., 2008).

Primordiyal folliküller, ovulasyona uğrayacak matür oositi meydana getirmek için primer follikül aşamasına geçerler ve bu geçiş primordiyal follikül aktivasyonu olarak bilinir. Ovaryumlarda 350.000-500.000 primordiyal follikül olmasına karşın (Hansen ve ark., 2008), bunlardan yaklaşık 400 tanesi matürasyonunu tamamlar ve ovulasyon gerçekleşir. Yani yaklaşık 1.600 follikülden sadece bir tanesi aktivasyon sonrasında ovule olacak oositi geliştirir. Primordiyal folliküllerin büyük bölümü

gelişimine başlamadan atreziye uğrarken (Tingen ve ark., 2009), aktive olan primordiyal follüküler için ovulasyon ya da atrezi şeklinde iki seçecek mevcuttur (Greenwald 1972).

Primordiyal follükül aktivasyonu dinamik bir süreç olup sıkı kontrol edilir ve moleküler mekanizması henüz tamamen aydınlığa kavuşmamıştır. Hücre bölünmesi ve apoptoz gibi hücrel süreçlerin düzenlenmesinde rolü olan “phosphatase and tensin homolog / phosphoinositide 3-kinase” (PTEN/PI3K) sinyal yolağı primordiyal follüküllerin aktivasyonunda önemlidir. Fonksiyonel PI3K yolağı primordiyal ve primer follüküllerde mevcuttur (Reddy ve ark., 2005). PI3K yolağı aktivasyonu, bir serin/threonin protein kinazı olan “protein kinaz B” (AKT) komponentinin aktivasyonu ile hücre bölünmesi ve sağ kalımını arttırırken, PTEN PI3K için negatif regülatördür (Cantley 2002).

PTEN yokluğunda artan PI3K aktivitesinin sonucunda oositlerde fosforile AKT ve “Forkhead box O3” (FOXO3a) seviyeleri artar. FOXO3a apoptozun inhibisyonunu ve hücre döngüsünün duraksamasını başlatan transkripsiyon faktörüdür. Fosforillenerek aktive olan AKT, FOXO3a’u baskılar. Hücre döngüsü baskılanmasının ortadan kalkması ile follüküler aktivasyon gerçekleşir.

PTEN inhibitörü ve PI3K aktivatörünün uygulanması ile gerçekleştirilen PTEN/PI3K sinyal yolağının manipülasyonu, in vitro olarak primordiyal follükül aktivasyonu ve pre-ovuluar follüküllerin gelişimine olanak tanır.

Primordial follüküllerin gelişimsel duraksaması ile ilişkili bir başka sinyal yolağı “the tumor suppressor tuberous sclerosis complex 1” (Tsc1) ‘dir. Bu kompleks “memeli rapamycin complex 1 (mTORC1)” yolağını aktive eder. Fare modellerinde Tsc1 mutasyonu, primordiyal follüküllerin prematür aktivasyonu ve follüküllerin azalmasıyla oluşan prematür ovaryan yetmezlik ile sonuçlanır (Adhikari ve ark., 2010).

Proto-oncogene receptor tyrosine kinase (KIT) ve ligantı erken dönemde sırasıyla somatik hücrelerden ve oositte eksprese edilir. Teka hücrelerinin yeniden düzenlenmesi, granüloza hücre proliferasyonu ve oosit büyümesini düzenleyerek folliküler gelişimin başlamasından sorumludur (Adhikari ve ark., 2010). İn vitro çalışmalarda, KIT ligand uygulanması AKT aktivasyonunu ve FOXO2 transkripsiyonunu baskılayarak, her iki komponentin fosforillenmesi ile PI3K/AKT yolağının düzenlenmesini sağlar (Reddy ve ark., 2005).

Granüloza hücrelerinden eksprese edilen anti-Müllerian hormon (AMH), “Transforming growth factor” (TGF β) süper ailesinin bir üyesidir. Aktive olan primordiyal folliküller ve primordiyal havuz arasındaki dengenin korunmasında gereklidir. *Amh* geni mutant olan farelerde, AMH yokluğunda artan primordiyal follikül aktivasyonu sonucunda hızlı şekilde primordiyal havuzun tükendiği gösterilmiştir. AMH gen mutasyonlarında daha fazla sayıda pre-antral ve küçük antral follikül gözlemlenmiştir (Durlinger ve ark., 1999; Fortune 2003). Farelerde AMH’nın primordiyal follikül aktivasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (Durlinger ve ark., 2002a; 2002b). Ancak insan modellerinde AMH uygulaması ile primordiyal folliküllerin büyümesinin başlamasında pozitif etkiler de rapor edilmiştir (Schmidt ve ark., 2005).

Follikül aktivasyonunda potansiyel rolü olan bir diğer sinyal yolağı olarak Hippo sinyal yolağı tanımlanmıştır (Hsueh ve ark., 2014) Hippo sinyal yolağı, hücre yoğunluğunun fazla olduğu alanlarda hücre membran bağlantıları ile aktive olan yüksek derecede korunmuş bir kinaz kaskadıdır. Aktivasyonu ile “yes associated protein”(YAP) olarak isimlendirilen hücre proliferasyon faktörünün fosforile olarak inaktivasyonuna sebep olur. Bu şekilde hücreleri yoğun dokularda hücre gelişimi ve proliferasyonu inhibe edilirken, daha az yoğun alanlarda yolak inaktive olur ve YAP hücre büyümesini- proliferasyonunu destekler.

Primordiyal folliküllerdeki oositi çevreleyen yassı pre-granüloza hücrelerinin, tek sıra kübik granüloza hücrelerine değişimi ile primer folliküllerin yapısal formasyonu gerçekleşir. Oosit kaynaklı iki transkripsiyon faktörü olan

“Spermatogenesis and Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1” (Sox11) ve “Newborn Ovary Homeobox-Encoding Gene” (Nobox)’in erken dönem ekspresyonları, folliküler gelişimin bir sonraki basamağı olan primer follikül dönüşümü için şarttır. Ovaryumlarda Nobox gen eksikliğinde, folliküllerin büyük bir kısmı primordial aşamada duraklamıştır ve oositler dejeneredir (Rajkovic ve ark., 2004).

2.3.2. Primer Follikülden Sekonder Follikül Aşamasına Geçiş

Primer ve sekonder folliküllerin gelişiminin başlangıcı follikül stimulan hormon (FSH)’dan bağımsızdır ve hormonların yokluğunda gelişimi de bunun kanıtıdır (Fortune ve ark., 1979). Ancak FSH reseptörü hem insanda hem farede erken dönem folliküllerin granüloza hücrelerinde eksprese edilir (O’Shaughnessy ve ark., 1996; Oktay ve ark. 1997). Oosit, granüloza ve teka hücrelerinden salınan lokal intraovaryan parakrin faktörler primer follikül aşamasından sekonder aşamaya geçişi sağlar (Kol ve ark., 1995).

Primer follikül aşamasından sekonder aşamaya geçişte önemli rolleri olan bir çok parakrin ve otokrin faktör tanımlanmıştır. TGF- β ailesinin en iyi bilinen üyelerinden “Growth differentiation factor 9” (GDF9) ve “Bone morphogenetic protein 15” (BMP15), follikülogenez ve ovulasyon süresince erken dönemden başlayarak devam eden rollere sahiptirler. Fare ovaryumunda GDF9 yoksunluğunda, primordiyal follikül oluşumu mevcut olsa da primer follikülden yoksundur ve fare infertildir. Buna paralel olarak, ovaryan dokulara in vitro GDF9 uygulanması ile primer aşamadan sonraki folliküler gelişim başlamaktadır (Hayashi ve ark.,1999; Nilsson ve ark., 2002). İlginç olarak, GDF9 knock out fare ovaryumlarında, anormal granüloza hücre formasyonu ile artan KIT ligand ekspresyonu ve teka hücre formasyonunun olmadığı görülmüştür (Dong ve ark., 1996; Carabatsos ve ark., 1998; Elvin ve ark., 1999). Bu veriler, erken dönem sonrasında pre-granüloza hücrelerinin fonksiyonlarının GDF9 tarafından düzenlendiğini gösterir (Elvin ve ark., 1999). BMP15, FSH-bağımsız olarak farklılaşmamış granüloza hücrelerinin çoğalmasında rol oynar (Otsuka ve ark., 2000). GDF9’un aksine, BMP15 mutant farelerde minor fertilitate problemleri görülür (Yan ve ark., 2001).

Maternal etkili genlerin (Mater, Zar1, Npm2 gibi) ekspresyonunun erken dönem embriyogenezdeki etkinliğinin yanısıra, primer follikül aşamasından antral aşamaya kadar gelişimi başlatır (Tong ve ark., 2000; Wu ve ark., 2003; Burns ve ark., 2003).

2.3.3. Preantral Aşamadan Erken Antral Follikül Aşamasına Geçiş

Erken folliküler gelişimin gonadotrofinlerden bağımsız olduğu düşünülür ve esas olarak lokal salgılanan faktörler tarafından yönlendirilir. Folliküller pre-antral aşamalara geldiğinde, erken antral aşamalara kadar gelişim intraovaryon faktörlere bağlıdır. Erken aşamaların aksine, folliküller FSH ve LH reseptörlerini eksprese ederler ve bu aşamada folliküllerin gonadotrofinlere yanıt verebildiği in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir.

Pre-antral aşamadan erken antral aşamaya geçişte etkin birçok pozitif regülatör tanımlanmıştır. Oosit tarafından sentezlenen GDF9 ve BMP15, granüloza hücrelerinin proliferasyonunda indükleyici etkiye sahiptir. BMP15, farklılaşmamış granüloza hücrelerinde FSH bağımsız süreçlerde mitoz bölünmeyi indüklerken, FSH bağımlı dönemde granüloza hücrelerinde sitoplazmik farklılaşmalar ile ilişkilidir. BMP15 mutant dişi fareler, antral döneme kadar normal gelişim gösterebilir, azalmış ovulasyon ve fertilizasyon oranlarına bağlı olarak subfertilidir. Koyunlarda ise BMP15 mutasyonlarında artan ovulasyon oranları görülmüştür (Galloway ve ark., 2000).

Androjenlerin preantral granüloza hücrelerinde çoğalma ve sağ kalım üzerinde etkileri gösterilmiştir. Domuzlarda oosit tarafından salgılanan faktörler ve androjenler arasındaki etkileşimin folliküler gelişimi desteklediği gösterilmiştir (Hickey ve ark., 2005).

Birbirleri ile yakın ilişkili ve zıt rollere sahip TGF-B ailesi üyesi aktivin ve inhibin'in folliküler gelişime katkıları vardır. Bu iki protein kompleksinin aynı protein familyasındaki tüm üyelerde ortak iki alt birimi mevcuttur (Hillier ve ark.,

1994). Folliküler çapın artışına ve granüloza hücre farklılaşmasına paralel olarak, aktivin seviyesinde düşüş inhibin seviyesinde artış görülür. İnhibin-B follikülogenezisin erken aşamalarında eksprese edilirken, dominant follikül seçilimini takiben antral folliküle farklılaşma sürecinden itibaren İnhibin-A dominant hale gelir (Hillier ve ark., 1994; Findlay ve ark., 2000).

Granüloza hücrelerinin kendi içinde ve oosit arasındaki iletişim follikülogenezisin tüm aşamalarında önemlidir. Konneksin 43 (Cx43) ve Konneksin 37 (Cx37) olarak bilinen oluklu bağlantı (Gap junction) proteinleri bu iletişimin korunmasında rol alır. Cx43 granüloza hücrelerinden eksprese olarak oluklu bağlantıların granüloza hücrelerindeki formunu oluştururken, Cx37 folliküler gelişimin tüm evrelerinde oositten eksprese edilir ve oosit-granüloza hücreleri oluklu bağlantı iletişiminde önemli rol oynar.

2.3.4. Antral Gelişim ve Gonadotrofinleri Rolü

Antral follikül aşamasından ovulasyon sürecine kadar ki gelişim sürecinin hipofizden salgılanan gonadotrofinlere (FSH ve LH) bağımlı olduğu düşünülür. Antral gelişimin in vivo olarak gereksinimi FSH'dır. FSH, mural granüloza hücrelerinde, ovulasyonun başlamasında kritik rol oynayan ve folliküllerin LH etkisine girmesini sağlayan luteinize hormon reseptör (LHR) mRNA ekspresyonunu başlatır. Gonadotropinlerin ovaryumdaki etkisi reseptörlerinin aktivasyonu ile sağlanır. Gonadotrofinlerin etkisi ile, folliküller gelişim sürecini düzenleyen ve granüloza hücre çoğalması ile farklılaşmasını reseptörleri aracılığı ile sağlayan androjenler ve östrojenler sentezlenir. Gonadotrofinlerin etkisi altında, LH varlığı ile teka hücrelerinden androjenler sentezlenirken, FSH varlığında granüloza hücreleri androjenleri substrat olarak kullanarak östrojen sentezler (Dorrington ve ark., 1979; Hillier ve ark., 1994).

Androjenlerin, androjen reseptörü aracılığı ile granüloza hücre proliferasyonunu ve sağ kalımını desteklediği gösterilmiştir. Androjen reseptörü defektif dişi fareler subfertil olup, antral follikül ve ovule olan oosit sayısında

azalmalar ile birlikte granüloza hücrelerinde artan apoptoz sonucu gelişen pre-matür ovaryan yetmezlik gözlemlenir (Hu ve ark., 2004; Shiina ve ark., 2006).

Östrodiol, östrojenik aktivitenin pre-dominant östrojen formudur. Granüloza hücrelerinin major fonksiyonu östrodiol sentezidir. Östradiol follikül içerisinde aromataz enzimi aracılığı ile sentezlenir ve granüloza hücrelerinin gonadotrofinlere yanıtı sonucunda seviyesi artar.

Gonadotrofinlerle birlikte, antral gelişimde etkinlik gösteren bir çok faktör de tanımlanmıştır. Insulin Growth Faktör (IGF) protein ailesi, gonadotrofinler ile birlikte follikül seçilimi ve antral aşamaya kadar follikül gelişiminde rol oynar. Rodentlerde, IGF1 ve IGF2'nin granüloza ve teka hücrelerinde predominant etkisi olup, tüm hücrelerde FSH ve LH ile koordine olarak etkisini gösterir (Khamisi ve ark., 2001). Folliküler gelişimin antral aşamasına kadar IGF dışında birçok farklı intraovaryan faktörün etkili olduğu gösterilmiştir. Gelişimin erken aşamalarında, granüloza hücrelerinden sentezlenen aktivin ve inhibin teka hücrelerinde LH tarafından indüklenen androjen sentezinde rol oynayan parakrin faktörlerdir (Hsueh ve ark., 1987; Hillier ve ark., 1993; Campbell ve ark., 2001).

Oosit tarafından sentezlenen GDF9 ve BMP15 antral follikül gelişiminde de önemli rol oynar. GDF9 ve BMP15 kumulus hücre fonksiyonlarını düzenler. Bu faktörler kombine ya da ayrı ayrı FSH etkinliğini artırır, granüloza hücre çoğalması ve farklılaşmasını stimüle eder. GDF9 kumulus hücrelerinde aromataz aktivitesini baskılayarak FSH bağımlı östrodiol sekresyonunu inhibe eder. FSH indüksiyonu ile LH reseptör formasyonunu baskılar. BMP15 kumulus hücrelerinde apoptozu ve FSH reseptör ekspresyonunu baskılar (Elvin ve ark., 1999; Otsuka ve ark., 2001, Vitt ve ark., 2000). Hem GDF9 hem de BMP15, BMP6 ile beraber FSH'nın indüklediği progesteron üretimini baskılayarak erken prematür luteinizasyonu engeller. Pre-ovulatuvar folliküllerde, GDF9 ve BMP15 kumulus ekspansiyonu ve musifikasyonda kritik rol oynar (Elvin ve ark., 1999; Dragovic ve ark., 2007; Yoshino ve ark., 2006).

Sonuç olarak, preovulatar folliküller ovulasyona hazır, gelişimini tamamlamış oositler içerir.

2.4. Oosit Matürasyonu

Oosit folliküler gelişim ile eş zamanlı olarak nüklear, sitoplazmik ve membranöz matürasyon geçirir. Oositin mayoz bölünmeye devam edebilme ve nüklear matürasyonunu tamamlama kapasitesi mayotik yeterlilik olarak tanımlanır. Mayotik yeterlilik oositin yaklaşık olarak %80 oranında son boyutlarına eriştiği, follikülogenezin antrum formasyonu oluşumu ile birlikte gerçekleşir (Szybek ve ark., 1972; Durinzi ve ark., 1995). Gelişimsel yeterlilik ise oositin sitoplazmik matürasyonu ile ilişkilidir ve canlı doğum ile sonuçlanabilecek bir gelişimsel kapasiteyi gösterir.

2.4.1. Mayotik Matürasyon

Erken aşamada oosit mayotik yeterliliğini kazandığında fertilizasyon kapasitesi bakımından henüz gelişimini tamamlamamıştır. Mayotik gelişimin germinal vezikül basamağında kalarak diğer matürasyon süreçlerinin tamamlanmasını beklemektedir. İlk mayoz bölünmenin ardından, ikinci mayoz bölünmenin metafaz II aşamasına kadar matürasyon devam eder. Mayoz bölünme sırasındaki duraksama ve devam mekanizmaları uzun yıllar süren çalışmalar ile kısmen aydınlığa kavuşturulmuştur.

Oosit sitoplazmasında adenil siklaz (AC) tarafından üretilen siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyesinin yükselmesi mayotik duraklamanın korunması için önemlidir (Nogueira ve ark., 2003). Ooplazmada cAMP seviyesinin yüksek tutulması, oosit-kumulus hücreleri arasındaki oluklu bağlantılar ve oosit sitoplazmasında mevcut olan cAMP fosfodiesteraz inhibitörleri aracılığı ile sağlanır. Endojen cAMP alımı oosit G-protein reseptör -3 (GPR 3) ve 12 (GPR 12) aktivasyonu ile gerçekleşir (Mehlmann 2005; Vaccari ve ark., 2008).

Kumulus hücrelerinden oosite aktarımı gerçekleşen siklik guanozin monofosfat (cGMP), oosit metabolizmasında cAMP yıkımını sağlayarak, mayozun devam etmesini başlatan cAMP-fosfodiesteraz enziminin aktive olmasını engeller

(Norris ve ark., 2009). Oosit çevresini saran ve oositle iletişim halinde olan kumulus hücreleri mayotik duraklamanın korunmasında önemlidir. Oosit kumulus hücrelerinde natriüretik peptit reseptör 2 (Npr2) ekspresyonunu sağlar. NPR2, c- tip natriüretic peptit (CNP) ligantı tarafından aktive edilir ve oosit içerisine kolayca geçerek fosfodiesteraz 3A (PDE3A) aktivitesini inhibe eden cGMP'i üretir. Ooplazmada PDE3A aktivasyonu ile cAMP hidrolize olur ve AMP biçimini alır. cAMP azalması ise protein kinaz A (PKA) aktivitesinin azalması, protein kinaz C (PKC) aktivitesinin artışı ve matürasyon başkılavuz faktörlerin ortadan kalması ile sonuçlanır. Siklin B ve siklin bağımlı kinaz (P34cdc25) kompleksinden oluşan mayoz başlatıcı faktör (MPF) defosforile olarak aktive olur ve oosit mayoz bölünmeyi devam ettirebilme yeteneğine kavuşur (Gardner ve ark., 2009).

Oositin mayotik matürasyonu, basamaklar içeren bir süreç olmakla beraber, in vivo şartlarda pre-ovulatuvar LH yükselişi (piki) ile başlar ve oositin I. mayozunu tamamlaması sonucunda ilk polar cisimciğin atılımı ve metafaz II aşamasına ulaşması ile sona erer. LH piki sonrasında, kumulus hücrelerinden gonadotrofinlere yanıt olarak sentezlenen hyaluronik asit'in etkisiyle oluşan kumulus ekspansiyonu oositin mayotik sürecinin devamını sağlaması için önemli bir aşamadır. Kumulus ekspansiyonu, granüloza hücre tabakasında üretilen cAMP üretiminin seviyesi ve protein kinaz A aktivasyonu aracılığıyla LH'nin indüklediği epidermal growth faktör benzeri peptit (EGF-I) stimülasyonuna bağlıdır. Bu stimülasyonun etkisiyle kumulus hücrelerinde musifikasyon/ekspansiyon ilişkili transkriptler olan Has2, Ptx3 ve Tnfaip6 seviyeleri artar. Alternatif olarak, kumulus ekspansiyonu oosit tarafından üretilen ekspansiyon enabling faktör (CEEFs) ile sağlanır (Gardner ve ark., 2009).

EGF-benzeri faktörlere oluşturulan yanıtlar, siklooksijenaz-2 (cox-2) mRNA ve protein ekspresyonu ile prostaglandin E2 (PGE2) üretimini de sağlayan "extracellular signal-regulated kinases" (ERK1/2) yolağı aracılığı ile oluşturulur. Ayrıca, Cox-2'nin granüloza hücrelerinde EGF-benzeri faktörlerin üretimini indüklediği gösterilmiştir (Ben-Ami ve ark., 2006).

2.4.2. Oositin Sitoplazmik Matürasyonu

Oositin sitoplazmik matürasyonu, fertilizasyon, aktivasyon, pronükleer formasyon ve erken embriyolojik gelişime hazırlık sürecini yansıtır. Oosit, germinal vezikül aşamasından itibaren nükleer matürasyona paralel olarak sitoplazmik matürasyonunu gerçekleştirir. Matürasyon sırasında sitoplazmanın yeniden düzenlenimindeki defektlerin, oosit gelişim kapasitesini mayotik süreçteki hatalardan daha fazla etkilediği düşünülmektedir.

Oositin sitoplazmik matürasyonu sürecinde protein sentezi, hücre iskeletinin yeniden düzenlenimi, iyon dengesi, anti- oksidasyon mekanizmaları ve kortikal granüllerin göçü gerçekleşir. Oositin nükleus ve ooplazmasında, matürasyonun düzenlenmesi için gerekli protein sentezi ve birikimini sağlayan transkripsiyon süreçleri bulunmaktadır. Oosit nükleer ve mitokondrion genlerinin kodladığı transkriptler orijin ve fonksiyonlarına göre hücrede germinal vezikül yıkımına kadar depo edilir ya da kumulus hücreleri ile hücresele iletişimde görev alırlar.

Oosit matürasyonu sürecinde, organellerin dağılımı ve düzenleniminde, kromozomların hareketleri, kortikal granüllerin göçü ve polar cisimciğin atılımında hücre iskeletini oluşturan aktin ve tübülün mikrofilamanları önemli rollere sahiptir. Aktin boyaları ve mikrofilaman baskılayıcıları kullanılarak yapılan gözlemlerde, mikrofilamanlar sitokinetik işlevlere yardımcı olacak polimerize bir aktin katmanı oluşturacak şekilde ooplazmanın kortikal bölgesinde yoğunlaşmıştır. Bu nedenle mikrofilamanların oluşumu ve yerleşimi de oosit matürasyonu için belirleyici olabilir (Gardner ve ark., 2010).

Sitoplazmik matürasyonun önemli aşamalarından birisi de kortikal granüllerin sub-oolemmal alanda sıralı dizilimi, yani köken aldıkları Golgi aygıtından perifere göçüdür. Kortikal granüller tek bir membran ile çevrili olup, mukopolisakkaritler, proteazlar, asit fosfataz ve peroksidaz enzimlerini içerir. Kortikal granüller, sperm penetrasyonu ile birlikte ooplazma kalsiyum (Ca^{+2}) hareketlerine yanıt olarak ekzositoza uğrar. Barındırdıkları enzimler ile zona pellusida da yapı değişimine neden olarak polispermi blokajını oluşturur (Zona Reaksiyonu). Kortikal granüllerin ooplazma içerisindeki düzensiz dağılımları

sitoplazmik matürasyon hatalarının güvenilir bir göstergesidir ve polispermi riskinin de belirteçidir (Gardner ve ark., 2010).

Fertilizasyon, pronükleer formasyon ve erken embriyonik gelişimde oolemma iyon seviyesinin düzenlenmesi önemlidir. Fertilizasyon için ilk basamak olan sperm penetrasyonu sırasında sitoplazmik matürasyon süreçlerinde depolanan Ca^{+2} salınımı ile oosit aktivasyonu gerçekleşir. Matürasyonun erken basamaklarında intrasellüler Ca^{+2} depolanma kapasitesi düşük olmasına karşın, sitoplazmik matürasyon süreci sonunda kapasite artar ve fertilizasyon için yeterli seviyeye ulaşır. Kortikal granüllerin subolemmal alana göçünde de Ca^{+2} iyonları önemli rol oynar. İyon düzenlenimi kadar önemli bir diğer matürasyon süreci ise oksidatif hasarın engellenmesi ve reaktif oksijen seviyelerinin kontrol altında tutulmasıdır. Oosit matürasyon seviyesi artışına bağlı olarak enzimatik ve diğer oksidatif süreçler sonrasındaki hasarlara karşı ooplazmadaki glutatyon (GSH) artışı gerçekleşir. Fertilizasyonun ilk basamağı olan sperm penetrasyonu sonrasında, sperm kromozom dekonduksiyonu sürecince ve reaktif hasarlarından korunması da ooplazmanın GSH aktivitesi ile sağlanır.

2.4.3. Oosit Membran Matürasyonu

Oosit matürasyonu sürecinde hücredeki hacimsel artış ve genişleme nedeniyle membran yapılarındaki yapım ve yıkım mekanizmaları önemlidir. Oolemma, ekstrasellüler alan ile ooplazma arasında bir bariyer olmanın yanı sıra folliküler mikroçevre ile hücresel iletişimde rol oynar. Nükleer ve sitoplazmik matürasyon için gerekli parakrin uyarılar oolemma membran reseptör proteinleri aracılığıyla etkinliğini gösterir. Bu kapsamda oolemma yüzey reseptörlerinin organizasyonu hem mayotik hem de sitoplazmik matürasyonun gerçekleşmesi için önemlidir.

Gelişmekte olan folliküllerin önemli bir parçası da oositi çevre granüloza hücrelerinden ayıran ekstrasellüler membran yapısındaki zona pellisudadır. Zona pellisuda (ZP) oosit ve granüloza hücrelerinden sentezlenen glikoprotein yapısından oluşmaktadır. Folliküler gelişim sürecinde, ilk olarak primer follikül basamağında oolemma çevresinde gözlemlenir. Oositin gelişimi devam ettikçe ZP genişler ve

matür bir oositte 18 µm kalınlığına ulaşır. Sülfatlanmış ZP1, ZP2, ZP3 ismi verilen 3 glikoproteinden oluşur. Her bir glikoprotein farklı görevleri üstlenmiştir. ZP3 sperm oositi tanınması ve penetrasyonunda etkin görev alırken, ZP2 ise sperm penetrasyonu sonrasında polispermi blokajı ile sonuçlanan zona reaksiyonunda etkindir. ZP1 diğer glikoproteinlerin yapısal olarak düzenleniminden sorumludur. Fertilizasyon ve erken embriyolojik gelişim süreçleri için oosit matürasyonu süresince ZP düzenlenimi ve işlevselliği son derece önemlidir (Gardner ve ark., 2009).

2.5. Oosit Matürasyon Yetmezliği

İnfertil hastaların yaklaşık %8.6 - %15.2'si en az bir mayotik bakımdan yetersiz gelişim kapasitesinde oosit üretir (Bar-Ami S ve ark., 1994; Avrech ve ark., 1997). Oositlerin %25'inden fazlası immatür olduğunda fertilizasyon ve klinik gebelik oranı belirgin olarak azalır (Avrech ve ark., 1997). Tesadüfi olarak gelişen immatür oositlerin tekrarlayan oosit matürasyon yetmezliği sendromundan ayırt edilmesi önemlidir. Hiç matür oositin üretilmediği mutlak oosit matürasyon yetmezliği nadiren gözlenir. Bu olgularda gözlenen önemli özellikler; primer infertilite, tekrarlayan immatür oosit üretimi, in vitro matürasyon (IVM) ile matürasyonun sağlanamaması ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonuna rağmen fertilizasyon başarısızlığı görülmesidir (Jamnongjit 2005).

Tüm olgularda görülen temel özellik tekrarlayan immatür oosit üretimine bağlı infertilitedir (Winston 1997; Li ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, stimülasyon protokolünü değiştirmek, IVM veya ICSI uygulamaları sonuçları iyileştirmemektedir. Sınırlı veriler olmasıyla birlikte, kanıtlar oosit matürasyonundaki belirgin defektin, oositin mayoz gelişiminin belirli evrelerinde duraklama ve buna bağlı infertiliteye yol açtığını göstermektedir.

Mayoz bölünmenin yeniden başlaması ve ilerlemesi mayotik yeterliliğin kazanılmasına bağlıdır. Mayoz bölünmenin yeniden başlamadan önce gelişim fazında oosit mRNA ve protein biriktirir ve bu birikim mayoz bölünmenin tamamlanması için gereklidir (Nakanishi ve ark., 2006; Liang ve ark., 2007). Mayotik

gelişim önemli düzenleyici proteinlerin kontrolü altındadır. Bu proteinlerin üretiminin düzenlenmesi fosforilasyon, lokalizasyon ve degradasyon aracılığıyla başarılıdır. Kilit noktadaki herhangi bir değişim matürasyon yetmezliği ile sonuçlanır.

2.6. Kisspeptin

2.6.1. Kisspeptin ve Reseptörünün Moleküler Yapısı

KISS1, kisspeptini kodlayan gen, 1996 yılında insan malign melanoma metastazının baskılayıcısı olarak keşfedildi (Lee ve ark., 1996). Hersey şehrinde keşfedilen bu gen, şehirde üretilen ünlü 'kisses' çikolatalarından ismini almıştır. KISS1 ismindeki 'SS' ise anti metastatik etkilerini de simgeleyen baskılayıcı dizi "supressor sequence" olarak bilinir.

KISS1 geni, kromozom 1q32 de lokalize ve ilk ikisi translasyona uğramayan dört eksondan oluşur (West ve ark., 1998). KISS1 geninin ilk prepro-kisspeptin olarak translasyonu gerçekleşir (Kisspeptin -154, 145 amino asit). Bu peptit, dibazik aminoasit içeren kısımlarından proteolitik yıkımlar aracılığı ile C-terminalleri ortak, 4 farklı amino asit sayısına sahip biyoaktif kisspeptin formlarına dönüştürülmektedir (Kisspeptin 54, -14, -13, -10). Kisspeptin -54 formu (54 amino asit içeren) yanı sıra diğer formlarında bulunması sebebiyle , proteolitik yıkımların prepro-kisspeptin N-terminal bölgesinden gerçekleştiği ve biyo-aktif peptidlerin oluştuğu düşünülmüştür.

Bugün KISS1R olarak isimlendirilen G-protein reseptörü, ilk olarak sıçan beyinde ve sonrasında insanda 2001 yılında tanımlandı (Muir ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001). KISS1R, kromozom 19p13.3 bölgesinde, 5 ekson içermektedir ve 398 amino asit ile yedi geçişli hidrofobik membran domainden oluşur (Muir ve ark., 2001). Galain reseptör ailesi ile amino asit dizilimi bakımından %40 benzerlik gösterir, fakat galain ve galain benzeri peptitler bu reseptöre bağlanmaz (Lee ve ark., 1999). Kisspeptinin reseptörü olan KISS1R ile bağlanması sonucunda fosfolipaz C aktive olur ve sekonder intrasellüler mesaj olarak inositol trifosfat ve diaçilgliserol aracılı Ca^{+2} salınımı gerçekleşir. Protein kinaz C aktivasyonu ile kisspeptin

fonksiyonunu yerine getirir (Muir ve ark., 2001; Liu ve ark., 2008; Constantin ve ark., 2009).

2.6.2. İnsanda Kisspeptin Nöron Lokalizasyonu

Kisspeptin nöronlarının lokalizasyonu hakkındaki ilk çalışmalar, pre/post-menapozal kadın otopsislerinden elde edilen beyin dokularında yapılmıştır (Rometo ve ark., 2007). Son çalışmalar ile, hem erkek hem de kadın otopsi örneklerinde, kisspeptin nöron gövdelerinin büyük çoğunluğunun infundibular nukleuslarda olduğu doğrulanırken, rostral preoptik alanda kisspeptin nöronlarından yoğun ikinci bir bölge olduğunu gösterilmiştir (Hrabovszky ve ark., 2010).

Kisspeptin nöronları farklı türlerde infundibular /arkuat çekirdeklerde lokalize olurken, rostral alanda lokalize olanlar insan da dahil olmak üzere türe özgüdür (Clarkson ve Herbison, 2006; Pompolo ve ark., 2003; Ramaswamy ve ark., 2007; Clarkson ve ark., 2009; Hrabovszky ve ark., 2010). Rodentlerde rostral alan, anteroventral periventriküler çekirdekler (AVPV) ve periventriküler çekirdeklerde, periventriküler alanın devamı üçüncü ventrikülün rostral periventriküler olarak bilinen alanında lokalizedir (Clarkson ve Herbison, 2006; Clarkson ve ark., 2009). İnsanlarda ise kisspeptin nöron gövdeleri rodentlerden farklı olarak rostral periventriküler alanın yerine preoptik alana yayılmıştır (Pompolo ve ark., 2003; Oakley ve ark., 2009; Hrabovszky ve ark., 2010).

İnsanda, GnRH nörosekresyon bölgesi olan infundibular sapın yoğun perikapiller pleksusunu Kisspeptin aksonları oluşturur (Hrabovszky ve ark., 2010). Rodentlerde, koyunlarda ve maymunda Kisspeptin ve GnRH aksonları arasında akso-somatik, akso-dentritik ve akso-aksonal bağlantılar infundibular sapta gösterilmiştir (Clarkson ve Herbison, 2006; Ramaswamy ve ark., 2007; Smith ve ark., 2008a; Hrabovszky ve ark., 2010; Uenoyama ve ark., 2011). GnRH nöronları Kiss1r mRNA eksprese eder (Irwig ve ark., 2004; Han ve ark., 2005; Messenger ve ark., 2005). Bu bilgiler, kisspeptin ve GnRH nörosekresyonu arasında bağlantı olduğunu gösterir. Ancak insanlarda tüm GnRH nöronları ile kisspeptin nöronlarının tümü arasında bağlantı görülme sıklığı düşüktür.

Kisspeptin nöron topluluğu başka nöropeptitler ile birlikte eksprese olur. Hipotalamusta kisspeptin, nörokinin B ve dinorfin sıklıkla birlikte lokalizedir. Postmenapozal dişilerde, kisspeptin ve nörokinin B'nin ekspresyonları infundibular bölgede benzer lokalizasyondadır. Kisspeptinden farklı olarak, nörokinin ve dinorfin ekspresyonları rostral preventriküler alan ve preoptik alanda mevcut değildir. İnsanda nükleus ve rodentlerde arkuat nükleus nöronları bu üç peptit için ortak ekspresyon bölgeleridir ve KNDy nöronları olarak isimlendirilir (Cheng ve ark., 2010). Rostral preventriküler alan ve preoptik alandaki kisspeptin nöronları KNDy nöronları değildir.

2.6.3. Kisspeptin Nöron Topluluklarının Farklı Fizyolojik Fonksiyonları

İfundibular nükleus ve arkuat nükleuslardaki KNDy nöronları GnRH nöron gövdeleri ve nörosekretuar terminallere etkisini göstererek GnRH sekresyonunu aktive eder (Krajewski ve ark., 2005; Ciofi ve ark., 2006; Ramaswamy ve ark., 2007). KNDy nöronları, insanda GnRH nöron gövdeleri ve dendritleri direk bağlantılar yaparak, median emimens'e kadar uzanırlar (Krajewski ve ark., 2005; Ciofi ve ark., 2006; Clarkson ve Herbison, 2006; Ramaswamy ve ark., 2007; Dahl ve ark., 2009). KNDy nöronları birbirleri ile bağlantılı ve kontrollü olarak, koordineli ve pulsatif GnRH salınımını uyarırlar (Foradori ve ark., 2002; Burke ve ark., 2006; Lehman ve ark., 2010).

Kisspeptin aracılı GnRH stimülasyonu seks steroidlerine bağımlıdır. Östrojen ve progesteron hem AVPV, hem de arkuat/infundibular bölgede seks steroid reseptörleri aracılığı ile kisspeptin aktivitesini düzenler (Ciofi ve ark., 1994; Goubillon ve ark., 2000; Foradori ve ark., 2002; Smith ve ark., 2005; Franceschini ve ark., 2006).

Kisspeptin nöronları cinsiyete göre değişim gösterir. Dişi hipotalamusu infundibular nükleuslar ve ventral periventriküler bölgede erkeklere oranla bariz olarak daha yoğun kisspeptin nöron hücre uzantılarına sahiptir. Rostral periventriküler bölgedeki kisspeptin nöron gövdeleri sadece dişilerde gözlemlenir

İfundibular alanda erkeklerde çok az sayıda kisspeptin hücre gövdesine rastlanırken, dişilerde çok yoğundur (Hrabovszky ve ark., 2010).

2.6.4. Kisspeptin ve GnRH Sekresyon Düzenlenimi

Kisspeptin, hayvan modellerinde ve insanda hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın potansiyel stimülatörüdür. Kisspeptin, direkt etkisini GnRH nöronlarındaki kisspeptin reseptörüne bağlanarak gösterir ve GnRH'nin portal dolaşıma salınımını takiben adenohipofizdeki gonadotroplardan FSH ve LH sekresyonunu başlatır. Kisspeptin insanlarda gonadotrophin salınımını düzenler, hem LH hem de FSH sekresyonunu stimüle eder, özellikle LH üzerindeki etkisi daha belirgindir (George ve Seminara, 2012).

2.6.5. Kisspeptin ve Gonadotrophinlerin Ovaryan Döngüde Sekresyonları

Sıçanların hayvan modeli olarak kullanılması ile birlikte, kisspeptinin dışı gonadotrophin aksının kontrolündeki potansiyel fizyolojik rolleri ovaryan döngü içerisinde tanımlanmıştır (Roa ve ark., 2006). Sıçanlarda proöstrus evresinden östrüs evresine geçiş döneminde intraserebral kisspeptin enjeksiyonunun maksimum seviye LH sekresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. Aslında östrüs döngüsünün sabahında, pre-ovulatar LH piki üzerinden henüz 12 saatten az bir süre geçse de, Kisspeptin-10 maksimum LH salınımını tetiklemektedir. Kisspeptinin LH salınımına en az etkisi ise diöstrus evresinde gözlemlenmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde, döngünün her evresinde kisspeptine cevap oluşturma yeteneği olsa da, proöstrüs evresinden östrüs evresine geçerken kisspeptin LH salınımında maksimum etkisini göstermektedir.

2.6.6. Kisspeptin ve Gonadotrophinlerin Ovaryum Ekspresyonları

Son yıllarda yapılan klinik ve deneysel gözlemler bir araya getirilip değerlendirildiğinde, hipotalamik KISS1 sinyal sisteminin üreme sisteminin nöroendokrin kontrolündeki rolü gösterilmiştir ve buna ek olarak hipotalamo-hipofizer-gonadal aks (HPG) üzerinde diğer modülatör faaliyetlerinin olabileceği de düşünülmüştür. Kisspeptin ve GPR54'nin hipotalamik etkilerinin yanında, hernekadar

ovaryan aksta farklı bölgelerde ekspresyonları gösterilmiş olsa da, periferal etkileri gözden kaçabilmektedir.

2.6.7. Kisspeptin ve Puberte

İnsan pubertesinde kisspeptin ve reseptörü (KISS1R/GPR54) sinyal sisteminin önemli rolü kisspeptinin üreme fonksiyonlarındaki kesin düzenleyici rollerinin tanımlanması ile gösterilmiştir. KISS1R geninde nokta mutasyonları ve delesyonlara bağlı olarak hipogonadotrophik hipogonadizm olgularında hasarlı pubertal gelişimler raporlanmıştır (de Roux ve ark., 2003; Seminara ve ark., 2003). KISS1R gen mutasyonları hem akrabalar arasında hem de bağımsız hastalarda gösterilmiştir. Bununla birlikte, kisspeptin reseptör ekspresyonunu aktif hale getiren mutasyonun (Arg386Pro) tanımlandığı bir olguda, erken puberte başlangıcı görülürken, bu mutasyonunun genetik geçişi tanımlanamamıştır (Teles ve ark., 2008). Üç pre-puberte olgusunda da KISS1 geninde mis-sence mutasyon (yanlış anlam mutasyonu) tespit edilmiştir.

2.6.8. Kisspeptin ve Final Oosit Matürasyonu

Kisspeptin son zamanlarda dişi üreme sisteminin nöroendokrin düzenlemesinde en önemli rolü oynadığı tanımlanan bir peptid hormondur (Seminara ve ark., 2003). 1970'li yıllarda GnRH'ın keşfinden sonra, GnRH dalgalanmalarını sağlayan mekanizmanın anatomik yerleşiminin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Hipotalamustaki kisspeptin nöronlarının keşfi ile, GnRH dalgalanmalarından sorumlu olan etkin lokalizasyonun kisspeptin nöronlarının bulunduğu infundibular çekirdek ve pre-optik alan olduğunu göstermiştir (Schally ve ark., 1971).

KISS1 geni tarafından kodlanan ve hipotalamik bir peptid olan kisspeptin, gonadal aksın kontrolünde temel rolü oynar ve pubertenin başlangıcı, seks hormonları aracılı gonadotrofinlerin salgılanmasının regülasyonu ile fertilitenin kontrolü tanımlanmış görevleridir (Pinilla ve ark., 2012). Kisspeptin direk olarak GnRH nöronlarındaki reseptörü aracılığı ile GnRH'ın portal dolaşıma salınımını

sağlayarak anterior hipofizdeki gonadotropilerden FSH ve LH salınımını indükler (Skorupskaite ve ark., 2014).

Kisspeptin, hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın potansiyel düzenleyicisidir. İnsanlarda, ovulasyon sırasında eksojen Kiss1'in LH sekresyonu üzerindeki düzenleyici etkileri ilk deneysel çalışmalara dayanmakla beraber, yeni çalışmalar Kiss1'in ovulasyonda LH pikindeki potansiyel rolünü göstermektedir. Eksojen kisspeptin, pre-ovulatuvar fazda uygulandığında LH sekresyonunu 3-4 kat arttırıcı etki gösterir ve tekrarlanan dozlarda (iki günde bir uygulama) menstrüel döngüyü kısaltarak sağlıklı bireylerde LH pikinin oluşmasına katkısı gösterilmiştir (Jayasena ve ark., 2011). Kisspeptinin ovulasyonun kontrolündeki merkezi ve lokal rolleri henüz tam olarak her yönüyle tanımlanamamış olsa da, ilk veriler kisspeptin uygulamasının hayvan çalışmalarında final oosit matürasyonundaki rolünü göstermiştir (Saadeldin ve ark., 2012). Buna ek olarak in vitro fertilizasyon tedavisi gören hastalara, kisspeptin uygulaması efektif olarak LH yükselişini başlatarak final oosit matürasyonunu indüklediği ve bu uygulama elde edilen oositlerin fertilizasyonu ve transferi sonucunda başarılı canlı doğum rapor edilmiştir (Abbara ve ark., 2013).

2.7. Siklooksijenazlar (COX)

Siklooksijenazlar araşidonik asitten prostaglanoidlerin sentezinde ilk iki basamak olan siklooksijenasyon ve peroksidasyon aşamalarını katalize eden enzimlerdir. Prostanoidler prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. Ovulatuvar süreç, preovulatuvar follikül rüptürü ve maternal germ hücresinin salınımı ile sonuçlanan bir takım biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri kapsar. Tüm bu süreçler, hiperanemi, lökosit ekstrasvasyonu gibi inflamatuvar reaksiyonlar ile proteolitik ve kollejenolitik aktivitelerin akut işaretlerini taşır (Espey 1980). İnflamatuvar reaksiyonlarda merkezi rol oynayan prostaglandinlerin ovulasyonda anahtar rol oynadıklarının anlaşılmasıyla birlikte, siklooksijenazların keşfi bu alanda dönüm noktalarından biridir.

2.7.1. Siklooksijenaz: Yapı ve Fonksiyonları

Ovulasyon, biyoaktif lipid substratlarının lokal faaliyetlerine bağlı olarak işlevselleşen, bir set genin erken indüksiyonu ile tetiklenen LH sinyal sistemi ile ilişkilidir. Bu substratların en önemli ikisinden biri olan “eicosanoid” 3 basamakta sentezlenir:

1. Membran fosfolipidlerinden, fosfolipaz A2 tarafından araşidonik asit salınır,
2. Araşidonik asit siklooksijenaz tarafından prostaglandin H2 ye dönüştürülür
3. Sentetazlar tarafından biyolojik aktivitesine göre terminal formasyonu belirlenir (Shimizu ve Wolfe 1990; Funk 2001).

Prostaglandin sentezinde anahtar sınırlayıcı basamağın siklooksijenaz (COX) aktivitesine bağlı olduğu kabul edilmektedir. COX aynı zamanda, prostaglandin sentaz (PGS), prostaglandin endoperoksit sentaz (PGTS) ya da prostaglandin G/H sentaz (PGHS) olarak da isimlendirilir.

Ovulasyonda COX yolağının rolü iyi tanımlanmıştır. Ovulasyonun mürin modelinde, follikül rüptüründe, kumulus ekspansiyonunda PTGS2 ve PGE2-EP2 sinyal yolağı önemli rol oynamaktadır (Hizaki ve ark., 1999; Matsumoto ve ark., 2001; Ochsner ve ark., 2003; Sirois ve ark., 2004). PTGS2 ve PGE2-EP2 sinyal yolağının farmakolojik ya da genetik inhibisyonu potansiyel olarak ovulasyonun baskılanması ile sonuçlanır (Espey ve ark., 1980; Tanaka ve ark., 1991; Lim ve ark., 1997; Mikuni ve ark., 1998).

Potansiyel olarak inflamatuvar reaksiyonların başlamasında rol oynaması nedeniyle, COX primer olarak non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçların (NSAID) hedefidir.

2.7.2. Cox-1

Homeostatik fonksiyonlarda sürekli prostaglandinlerin sentezinden sorumlu esas form olarak tanımlanır (Smith ve ark., 2000). Yapısı ilk olarak koyunlarda tanımlansa da sonrasında birçok memeli formunda tanımlanmıştır. COX-1; 9. kromozomda q32 – q33.3 bölgeleri arasında lokalize olup, 22 kilo baz 11 ekson içermektedir. mRNA transkripti ise 2.8 kb. olarak 600-602 amino asit kodlar (Tanabe

ve Tohnai, 2002). Cox-1 bir çok dokuda konstitutif olarak ekspresyon gösterir. Genellikle bu enzimin “house-keeping” formu olarak tanımlanır ve rutin platelet migrasyonu ile gastrik asit salgısının düzenlenmesinde görevlidir.

2.7.3. Cox-2

COX-2 bir çok dokuda tespiti mümkün olmayan ekspresyon düzeylerinde olmasına karşın, inflamatuvar ya da patolojik bir stimülasyon ile indüklenebilir ve eksprese edilir. (Smith ve ark., 2000). COX-2 DNA yapısı ile COX-1 genine göre daha kompakt bir yapıdadır. COX-2; 1. kromozomda q25.2 – q25.3 bölgeleri arasında lokalize olup, 8.3 kilo baz 10 ekson içermektedir. mRNA traskripti ise 4.4 kb. olarak 606 amino asit kodlar (Tanabe ve Tohnai, 2002). Cox-2 ekspresyonu, salındığı hücrelerde spesifik bir uyarın tarafından indüklenir. Bu nedenle siklooksijenazların indüklenebilir formu olarak tanımlanır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi Embriyoloji Laboratuvarı ve İmmünoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışma öncesinde Uludağ Üniversitesi Etik Kurulunca 29.09.2015 tarih ve 2015-17/14p sayılı kararla çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca olmadığına karar verildi. Hastalardan çalışmaya katılımları için sözlü bilgilendirmeye ek olarak, gönüllü / hasta katılım formları ile onam alındı.

Çalışma kapsamında, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezinde Eylül 2015 – Mayıs 2016 tarihleri arasında gerçekleştirilen rutin döngülerden 75 adet yardımcı üreme döngüsü incelenerek, 32 döngü çalışma kapsam ve kriterlerine uygun bulunarak örnek alınmasına hasta onamı sonrasında karar verildi.

3.1. Hasta Popülasyonu ve Gruplar

Çalışma kapsamında Uludağ Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AbD Üreme Sağlığı ve İnfertilite Polikliniğine başvuran ve infertilite teşhisi konularak üremeye yardımcı tedavi uygulamasına alınan, infertilite etyolojisi ağır endometriyozis, ağır oligoastenoteratozoospermi ya da azospermi dışında kalan ve 39 yaş ve altındaki kadın hastalar gönüllü olmaları durumunda çalışmaya dahil edildi. İnfertilite sebebi olarak görülen etyolojiler ile beraber vücut kütle indeksi, endokrin profil, uygulanan tedavi yöntemi ve dozu gibi klinik parametrelerde analiz edilmek üzere kayıt altına alındı.

Çalışma kapsamında elde edilen oosit örneklerinin matürasyon basamaklarına göre, hastalara ait numuneler 2 farklı deney grubu ve kontrol grubu olarak ayrıldı.

Grup 1; immatür oosit (metafaz I ve germinal vezikül aşamasında) ve oositi çevreleyen kumulus hücreleri, serum ve follikül sıvısı (n= 10)

Grup 2; matürasyonunu tamamlamış (metafaz II aşamasında), fakat fertilizasyonu gerçekleşmeyen oosit ve oositi çevreleyen kumulus hücreleri, serum ve follikül sıvısı (n= 16)

Grup 3 (Kontrol grubu); matürasyonunu tamamlamış metafaz II aşamasında olup, fertilizasyonu gerçekleşen oositler embriyo gelişimi nedeniyle çalışma kapsamına alınmadı. Bu oositlerin içinde bulunduğu follikül sıvısı, oositleri çevreleyen kumulus hücreleri ve oositin elde edildiği hastanın kan serum örneği kontrol grubunu oluşturdu (n= 26) (Tablo: 1).

Tablo 1: Gruplara göre örnek dağılımı

	Serum	Follikül Sıvısı	Oosit	Kumulus Hücresi
Grup 1 (İmmatür)	10	10	10	10
Grup 2 (Matür)	16	16	16	16
Grup 3 (Kontrol Grubu)	26	26	-	26

3.2. Ovaryan Stimülasyon Protokolü

Ovaryan stimülasyon protokolünün seçiminde, hasta karakteristik özelliklerine uygun olarak belirlenen dozda rekombinant FSH (r-FSH) uygulamasını takiben, GnRH antagonist ya da agonist uygulaması ile hipofizer baskılama yapıldı. Follikül boyutları günlük ya da iki günde bir transvajinal ultrason (TVUSG) aracılığı ile ölçülerek değerlendirildi. Follikül çapı en az 18 mm olan bir ya da birden çok follikül gözlemlenmesini takiben, final oosit matürasyonunu gerçekleştirmek amacıyla, en yüksek doz r-FSH uygulanmasından 36 saat sonra ovulasyon indüksiyonu için 6500 IU rekombinant hCG ya da 100 mg/ml leuprolide asetat GnRH agonist uygulaması yapıldı.

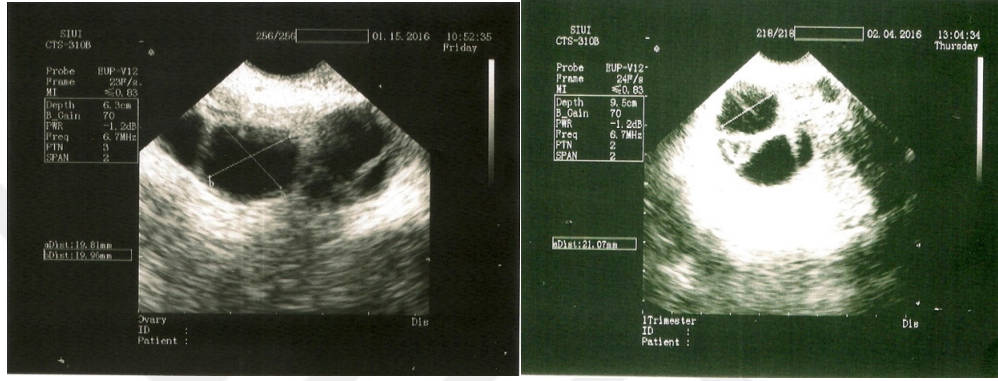
3.3. Serum, Folliküler Sıvı ve Oosit Eldesi

Oosit toplama işlemi (OPU) saati hCG uygulamasını takiben 36. saat olarak belirlendi. OPU günü hastalardan ortalama 7cc venöz kan alımı yapıldı. Elde edilen kan örnekleri 30-60 dakika 37°C sıcaklığında etüv içerisinde koagülasyonun gerçekleşmesi için bekletildi. Bu işlemi takiben 12.000xG hızında 15 dakika santrifüj edildi ve serum eldesi gerçekleştirildi. Elde edilen serum örnekleri etiketlenerek çalışma zamanına kadar -80 °C de saklandı.

İntravenöz sedasyon altında transvajinal ultrason kılavuzluğu ile OPU yapıldı. OPU işleminde, vajen sağ ve sol arka duvarından ultrason probu ile birlikte 18 mm çaplı gauge iğne aracılığı ile sağ ve sol ovaryum folliküllerine girildi. Ovaryumda ulaşılabilen folliküllere 110-120 mmHg basınç uygulanarak follikül sıvısı ve oosit aspirasyonu gerçekleştirildi. Herbir ovaryumda elde edilen ilk follikül sıvısı ve oosit çalışma kapsamında değerlendirilmek üzere ayrıldı. Transvajinal ultrason yardımı ile aspire edilen folliküllerin çapları aspirasyon öncesinde ölçülerek kayıt altına alındı (Şekil 6). Antrum içerisindeki follikül sıvısını ve oosit-kumulus kompleksini (OCC) içeren aspirat stereomikroskop altında incelenerek, OCC follikül sıvısından pipetle ayrıldı. OCC, üzeri parafin yağ (Ovoil) ile kaplı dış ortam medyumu içine alınarak (G-MOPs medium) yıkanması gerçekleştirildi ve inkübatör içine alınana kadar laboratuvar ortamında OPU işlemi bitene kadar bekletildi. OPU işlemi tamamlandıktan sonra toplanan OCC'leri üzeri parafin yağ ile kaplı fertilizasyon medyumu (G-IVF medium) içeren işaretli kültür kaplarına ayrı ayrı taşınarak, 2-4 saat 37°C'de, %98 nem, %5 O₂ ve %7 CO₂ içeren inkübatör ortamında bekletildi.

Çalışmaya alınan ve numaralandırılmış OCC'nin içinde bulunduğu follikül sıvıları ayrı ayrı diğer hücre ve sıvılardan izole edilmesi için 1600xG hızında 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar etiketlenerek ELİZA işlemine kadar -80 °C de saklandı.

Bu kapsamda OPU işleminin sürecinde hasta kan serumu, OCC'leri ve oositin mikro çevresini oluşturan follükül sıvılarının kontrol ve deney gruplarını oluşturmak üzere toplanma aşaması gerçekleştirildi.



Şekil 6: TVUSG follükül çap ölçümü

3.4. Oosit Nükleer Matürasyon Değerlendirmesi ve İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

OPU işleminin ardından matürasyonunu tamamlaması için fertilizasyon medyumunda 2-4 saat inkübe edilen OCC'leri inkübatör dışına alınarak pipet yardımıyla kumulus hücreleri ve oosit-korona hücrelerinin birbirinden mekanik olarak ayrılması gerçekleştirildi. Oosit-korona hücreleri %2 hyaluronik asit içeren dış ortam medyumunda pipetlenerek kimyasal ve mekanik olarak oositin etrafındaki follükül hücrelerinden tamamıyla ayrılması sağlandı (denudasyon işlemi). Mekanik olarak ayrılan kumulus hücreleri etiketlenmiş dış ortam medyumunu içeren ependorflara alınarak -80 °C de saklandı.

Denudasyon sonrasında tüm oositlerin inverted mikroskop altında nükleer matürasyon aşamaları tayini yapıldı. Oositlerin nükleer matürasyonu 1. kutup cisimciği ve germinal vezikül varlığı dikkate alınarak değerlendirildi.

- Ooplazmasında germinal vezikül içeren oositler GV aşamasında immatür oosit olarak kaydedildi.

- GV yıkımı gerçekleşmiş, ooplazmada çekirdeğin görülmediği, aynı zamanda perivitellin aralıkta 1. kutup cisimciğinin görülmediği oositler metafaz I aşamasında immatür oositler olarak kaydedildi.

- Ooplazmasında GV görülmeyen ve perivitellin aralıkta 1. kutup cisimciğinin görüldüğü oositler matür, metafaz II aşamasında oositler olarak kaydedildi.

Nüklear matürasyon sürecinde I. mayozunu tamamlamış, II. mayozun metafaz II aşamasında olan oositlere ICSI yapıldı. Elde edilen Metafaz-I ve GV aşamasındaki oositler ise matürasyonlarının tamamlanması için 18-24 saat süreyle kültür ortamında bekletildi. İnkübasyon öncesi GV yada metafaz I aşamasında olup, inkübasyon sonrasında metafaz II aşamasına ulaşan oositlere ICSI (OPU sonrası 2. gün) uygulandı. İnkübasyon sonrasında halen perivitellin aralığında 1. kutup cisimciği görülmeyen metafaz I aşamasındaki oositlere de, fertilizasyonun gerçekleşmesi mümkün olduğu için ICSI uygulandı. İnkübasyon sonrası GV aşamasında kalan (Grup 1), metafaz I aşamasında olup ICSI sonrası döllenmeyen (Grup 1) ve metafaz II aşamasında olup ICSI sonrası döllenmeyen (Grup 2) oositler çalışma kapsamına alındı. Oositler dış ortam medyumunu içeren ependorflara alınarak, -80 °C de saklandı. Metafaz II aşamasında olup, ICSI sonrası dölenen oositlerin hasta kan serumu, kumulus hücreleri ve follikül sıvıları çalışma kapsamına alındı (Kontrol grubu).

3.5. RNA İzolasyonu

Çalışma kapsamında örnek eldesi gerçekleştiren 32 hastanın 52 ayrı kumulus örneğinin, 10 immatür oosit, 16 fertilize olmayan oosit olmak üzere toplam 26 oositinin “Quick-RNA TM MicroPrep” (katalog no:R1051, ZYMO RESEARCH CORP., U.S.A) ticari kit yardımı ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Tüm örnekler, dondurulup çözme sonrasında 500xG hızında 3 dakika santrifüj edildi, hücrelerin pellet olarak toplanması sağlandı ve dondurma solüsyonu uzaklaştırıldı. Kit

içeriğindeki lizis ve yıkama tamponlarına ek olarak, DNase I enzimi uygulaması üretici firmanın protokolü takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.6. RNA Saflık Tayini

Örneklerin RNA'ları 15 µl RNaz-free su içerisinde elde edilmiş olup, saflıkları 260 nm'de RNA'nın ve 280 nm'de DNA ve proteinin vermiş olduğu absorbans ölçüldü. 260nm/280nm absorbans oranından RNA saflığı saptandı. O.D. 260/ O.D. 280 oranı 1,7-1,8 olarak okunan RNA'lar saf olarak kabul edildi.

3.7. cDNA Eldesi

Saflık tayini sonrasında, uygun olan örneklerin "SensiFAST cDNA Synthesis Kit" (katolog no: BIO-65053, BIOLINE LIFE SCIENCE COMP., U.S.A) ticari kit yardımı ile cDNA eldesi gerçekleştirildi. Her örnek için, 5X TransAMP Buffer 4µl Reverse Trascriptase enzimi 1µl, 100 ng/µl olacak şekilde örnek miktarı ve toplam reaksiyon hacimi 20 µl' ye dH₂O ile tamamlandı. Enzim aktivasyon koşulları olarak; 25°C'de 10 dakika – ilk bağlanma, 42°C'de 15 dakika – revers transkripsiyon, 85°C'de 5 dakika – enzim inaktivasyonu ve 4°C'de reaksiyon sonlanması olarak kit üretici firma protokolü uygulandı. Elde edilen cDNA örnekleri çalışma zamanına kadar -20°C'de saklandı.

3.8. RT - PZR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Elde edilen cDNA örneklerinden, Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kumulüs hücreleri tek ve oositler çift tekrarlı olmak üzere KISS1, KISS1R ve COX-2 genleri çalışıldı. "The SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit" (katolog no: BIO-92020, BIOLINE LIFE SCIENCE COMP., U.S.A) ticari kit yardımı ile gen ekspresyon analizi SYBR Green probları ile gerçekleştirildi. Kit içeriğinde yer alan; 2x SensiFAST SYBER Hi-ROX Mix 10µl, 10µM konsantrasyonunda olarak şekilde Forward ve Revers Primerler (0,4 µl), cDNA örneği ve toplam reaksiyon hacmi 10 µl' ye dH₂O ile tamamlandı. Primer dizaynı Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2: Genlere ait primerler dizaynları

Gen	Primer Dizi Bilgisi	Beklenen Gen Ürünü
KISS1 (NM_002256.3)	Forward - 5'- CCACTTTGGGGAGCCATTAG-3'	295 baz çifti
	Reverse- 5'- CCAGTTGTAGTTCGGCAGGTC-3'	
KISS1R (NM_032551.4)	Forward- 5'- GGACGTGACCTTCCTCCTGT-3'	166 baz çifti
	Reverse - 5'- GTACCAGCGGTCCACACTCA-3'	
COX-2 (NM_000963.3)	Forward - 5'- GTTCCACCCGCAGTACAGAA -3'	106 baz çifti
	Reverse - 5'- AGGGCTTCAGCATAAAGCGT -3'	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (NM_001289746.1)	Forward - 5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	185 baz çifti
	Reverse - 5'- GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'	

Hazırlanan reaksiyon karışımı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmek üzere, 96 örnek analizi gerçekleştirilebilen şeffaf kuyucuklar içeren plakaya yüklendi. “The LightCycler® 480 Real-Time PCR System” (Roche Ltd., Switzerland) kullanılarak örneklerin yüklendiği plakalarda enzimatik reaksiyon ve 465-510 nm dalga boyunda ölçümler ile prob ışınma oranına bağımlı olarak ekspresyon seviye tayini gerçekleştirildi. Enzim aktivasyon koşulları olarak; 95°C’de 2 dakika – polimer aktivasyonu, 95°C’de 5 saniye – denatürasyon, 65°C’de 20 saniye – polimer bağlanma ve uzama olarak 40 tekrarlayan döngü kit üretici firma protokolü uygulandı. Tüm örnekler ayrı olarak KISS1, KISS1R ve COX-2 genleri gen ekspresyon seviyesi, referans gen olan “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – (GADPH)” ekspresyonuna göre göreceli olarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplandı.

3.9. ELISA

Serum ve folliküler sıvıda; kisspeptin (katalog no:201-12-4106, Sunred Biological Technology, Sangay), kisspeptin reseptörü (katalog no:201-12-4107, Sunred Biological Technology, Sangay) ve siklooksijenaz – 2 (katalog no:201-12-

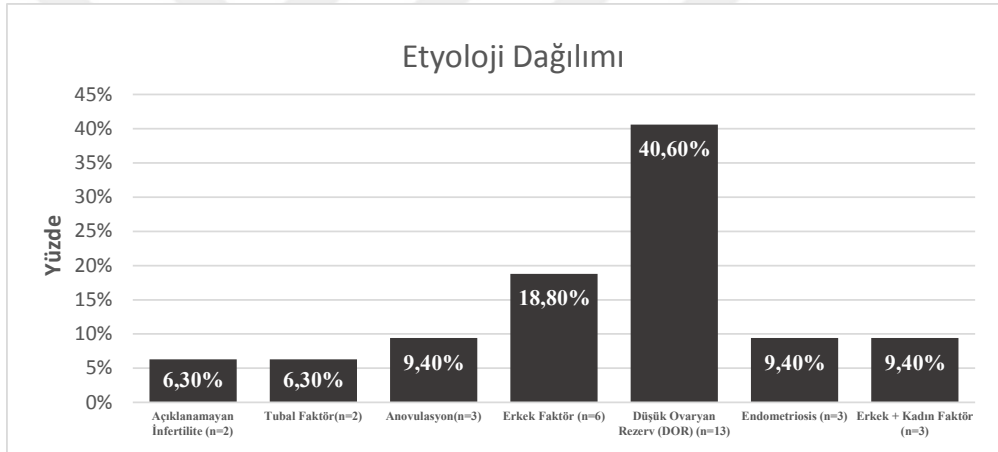
0781, Sunred Biological Technology, Sangay) seviyeleri, “enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)” yöntemine dayanan ticari kitlerle üretici önerilerine göre ölçüldü. Bu prosedürde, örnekler ve standartlar antikorları ile kaplanmış ELİZA plak çukurlarına mikropipet aracılığı ile yüklendi. Tüm örnekler biyotin işaretli antikor solüsyonu ve onu takiben streptavidin-HRP yüklemesi yapılarak 1 saat 37 °C de karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kit içerisindeki yıkama solüsyonu ile 5 defa tüm örnekler yıkandı. Kromojen substrat solüsyonlarının eklenmesinin ardından, örnekle 450 nm dalga boyu ile optik dansiteleri ölçüldü. Örneklerdeki analit konsantrasyonu standart eğriye göre hesaplandı. KISS1, KISS1R ve COX-2 Elisa kitlerinin sırasıyla sensitivitesi 4.776 pg/ml, 0,175 ng/ml, 2,125 U/L ; ölçüm aralığı 5-1500pg/ml, 0,2-60 ng/ml, 3-1000 U/L ; çalışma içi CV <10, <10, <8; çalışmalar arası CV <12, <12, <11 idi.

3.10. İstatistiksel Yöntem

Verinin istatistiksel analizi SPSS23.0 istatistik paket programında yapıldı. Verinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler medyan, minimum, maksimum ve standart sapma değeri olarak belirtildi. Normal dağılım göstermeyen veri için gruplar arasında karşılaştırmasında Kruskal-Wallis testi, grup içi karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen veri için kolerasyon analizinde Spearman’s Rho testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak belirlendi.

4.BULGULAR

Çalışma kapsamında örnek toplanmasına karar verilen ve onam alınan toplamda 32 hastadan; 32 kan serum örneği, 52 follükül sıvısı, 52 farklı kumulus hücre topluluğu ile 10 immatür ve 16 matür- fertilizasyonu gerçekleşmeyen toplam 26 oosit değerlendirildi. Hasta karakteristik özellikleri arasında temel parametre olan infertilite etyolojisi dağılımı Grafik 1’ de gösterildi. Açıklanamayan infertilite olguları %6,3; tubal faktör %6,3; anovulasyon %9,4; endometriosis %9,4; erkek ve kadın faktör %9,4; erkek faktör %18,8 ve düşük ovaryan rezerv (DOR) %40,6 oranlarında dağılım gösterdi.



Grafik 1: Hasta İnfertilite Etiyolojileri Dağılım Yüzdesi

4.1. Hasta Karakteristik Özellikleri Dağılımı

Hasta yaşı, vücut kütle indeksi (BMI), bazal endokrin parametreleri, uygulanan tedavi protokolüne yanıt olarak elde edilen ortalama oosit sayısı ve ortalama matür oosit sayısı dağılımı ve gruplar arasındaki değerlendirme (p-değeri) Tablo 3’de verildi.

Hasta yaş aralığı minimum 24, maksimum 39 olup, ortalama 31,87 olarak bulundu. Ortalama BMI 25,87±5,29; AMH seviyesi 2,39±2,37 ng/dl ve antral

follikül sayısı $8,73\pm 4,07$ 'di. Bazal endokrin seviyelerine bakıldığında (menstrual döngünün 3. günü) FSH düzeyi $5,63\pm 1,9$ mIU/ml; LH düzeyi $5,05\pm 2,19$ mIU/ml; E2 $52,1\pm 38,20$ ng/mL ve ovulasyon indüksiyon günü E2 düzeyi $1394,87\pm 1047,24$ ng/mL olarak saptandı. Ovaryan stimülasyon protokolü için kullanılan ortalama gonadotrophin dozu $240,32\pm 76,56$ U olup, stimülasyonu takiben elde edilen ortalama toplam oosit sayısı $10,74\pm 7,57$ ve ortalama matür oosit sayısı ise $7,8\pm 5,65$ olarak hesaplandı. Grup 1 ve Grup 2 arasında hem ortalama toplam oosit sayısı ($p=0,01$), hem de ortalama matür oosit sayısı ($p=0,003$) bakımından Grup 2 lehine istatistiksel anlamlılık görüldü. Matür oosit sayısının toplam oosit sayısına oranı ise $0,7\pm 0,27$ olarak belirlendi. ICSI yapılan oositlerde total fertilizasyon oranı $0,628\pm 0,319$ olarak hesaplandı (Tablo 3).

Tablo 3: Hasta Karakteristik Özellikleri Dağılımı

Hasta Karakteristik Özellikleri	Değer (min. – max.)	Standart sapma	p değeri			
			Gruplar arası	G1-G2	G1-G3	G2-G3
Yaş	31,87 (24-39)	3,86	0,788	0,953	0,626	0,518
BMI	25,87 (16,30-37,40)	5,29	0,404	0,19	0,319	0,747
AMH (ng/dl)	2,39 (0,01-8,4)	2,37	0,987	0,927	0,871	0,936
Antral Follikül Sayısı	8,73 (1-16)	4,07	0,673	0,529	0,381	0,763
FSH (mIU/ml)	5,63 (3,00-10,5)	1,9	0,823	0,798	0,782	0,536
LH (mIU/ml)	5,05 (1,60-11,30)	2,19	0,671	0,521	0,934	0,41
E2 (ng/mL)	52,1 (10-201)	38,20	0,128	0,045*	0,257	0,302
Ovulasyon İndüksiyon Günü E2 (ng/mL)	1394,87 (86-5000)	1047,24	0,124	0,045*	0,13	0,579
Ortalama Gonadotrophin Dozu (Unite)	240,32 (75-375)	76,56	0,343	0,461	0,332	0,172
Ortalama toplam oosit sayısı (OS)	10,74 (1-32)	7,57	0,01*	0,03*	0,013	0,743
Ortalama toplam matür oosit sayısı (MOS)	7,8 (0-22)	5,65	0,009*	0,003*	0,1	0,583
Ortalama MOS / OS	0,7 (0-1)	0,27	0,792	0,086	0,053	0,658
Fertilizasyon Oranı	0,628 (0-1)	0,319	0,125	0,643	0,863	0,548

* p< 0.05 anlamlı

4.2. Folliküler Ortalama Çap

OPU işlemi öncesinde transvaginal ultrason yardımı ile aspire edilen folliküllerin ortama çapları Tablo 4' de verildi. Örneklerin elde edildiği ortalama follikül çapları 19,65 mm olup, gruplara göre değerlendirildiğinde Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için sırasıyla 18mm±1,84; 20,6mm±1,96; 19,65mm±1,46 olarak hesaplandı.

Grup 1- Grup 2 ($p<0,001$) arasında Grup 2 lehine ve Grup 1- Grup 3 ($p=0,007$) arasında ise Grup 3 lehine istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi.

Tablo 4: Follikül Ortalama Çapları

Follikül Çapı (mm)	Ortalama değer (min. – max.)	Standart sapma	p değeri (Gruplar Arası)	p değeri (İkili karşılaştırma)		
				G1-G2	G1-G3	G2-G3
Grup1	18 (14-20)	1,84	0,001*	<0,001*	0,007*	0,051
Grup2	20,6 (17-24,5)	1,96				
Grup3	19,65 (17-22)	1,46				

* $p<0.05$ anlamlı

Örneklerin elde edildiği ortalama follikül çapları ile folliküler sıvı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının gruplar arasındaki korelasyonu Tablo 5’de verildi. Follikül sıvısındaki Kiss1 konsantrasyonu ile follikül çapları arasında Grup 1 (KF: -0,055; $p=0,88$) ve Grup 2’de (KF: 0,087; $p=0,748$) korelasyon görülmedi. Ancak, follikül çapları Grup 3 (KF: 0,555; $p=0,003$) Kiss1 konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdi. Benzer şekilde follikül sıvısındaki Kiss1R konsantrasyonu ile follikül çapları arasında Grup 1 (KF: -0,152; $p=0,674$) ve Grup 2’de (KF: -0,2; $p=0,459$) korelasyon görülmedi. Ancak, follikül çapları Grup 3 (KF: 0,435; $p=0,026$) Kiss1R konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdi. Buna ek olarak; follikül sıvısı Cox-2 konsantrasyonu ile follikül çapları arasında Grup 1 (KF: 0,128; $p=0,724$) ve Grup 2’de (KF: 0,043; $p=0,875$) korelasyon görülmedi. Ancak, follikül çapları Grup 3 (KF: 0,414; $p=0,035$) Cox-2 konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdi.

Tablo 5: Gruplara göre follikül çapı ile follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının korelasyonu

Follikül Çapı (mm)	Kiss1		Kiss1R		Cox-2	
	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri
Grup 1	-0,055	0,88	-0,152	0,674	0,128	0,724
Grup 2	0,087	0,748	-0,2	0,459	0,043	0,875
Grup 3	0,555*	0,003	0,435*	0,026	0,414*	0,035

*Korelasyon faktörü için : $p<0.05$ anlamlı

4.3 Serum ve Follikül Sıvısı Sonuçları

Çalışma kapsamında değerlendirilen örneklerden elde edilen serum ve folliküler sıvılardaki Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları Tablo 6' da verildi. Serum seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları sırasıyla; 178,89 pq/mL (84,80-739,29); 9,31 ng/mL (1,42-28,23) ve 208 u/L (84,23-645,88) olarak tayin edilirken; folliküler sıvı seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları sırasıyla; 237,77 pq/mL (136,26-690,78); 8,91 ng/mL (1,75-28,46) ve 201,94 u/L (83,96-626,88) olarak belirlendi.

Tablo 6: Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

ELİZA	Serum Konsantrasyonu (min-max)	Folliküler Sıvı Konsantrasyonu (min-max)
Kiss1 (pq/mL)	178,89 (84,80-739,29)	237,77 (136,26-690,78)
Kiss1R (ng/mL)	9,31 (1,42-28,23)	8,91 (1,75-28,46)
Cox-2 (u/L)	208 (84,23-645,88)	201,94 (83,96-626,88)

Serum seviyesinde tüm örneklerin Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyon analizinde; Kiss1 konsantrasyonunun, Kiss1R (KF:0,474; p=0,007) ve Cox-2 (KF:0,662; p<0,001) konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği saptandı. Kiss1R konsantrasyonu ile Cox-2 konsantrasyonu (KF:0,570; p<0,001) arasında pozitif korelasyon görüldü (Tablo 7).

Tablo 7 : Serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

SERUM	Kiss1		Kiss1R		Cox-2	
	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri
Kiss1	-	-	0,474*	0,007	0,622*	<0,001
Kiss1R	0,474*	0,007	-	-	0,570*	0,001
Cox-2	0,622*	<0,001	0,570*	0,001	-	-

*Korelasyon faktörü için : p< 0.05 anlamlı

Serum ve folliküler sıvılardaki Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları çalışma gruplarına göre değerlendirildi. Ortalama serum Kiss1 konsantrasyonu Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için sırasıyla; 201,53 (153,31-479,09); 187,12 (155,37-739,29);

172,86 (84,80-618,45) pq/mL olarak saptanmış olup, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark görülmedi ($p=0,301$). Serum Kiss1R konsantrasyonları ise Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için sırasıyla; 6,47 (1,42-13,66); 8,03 (3,09-28,23); 7,59(2,35-21,35) ng/mL şeklinde saptanmış olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,382$). Serum Cox-2 konsantrasyonu sırasıyla Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için; 165,48 (141,47-371,52); 155,98 (128,81-645,88); 149,52 (83,23-495,5) u/L olarak saptandı ve istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark görülmedi ($p=0,426$) (Tablo 8).

Tablo 8: Gruplar arasında serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

SERUM	Grup 1 Konsantrasyonu (min-max)	Grup 2 Konsantrasyonu (min-max)	Grup 3 Konsantrasyonu (min-max)	p değeri
Kiss1 (pq/mL)	201,53 (153,31-479,09)	187,12 (155,37-739,29)	172,86 (84,80-618,45)	0,301
Kiss1R (ng/mL)	6,47 (1,42-13,66)	8,03 (3,09-28,23)	7,59 (2,35-21,35)	0,382
Cox-2 (u/L)	165,48 (141,47-371,52)	155,98 (128,81-645,88)	149,52 (83,23-495,5)	0,426

* $p < 0,05$ anlamlı

Serum seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının grup içindeki korelasyon analizinde; Grup 1’de Kiss1 konsantrasyonu, Kiss1R (KF: 0,286; $p=0,535$) ve Cox-2 (KF: 0,143; $p=0,76$) konsantrasyonu ile, Kiss1R konsantrasyonu ile Cox-2 (KF: 0,429; $p=0,337$) konsantrasyonu ile korelasyon göstermedi. Grup 2’de Kiss1 konsantrasyonu; Kiss1R (KF: 0,577; $p=0,039$) ve Cox-2 (KF: 0,604; $p=0,029$) konsantrasyonu ile, Kiss1R konsantrasyonu Cox-2 (KF: 0,665*; $p=0,013$) konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdi. Grup 3’de Kiss1 konsantrasyonu; Kiss1R (KF:0,34; $p=0,279$) konsantrasyonu ile korelasyon göstermezken, Cox-2 (KF: 0,688; $p=0,013$) konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdi. Kiss1R konsantrasyonu ile Cox-2 (KF:0,668; $p=0,013$) konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon görüldü (Tablo 9).

Tablo 9: Grup içi serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

	Serum	Kiss1		Kiss1R		Cox-2	
		Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri
Grup 1	Kiss1	-	-	0,286	0,535	0,143	0,76
	Kiss1R	0,286	0,535	-	-	0,429	0,337
	Cox-2	0,143	0,76	0,429	0,337	-	-
Grup 2	Kiss1	-	-	0,577*	0,039	0,604*	0,029
	Kiss1R	0,577*	0,039	-	-	0,665*	0,013
	Cox-2	0,604*	0,029	0,665*	0,013	-	-
Grup 3	Kiss1	-	-	0,34	0,279	0,688*	0,013
	Kiss1R	0,34	0,279	-	-	0,650*	0,022
	Cox-2	0,688*	0,013	0,650*	0,022	-	-

*Korelasyon faktörü için : p< 0.05 anlamlı

Foliküler sıvı seviyesinde tüm örneklerin Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının korelasyon analizinde; Kiss1 konsantrasyonu, Kiss1R (KF:0,605; p<0,001) ve Cox-2 (KF:0,615; p<0,001) konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdi. Kiss1R konsantrasyonu ile Cox-2 konsantrasyonu (KF:0,529; p=0,000) arasında pozitif korelasyon görüldü (Tablo 10).

Tablo 10: Follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

Foliküler Sıvı	Kiss1		Kiss1R		Cox-2	
	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri
Kiss1	-	-	0,605*	<0,001	0,615*	<0,001
Kiss1R	0,605*	<0,001	-	-	0,529*	<0,001
Cox-2	0,615*	<0,001	0,529*	<0,001		

*Korelasyon faktörü için : p< 0.05 anlamlı

Foliküler sıvı Kiss1 konsantrasyonu Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için sırasıyla; 193,59 (153,31-387,94); 186,24 (164,48-690,78); 185,80 (136,26-580,82) pq/mL olarak saptanmış olup, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark görülmedi

(p=0,862). Folliküler sıvı Kiss1R konsantrasyonları Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için sırasıyla; 8,19 (6,53-14,76); 7,24 (4,19-28,46); 7,95 (1,75-23,17) ng/mL şeklinde saptanmış olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (p=0,260). Folliküler sıvı Cox-2 konsantrasyonu sırasıyla Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için; 162,18 (126,17-291,58); 156,51 (138,31-626,88); 163,63 (83,96-484,83) u/L olarak saptandı ve istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark görülmedi (p=0,504) (Tablo 11).

Tablo 11: Gruplar arasında follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

Folliküler Sıvı	Grup 1 Konsantrasyonu (min-max)	Grup 2 Konsantrasyonu (min-max)	Grup 3 Konsantrasyonu (min-max)	P değeri
Kiss1 (pg/mL)	193,59 (153,31-387,94)	186,24 (164,48-690,78)	185,80 (136,26-580,82)	0,862
Kiss1R (ng/mL)	8,19 (6,53-14,76)	7,24 (4,19-28,46)	7,95 (1,75-23,17)	0,260
Cox-2 (u/L)	162,18 (126,17-291,58)	156,51 (138,31-626,88)	163,63 (83,96-484,83)	0,504

* p< 0.05 anlamlı

Folliküler sıvı seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının grup içindeki korelasyon analizinde; Grup 1’de Kiss1 konsantrasyonu, Kiss1R (KF: 0,685; p=0,029) konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdi, fakat Cox-2 (KF:0,527; p=0,117) konsantrasyonu ile korelasyon saptanmadı. Kiss1R konsantrasyonu ile Cox-2 (KF:0,552; p=0,098) konsantrasyonu arasında korelasyon görülmedi. Grup 2’de Kiss1 konsantrasyonu; Kiss1R (KF: 0,646; p=0,007) ve Cox-2 (KF: 0,519; p=0,039) konsantrasyonu ile, Kiss1R konsantrasyonu Cox-2 (KF: 0,519; p=0,039) konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdi. Grup 3’de Kiss1 konsantrasyonu; Kiss1R (KF: 0,640; p<0,001) ve Cox-2 (KF: 0,714; p<0,001) konsantrasyonu ile, Kiss1R konsantrasyonu Cox-2 (KF: 0,557; p=0,003) konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdi (Tablo 12).

Tablo 12: Grup içi follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

Follikül Sıvısı		Kiss1		Kiss1R		Cox-2	
		Kolerasyon Faktörü	p değeri	Kolerasyon Faktörü	p değeri	Kolerasyon Faktörü	p değeri
Grup 1	Kiss1	-	-	0,685*	0,029	0,527	0,117
	Kiss1R	0,685*	0,029	-	-	0,552	0,098
	Cox-2	0,527	0,117	0,552	0,098	-	-
Grup 2	Kiss1	-	-	0,646*	0,007	0,519*	0,039
	Kiss1R	0,646*	0,007	-	-	0,48	0,06
	Cox-2	0,519*	0,039	0,48	0,06	-	-
Grup 3	Kiss1	-	-	0,640*	<0,001	0,714*	<0,001
	Kiss1R	0,640*	<0,001	-	-	0,557*	0,003
	Cox-2	0,714*	<0,001	0,557*	0,003	-	-

*Korelasyon faktörü için : p< 0.05 anlamlı

Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının serum ve folliküler sıvı seviyesinde karşılaştırmalı korelasyonunda istatistiksel anlamlılık görülmedi (Tablo 13).

Tablo 13: Serum ve follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

Konsantrasyon	Kiss1		Kiss1R		Cox-2	
	Kolerasyon Faktörü	p değeri	Kolerasyon Faktörü	p değeri	Kolerasyon Faktörü	p değeri
Serum / Follikül Sıvı	0,131	0,233	0,07	0,528	0,07	0,528

*Korelasyon faktörü için : p< 0.05 anlamlı

Serum seviyesinde; Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları ile çalışma kapsamında değerlendirmeleri etkileyebilecek hasta karakteristik özellikleri ve endokrin parametreleri ile korelasyon analizi gerçekleştirildi (Tablo 14). Ovulasyon induksiyonu için tercih edilen yöntem haricinde, diğer parametrelerde korelasyon görülmedi. Ovulasyon induksiyonu için uygulanan hCG enjeksiyonu sonrasında serum seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları sırasıyla; 269,41 pq/mL (84,80 – 739,29); 10,26 ng/mL (1,41 – 28,23); 221,93 u/L (84,23 – 645,88) olarak saptanmış olup, GnRH agonist uygulaması sonrasında serum seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları sırasıyla; 169,62 pq/mL (153,31–

191,24); 5,34 ng/mL (2,35 – 7,73); 160,42 u/L (144,11–207,43) olarak saptandı ve istatistiksel analiz sonrası p değerleri sırasıyla 0,074; 0,04; 0,612 olarak bulundu (Tablo 15).

Tablo 14: Serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları ile hasta karakteristik özellikleri ve endokrin parametrelerinin korelasyonu

SERUM	Kiss1		Kiss1R		Cox-2	
	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri
Yaş	0,237	0,192	0,206	0,266	0,195	0,284
BMI	-0,019	0,924	-0,081	0,676	-0,086	0,656
AMH	0,081	0,682	-0,142	0,472	-0,075	0,704
Antral Follikül Sayısı	-0,047	0,804	-0,083	0,662	-0,234	0,213
FSH	-0,143	0,442	0,093	0,625	-0,073	0,698
LH	0,009	0,963	-0,153	0,429	-0,126	0,509
E2	0,15	0,43	0,197	0,305	0,231	0,219
Ovaryan Stümulasyon Protokolü	0,095	0,61	0,14	0,459	0,125	0,504
Gonadotrophin Dozu	-0,177	0,34	0,123	0,518	0,005	0,98
Ovulasyon İndüksiyon Yöntemi	-0,321	0,073	-0,374*	0,038	-0,091	0,62
Ovulasyon İndüksiyon Günü E2	0,184	0,323	0,326	0,079	0,029	0,877
Ortalama toplam oosit sayısı (OS)	-0,141	0,45	0,045	0,815	-0,061	0,745
Ortalama toplam matür oosit sayısı (MOS)	-0,078	0,675	0,093	0,624	0,057	0,76
Ortalama MOS / OS	-0,013	0,945	0,092	0,63	0,014	0,94
Fertilizasyon Oranı	0,05	0,784	-0,038	0,839	-0,038	0,835

*Korelasyon faktörü için : p< 0.05 anlamlı

Tablo 15: Ovulasyon indüksiyon yöntemi ile serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

Ovulasyon İndüksiyonu Yöntemi	Kiss1 (pg/mL) Konsantrasyonu (min-max)	Kiss1R (ng/mL) Konsantrasyonu (min-max)	Cox-2 (u/L) Konsantrasyonu (min-max)
hCG (n=25)	269,41 (84,80 – 739,29)	10,26 (1,41 – 28,23)	221,93 (84,23 – 645,88)
GnRH agonist (n=6)	169,62 (153,31–191,24)	5,34 (2,35 – 7,73)	160,42 (144,11 – 207,43)
p değeri	0,074	0,04*	0,612

* p<0.05 anlamlı

Foliküler sıvı seviyesinde; Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının çalışma kapsamında değerlendirmelerimizi etkileyebilecek hasta karakteristik özellikleri ve endokrin parametreleri ile korelasyon analizi gerçekleştirildi. Cox-2 konsantrasyonu ile AMH konsantrasyonu (KF:-0,310; p=0,036) arasında negatif korelasyon görüldü. Kiss1R konsantrasyonu ile ovulasyon indüksiyon günü E2 konsantrasyonu arasında negatif korelasyon saptandı (KF:-0,298; p=0,037). Foliküler sıvı Kiss1 konsantrasyonu ile follikül çapı arasında pozitif korelasyon görüldü (KF:0,299; p=0,031). Foliküler sıvı Cox-2 konsantrasyonu ile ortalama MOS/OS oranı negatif korelasyon gösterdi (KF:-0,310; p=0,027) (Tablo 16).

Tablo 16: Folliküler sıvı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları ile hasta karakteristik özellikleri ve endokrin parametrelerinin korelasyonu

Folliküler Sıvı	Kiss1		Kiss1R		Cox-2	
	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri	Korelasyon Faktörü	p değeri
Yaş	0,037	0,794	-0,002	0,987	0,132	0,35
BMI	0,108	0,473	0,146	0,334	-0,075	0,619
AMH	-0,177	0,239	-0,145	0,335	-0,310*	0,036
Antral Follikül Sayısı	-0,175	0,234	-0,157	0,288	-0,204	0,164
FSH	-0,051	0,721	-0,114	0,423	0,02	0,888
LH	-0,256	0,073	-0,264	0,064	0,079	0,587
E2	-0,078	0,589	-0,136	0,348	0,08	0,581
Ovaryan Stimülasyon Protokolü	0,272	0,054	0,298*	0,034	0,039*	0,027
Gonadotrophin Dozu	0,172	0,229	0,148	0,301	0,201	0,156
Ovulasyon İndüksiyon Yöntemi	0,172	0,229	0,148	0,301	0,201	0,156
Ovulasyon İndüksiyon Günü E2	-0,128	0,379	-0,298*	0,037	-0,058	0,694
Follikül Çapı	0,299*	0,031	0,036	0,798	0,213	0,13
Ortalama toplam oosit sayısı (OS)	-0,164	0,25	-0,234	0,099	-0,182	0,2
Ortalama toplam matür oosit sayısı (MOS)	-0,138	0,333	-0,189	0,184	-0,212	0,135
Ortalama MOS / OS	-0,198	0,163	-0,162	0,257	-0,310*	0,027
Fertilizasyon Oranı	-0,183	0,194	-0,12	0,397	-0,12	0,399

*Korelasyon faktörü için : p< 0.05 anlamlı

Folliküler sıvı seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyon analizinde, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolü ile korelasyonu değerlendirildi. Tercih edilen protokole bağlı olarak folliküler sıvı seviyesinde konsantrasyon değerleri ve istatistiksel analizi Tablo 17' de verildi. KOH için flexible antagonist tedavisi uygulaması sonrasında folliküler sıvı

seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları sırasıyla; 185,18 pq/mL (162,43-212,7); 6,9664 ng/mL (1,75 9,94); 161,22 u/L (138,04-243,04) olarak bulundu. Ultralong protokol uygulaması sonrasında folliküler sıvı seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları sırasıyla; 156,98 pq/mL (152,14-161,84); 6,916 ng/mL (5,98–7,85); 118,65 u/L (83,96-153,35) olarak belirlenirken, aromataz inhibitörü tedavisi sonrasında folliküler sıvı seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları sırasıyla; 278,2059 pq/mL (136,26 - 690,787); 10,1631 ng/mL (2,71-28,46); 232,67 u/L (126,17 – 626,88) olarak hesaplandı. Kiss1 ve Cox-2 serum seviyesindeki konsantrasyonları, uygulanan KOH protokolüne göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdi (p=0,016 ve p=0,026).

Tablo 17: KOH ile folliküler sıvı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

KOH Protokolü	Kiss1 (pq/mL) Konsantrasyonu (min-max)	Kiss1R (ng/mL) Konsantrasyonu (min-max)	Cox-2 (u/L) Konsantrasyonu (min-max)
Flexible antagonist (n=21)	185,18 (162,43 -212,7)	6,966 (1,75 9,94)	161,22 (138,04-243,04)
Ultralong protokol (n=2)	156,98 (152,14-161,84)	6,916 (5,98 – 7,85)	118,65 (83,96-153,35)
Aromataz İnhibitörü (n=28)	278,20 (136,26 - 690,78)	10,16 (2,71-28,46)	232,67 (126,17 – 626,88)
p değeri	0,016*	0,081	0,026*

*: p< 0.05 anlamlı

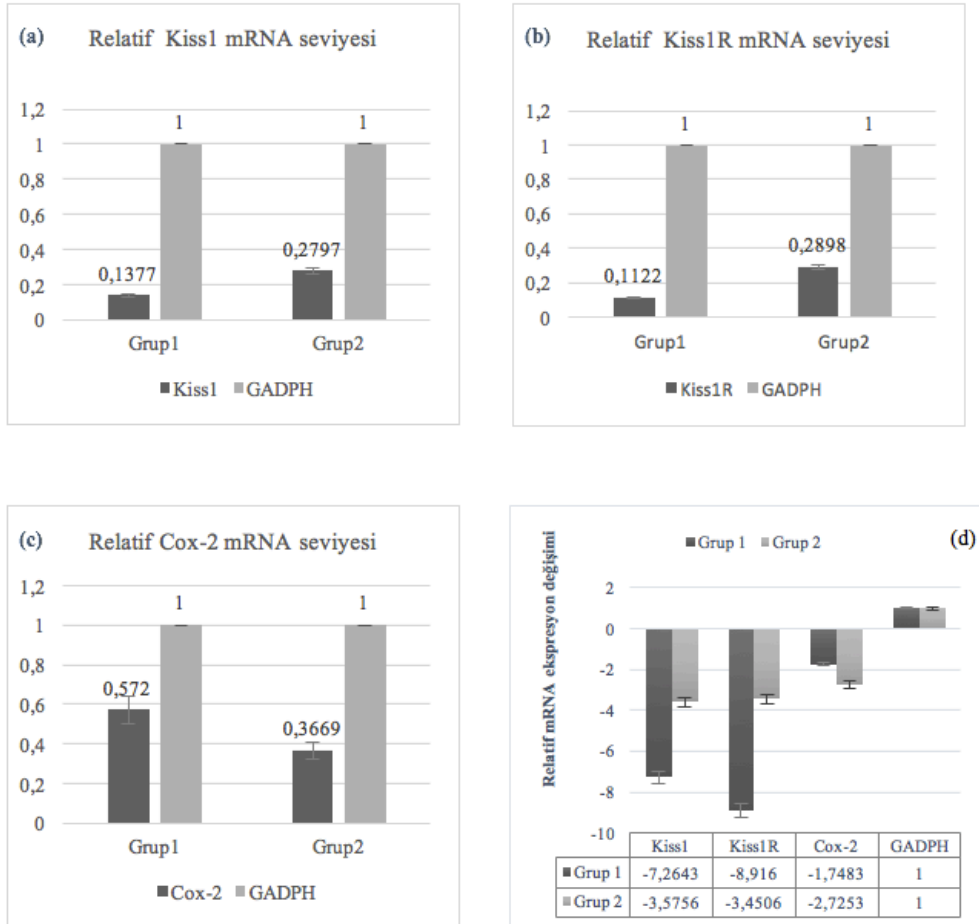
4.4 Kumulus Hücre Grupları Sonuçları

Çalışma gruplarında 10 immatür (Grup 1) oosite ait kumulus hücreleri ve 16 matür (Grup 2) fertilizasyonu gerçekleşmeyen oositlere ait kumulus hücreleri değerlendirildi. Kontrol grubu olarak 26 adet matür ve fertilizasyonu gerçekleştiren oosite ait kumulus hücrelerinin Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 ekspresyon seviyeleri değerlendirildi.

Kumulus hücrelerinde Grup 1 ve Grup 2'yi oluşturan farklı nükleer matürasyon aşamasındaki oositleri çevreleyen kumulus hücrelerinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviyeleri matür ve fertilize oositleri çevreleyen kumulus hücrelerinin oluşturduğu Grup 3'teki ekspresyon seviyeleri ile

karşılaştırıldı. Değerlendirme sonucunda elde edilen veriler Grafik 2’de , güvenilirlik değeri ve kontrol grubuna göre istatistiksel kıyaslaması (p-değeri) Tablo 18’ de verildi.

Kumulus hücrelerinde, Kiss1 mRNA ekspresyon seviyeleri Grup 3’e göre; Grup 1’de 7,26 kat (CI: 0,00001-0,50; p=0,568), Grup 2’de 3,56 kat (CI:0,00001-0,86; p=0,083) azalma gösterdi. Kiss1R mRNA ekspresyon seviyeleri Grup 3’e göre; Grup 1’de 8,91 kat (CI:0,00001-0,41; p=0,482), Grup 2’de 3,45 kat (CI: 0,00001-0,91; p=0,173) azalma gösterirken, Cox-2 mRNA ekspresyon seviyesi, Grup 1’de 1,74 kat (CI: 0,00001-1,52; p=0,394), Grup 2’de 2,72 kat (CI: 0,00001-0,77; p=0,133) azalma gösterdi (Grafik 2).



Grafik 2: Relatif Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviyeleri (a-c); Relatif Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviye değişimleri (d)

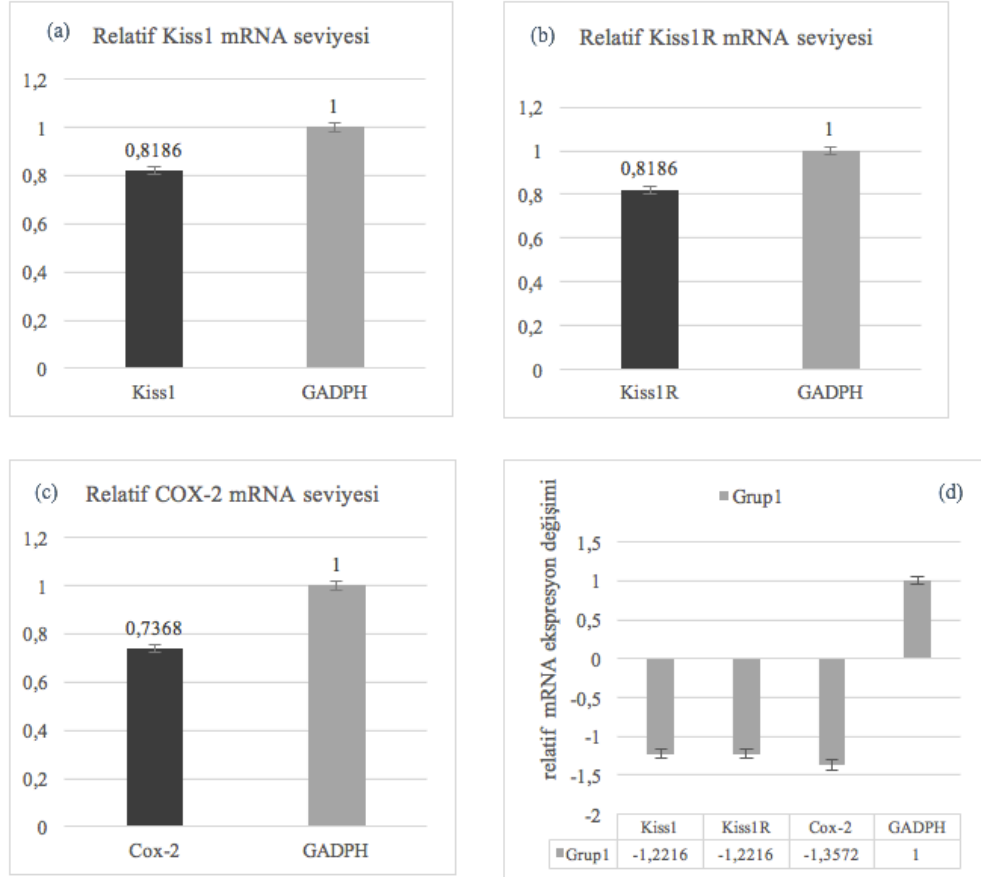
Tablo 18: Kumulus hücrelerinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 ekspresyon seviyeleri miktar, güvenilirlik değeri, p değeri

	Grup 1			Grup 2		
	Miktar	95% CI	p değeri	Miktar	95% CI	p değeri
Kiss1	0,1377	(0,00001-0,50)	0,568	0,2797	(0,00001-0,86)	0,083
Kiss1R	0,1122	(0,00001-0,41)	0,482	0,2898	(0,00001-0,91)	0,173
Cox-2	0,572	(0,00001-1,52)	0,394	0,3669	(0,00001-0,77)	0,133
GADPH	1	(1,00-1,00)	<0,001	1	(1,00-1,00)	<0,001

*: p< 0.05 anlamlı

4.5 Oosit Grupları Sonuçları

İmmatür (Grup 1) ve fertilize olmamış matür (Grup 2) oositlerde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Grup1'nin Grup2'e göre göreceli ekspresyon seviyeleri Grafik 3 'de güvenilirlik değerleri (%95 CI) ve istatistiksel analiz sonuçları (p-değeri) Tablo 19' da verildi.



Grafik 3: Relatif Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviyeleri (a-c); Relatif Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviye değişimleri (d)

Grup 2 ile karşılaştırıldığında, Grup 1’de Kiss1 mRNA ekspresyon seviyesi 1,22 kat (CI:0,02-1,62; p=0,181), Kiss1R mRNA ekspresyon seviyesi 1,22 kat (CI:0,02-1,62; p=0,181) ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviyesi 1,35 kat (CI:0,00001-1,48; p=0,174) azalma göstermiş olmakla birlikte istatistiksel anlamlılık saptanmadı (Grafik 3).

Tablo 19: Oosit Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 ekspresyon seviyeleri miktar, güvenilirlik değeri, p değeri

	Grup 1		
	Miktar	95% CI	p değeri
Kiss1	0,8186	(0,02-1,62)	0,181
Kiss1R	0,8186	(0,02-1,62)	0,181
Cox-2	0,7368	(0,00001-1,48)	0,174
GADPH	1	(1,00-1,00)	<0,001

*: p< 0.05 anlamlı

Çalışmanın bulguları başlıklar altında özetlenecek olursa:

- Çalışma kapsamında toplamda 32 hastadan elde edilen 32 kan serumu, 52 folliküler sıvısı, 52 kumulus hücre topluluğu ve 10 immatür- 16 fertilizasyonu gerçekleşmeyen toplam 26 oosit değerlendirildi.

- Çalışma grupları değerlendirilen oositlerin matürasyon aşamaları ve fertilizasyon durumları dikkate alınarak oluşturuldu. Grup 1; immatür oositler ve bu oositlere ait kan serumu, follikül sıvısı ve kumulus hücreleri (GV ve metafaz I), Grup 2; fertilize olmamış metafaz II oositler ve bu oositlere ait kan serumu, follikül sıvısı ve kumulus hücreleri, Grup 3; fertilize metafaz II oositlere ait kan serumu, follikül sıvısı ve kumulus hücrelerinden (bu grupta oositler embriyo gelişimi gerçekleştiği için değerlendirilmemiştir) oluştu.

- Elde edilen serum ve folliküler sıvılarında, Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları gruplar arasında karşılaştırıldı. Gruplar arasında serum ve follikül sıvılarında Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları istatistiksel anlamlılık

göstermedi. Serum ve follikül sıvılarındaki Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının birbirleriyle korelasyonu istatistiksel anlamlılık göstermedi.

- Serum örnekleri gruplar dikkate alınmadan değerlendirildiğinde; Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 ekspresyon seviyeleri birbirleriyle pozitif korelasyon gösterdi. Serum örneklerinin grup içinde korelasyon analizi sonuçlarında, matür oositlerde (Grup 2 ve 3) Kiss1, Kiss1R ve Cox-2'nin ekspresyon değerleri pozitif korelasyon gösterdi.

- Follikül sıvıları gruplar dikkate alınmadan değerlendirildiğinde; Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 ekspresyon seviyeleri birbirleriyle pozitif korelasyon gösterdi. Follikül sıvılarında grup içinde korelasyon analizi sonucunda, folliküler sıvı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları kıyaslandığında; Grup 1'de Kiss1 ve Kiss1R konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon görüldü. Grup 2 ve Grup 3'de Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının birbirleri ile pozitif korelasyonu gözlemlendi.

- İmmatür oositler (Grup 1) ve matür olup döllenmeyen oositlerin (Grup 2) kumulus hücrelerindeki Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviyeleri, kontrol grubu olarak değerlendirilen matürasyonunu tamamlamış ve embriyo gelişimi gerçekleşmiş oositlerin (Grup 3) kumulus hücrelerinin ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında Kiss1, Kiss1R ve Cox-2'in ekspresyon değerleri arasında istatistiksel anlamlılık görülmemekle birlikte, matür ve fertilize oositlere ait kumulus hücrelerinde Kiss1 ve Kiss1R ekspresyonları en yüksek bulundu. Kiss1 ve Kiss1R ekspresyon değerlerinin göreceli olarak matür-fertilize olmayan oositlere ait kumulus hücrelerinde ve immatür oositlerin kumulus hücrelerinde azaldığı saptandı. Kumulus hücrelerinde Cox-2 düzeyleri benzer değerler gösterdi.

- Oosit düzeyinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviyeleri sadece Grup 1 ve Grup 2'ye ait oositler arasında karşılaştırıldı. Matür oositlerle (Grup 2) karşılaştırıldığında, immatür oositlerde (Grup 1) Kiss1, Kiss1R ve Cox-2'nin ekspresyon seviyelerinde azalmakla birlikte istatistiksel anlamlılık görülmedi.

- Serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları klinik verilerle karşılaştırıldığında, ovulasyon indüksiyon yöntemi ile serum KissR1 konsantrasyonu arasında hCG uygulaması lehine istatistiksel anlamlılık görüldü.

- Folliküler sıvı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları klinik verilerle karşılaştırıldığında, folliküler sıvıdaki Cox-2 konsantrasyonu ile AMH konsantrasyonu ve follikül çapı arasında negatif korelasyon görüldü. Folliküler sıvıdaki KissR1 konsantrasyonu ile ovulasyon indüksiyon günü E2 konsantrasyonu arasında negatif korelasyon saptandı. Folliküler sıvıdaki kisspeptin konsantrasyonu ile follikül çapı arasında pozitif korelasyon görüldü. Folliküler sıvının Cox-2 konsantrasyonu ile ortalama MOS/OS oranı arasında negatif korelasyon görüldü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada serum ve folliküler sıvı düzeyinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının gösterilmesine ek olarak farklı nuklear matürasyon basamaklarındaki insan oositleri ve bu oositlere ait kumulus hücreleri seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir.

Tüm çalışma örnekleri, yardımcı üreme yöntemleri standart tedavi protokolleri uygulanarak, birden fazla follikül gelişimi uyarılan hastalardan elde edilmiştir. Doğal döngüler ile kıyaslandığında, kontrollü ovaryan stimülasyonun serum ve follikül sıvısında değişimlere sebep olup, kumulus hücreleri protein ekspresyonuna etki edebileceği düşünülmektedir (de los Santos ve ark., 2012). Ancak, insan follikül sıvısı ve folliküler hücreleri ile yapılan tüm çalışmalar için standart prosedür ovaryan stimülasyonu takiben örnek toplanması yönündedir. Modifiye doğal döngülerle oosit eldesinin sınırlı olması ve etik sınırlamalar nedeniyle çalışma ovaryan stimülasyon uygulanan hastalarla gerçekleştirilmiştir.

Domuz oosit ve kumulus hücrelerinin in vitro matürasyon sürecinde değerlendirildiği bir çalışmada, Kiss1'in sadece oositlerde, Kiss1R'nün ise hem oosit hem de kumulus hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiş ve bu ekspresyonların düzenleniminin Kiss1'in oosit ve kumulus hücreleri arasındaki otokrin-parakrin etkileşimlerle sürekli ve direkt olarak reseptörü aracılığı ile etkinliğini tüm matürasyon sürecinde gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır (Saadeldin ve ark., 2012). Bu çalışma kapsamında hem oosit hem de kumulus hücrelerinde Kiss1 ve Kiss1R mRNA ekspresyonları gösterilmiştir. Matürasyon seviyesi ve fertilizasyon kapasitesi düşük oositlerde ve bu oositlerin kumulus hücrelerinde, matür oositlere oranla Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA seviyelerinde azalma saptanmıştır. Örnek sayısının az olması nedeniyle istatistiksel anlamlılık görülmemiş olmakla birlikte, ekspresyon düzeylerinin matürasyon, stimülasyon protokolü ve ovulasyon indüksiyon yönteminden etkilendiği saptanmıştır. Kiss1 ve reseptörünün oositin nuklear ve sitoplazmik matürasyonu ile paralel olarak artış gösterdiği, Cox-2'nin bu gelişimsel süreçte negatif kontrol edici etkisi görülmüştür.

Hücre kültürü ortamında Kiss1 ve Kiss1R'nün hem insan hem de sıçan granüloza hücrelerinde ekspresyonları ve farklı matürasyon aşamalarında ekspresyon seviyelerindeki değişimler daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Castellano ve ark., 2006; Gaytan ve ark., 2009; Peng ve ark., 2013). Kiss1 ekspresyonu mural granüloza ve kumulus hücrelerinde fark göstermezken, Kiss1R'nün kumulus hücrelerinde ekspresyonu yüksektir (J. Garcia-Ortega ve ark., 2014). İnsan ovaryan folliküllerinin gelişim basamaklarına bağlı olarak Kiss1 ve Kiss1R'nün immünohistokimyasal olarak boyanma farklılıkları gösterdiği ve korpus luteumda çok az düzeyde boyanma rapor edilmiştir (Gaytan ve ark., 2009; Cejudo Roman ve ark., 2012). Kiss1 ve Kiss1R ekspresyonları, 18 ve 48 saatlik periyodlardaki mural granüloza hücre kültüründe gösterilmiştir. Uzayan zaman dilimine bağlı olarak ekspresyon seviyesi de yükselmiştir. Ayrıca kültür ortamında folliküler sıvı eklentisi de gen ekspresyon seviyelerini pozitif yönde değiştirmiştir (de los Santos ve ark., 2012; Fragouli ve ark., 2014). Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, farklı gelişim basamağındaki folliküllerin kumulus hücrelerinde Kiss1 ve Kiss1R ekspresyon seviyelerinin farklı olması beklenmektedir. Bu çalışmada kontrollü ovaryan stimülasyon döngülerinde elde edilen oosit ve bu oositlere ait kumulus hücreleri kültüre edilmeden değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklar göstermemekle birlikte, literatürü destekler nitelikte, immatür ve fertilizasyon potansiyeli düşük matür oositleri çevreleyen kumulus hücrelerinde matür fertilizasyonu gerçekleştirmiş oositleri çevreleyen kumulus hücrelerine kıyasla daha düşük Kiss1 ve Kiss1R mRNA ekspresyon seviyeleri görülmüştür.

Üreme döngüsünde ovaryan yaşlanma mekanizması tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. Artan yaş ile beraber hipotalamik Kiss1 ekspresyonunun azalmasının üreme sistemine etkileri bilinmektedir. Periferde, folliküler mikroçevre düzeyinde değerlendirildiğinde, yaşa bağlı düşük ovaryan rezervli olgularda Kiss1 ekspresyonu tarafından indüklenen adrenerjik agonistlerin stimülasyonu altındaki ovaryumda sempatik sinir liflerinde artış gözlemlenir. Bu veriler, ovaryan Kiss1/Kiss1R ekspresyon düzeyinin artan yaş ile paralellik gösterdiği yönünde yorumlanabilir. Fare kumulus hücrelerinde, Kiss1 ve Kiss1R ekspresyon seviyeleri

artan yaş ile pozitif korelasyon göstermiştir (Ichimura ve ark., 2016). İnsan kumulus hücrelerindeki Kiss1R ekspresyon seviyelerinin de artan yaş ile pozitif korelasyonu rapor edilmiştir (Merhi ve ark., 2016) Kumulus hücrelerinde yaşa bağımlı Kiss1R ekspresyon seviyelerindeki artışın serum/plazma Kiss1 konsantrasyonundaki azalma nedeniyle (negatif feedback mekanizma ile) olduğu düşünülebilir, fakat bu verilerle çelişkili olarak pre ve post menapozal dönemlerde plazma kisspeptin seviyesinin değişmediği de daha önceki bir çalışmada gösterilmiştir (Peng ve ark., 2010). Folliküler sıvı seviyesinde bakıldığında hem Kiss1 hem de KissR1 konsantrasyonları yaşa bağımlı değişim göstermemektedir (Kanasaki ve ark., 2013; Peng ve ark., 2010). Bu çalışmada serum ve follikül sıvısında Kiss1 ve Kiss1R ekspresyon seviyeleri ile yaş korelasyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fakat infertilite etyolojisi açısından bakıldığında örnekleri toplanılan hastaların büyük bölümü düşük ovaryan rezervi olan olgulardır. Daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilen yaşa bağlı Kiss1 ve Kiss1R seviyelerindeki azalmanın ovaryan rezervin azalması ile korele olduğu şeklinde yorumlanırsa, bu çalışmada hasta yaşı ile korelasyonun görülmemesinin DOR olgularının ağırlıklı olmasının bir sonucu olduğu şeklinde açıklanabilir. Ayrıca çalışma kapsamında yaş aralıklarına göre gruplandırılan kumulus hücre örneklerinin, yeterli sayıda olmaması Kiss1 ve Kiss1R ekspresyon seviyelerini değerlendirmede kısıtlayıcı etmendir. Laboratuvar ortamında düşük ovaryan rezerv modeli oluşturularak, ilerleyen yaş ve düşük ovaryan rezervin Kiss1 ve Kiss1R ekspresyon seviyelerine etkisi ve mekanizmasını değerlendirecek daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Fare kumulus hücrelerinde, Kiss1 ve Kiss1R ekspresyon seviyeleri klinik parametrelerden biri olan BMI'den bağımsızdır (Merhi ve ark., 2016). İnsan kumulus hücrelerinde de Kiss1 ve Kiss1R ekspresyon seviyeleri ile BMI arasında korelasyon gözlenmemiştir (Latif ve ark., 2015). Bu çalışma kapsamında oosit ve kumulus hücrelerinde mRNA ekspresyon düzeyinde örnek sayısının az olması sebebiyle BMI bağımlı analiz gerçekleştirilmemiş olsa da serum ve follikül sıvısı seviyesinde Kiss1 ve Kiss1R konsantrasyonları ile BMI arasında korelasyon görülmemiştir.

Bu çalışmada serum ve folliküler sıvıda Kiss1 ve Kiss1R konsantrasyonlarında etyoloji bağımlı değişkenlik gözlenmemiştir. Ancak, Kanasaki ve ark. (2013) farklı serum gonadotrophin seviyelerine sahip olan gebelerde, postmenapozal kadınlarda, prematür ovaryan yetmezlik ve idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH) olgularında ve normal menstrüel döngüye sahip sağlıklı bireylerde serum kisspeptin seviyesinin karşılaştırmasında gebelik sürecinde anlamlı ölçüde artışını gözlemlemişlerdir. Serum kisspeptin seviyesinin gebeler haricindeki diğer olgularda da saptanabilmesi kisspeptinin periferel dolaşımında bulunduğunu göstermiştir. Kiss1 geninin ovaryum, pankreas, adrenal bez, adipoz doku ve arterlerde eksprese edildiği düşünüldüğünde, periferel dolaşımdaki seviyesinin bu organlardan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Postmenapozal kadınlarda ve prematür ovaryan yetmezliği olgularında serum FSH ve LH konsantrasyonlarındaki değişimler dikkate alındığında, bu olgularda Kiss1 seviyesinin yükseleceği düşünülmüştür. Tam tersine IHH olgularında ise gonadotrophin seviyesi ile paralel olarak Kiss1 seviyelerinde azalma olacağı ön görülmüştür. Ancak polikistik over sendromu (PCOS) olgularında plazma kisspeptin seviyesi yüksek olup, sağlıklı bireylere oranla istatistiksel anlamlı fark olmasa da, LH ve leptin seviyesi ile pozitif korelasyon gösterdiği raporlanmıştır (Emekçi ve ark., 2016). Bu çalışmada kontrollü ovaryan stimülasyon döngülerinde kisspeptin ve reseptörünün periferdeki ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Oositin matürasyon seviyesinin artışıyla pozitif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Etiyolojiden bağımsız olarak, serum ve folliküler sıvı düzeyinde Kiss1 ile Kiss1R konsantrasyonları LH, FSH, E2 ve ovulasyon indüksiyon günü E2 gibi hormonal parametrelerle de korelasyon göstermemiştir.

Düzenli menstrüel sıklusa sahip kadınlarda serum Kiss1 konsantrasyonunun, preovulatuvar dönemde ve özellikle luteal fazda istatistiksel olarak yüksek değerlere ulaştığı gösterilmiştir. Ancak östradiol seviyesi ile Kiss1 konsantrasyonu arasında faz bağımlı korelasyon görülmemiştir (Latif ve ark., 2015). Bu çalışma kapsamında değerlendirilen serum ve folliküler sıvı örnekleri periovulatuvar dönemde elde edilmiş olup, çalışma menstrual döngünün farklı bir periyodu ile karşılaştırma yapılacak şekilde planlanmamıştır. Oosit matürasyon aşaması açısından

değerlendirildiğinde, serum ve folliküler sıvı seviyesinde Kiss1 konsantrasyonunda anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir. Dişi domuzlarda yapılan bir araştırmada serum ve folliküler sıvı seviyesinde Kiss1 konsantrasyonları tayin edilmiş ve folliküler sıvı seviyesinde Kiss1 konsantrasyonunun ($335 \pm 22,5$ pg/ml) serum seviyesine ($25 \pm 5,2$ pg/ml) kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu raporlanmıştır (Saadeldin ve ark., 2012). Ancak bu çalışmada, dişi domuzlara ovaryan stimülasyon uygulanmamış olup, serum seviyesinde Kiss1 konsantrasyonunun gonadotrofinlerin etkilerinden bağımsız periferal organların etkisinde olduğundan düşük seviyede olduğunu şeklinde yorumlanabilir. Bu çalışmada ovaryan stimülasyon uygulanmış olan kadınların serum ve follikül sıvısı seviyesinde Kiss1, Kiss1R ve Cox2 ekspresyonları arasında korelasyon görülmemiştir.

IVF döngülerinde kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokolleri uygulanırken tüm folliküller eş zamanlı gelişim göstermeyebilir ve bir grup follikülün farklı çaplarda gelişim gösterdiği gözlemlenir. OPU sonrası farklı çaplardaki folliküllerden elde edilen oositler değerlendirildiğinde, follikül çapı ile barındırdığı oositin matürasyon aşaması korelasyon göstermektedir. Özellikle follikül çap artışı ile Metafaz-II oosit eldesi olasılığı pozitif korelasyon göstermektedir (Scott ve ark., 1989; Ectors ve ark., 1997). Buna ek olarak da, 12 mm ve üzeri folliküllerden elde edilen oositlerin hem fertilizasyon hem de klivaj oranlarının anlamlı oranda yüksek olduğu saptanmıştır (Wittmaack ve ark., 1994; Bergh ve ark., 1998). Ancak tüm bu verilerin aksine, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrasında 3-10 mm çapında küçük folliküllerden matür oositin elde edildiği de gösterilmiştir (Teramoto ve ark., 2016). Bu tespit, eksojen gonadotrofinlerin etkisi ile küçük folliküllerdeki oositlerin de gelişim gösterdiği yönünde yorumlanmıştır. Bu çalışma kapsamında immatür oositleri barındıran folliküllerin çaplarının, matür oositleri barındıranlara kıyasla anlamlı oran da küçük olduğu gözlemlendi. Ancak matür oositleri barındıran follikül çaplarının, fertilize olmamış oositlerde, fertilizasyon gözlemlenen oositlere göre daha büyük olduğu da saptandı. Oosit matürasyonunun değerlendirilmesinin morfolojik görünümüne bakarak nüklear matürasyon yönünde (I. kutup cisimciğinin atılımı) gerçekleştirildiği ve sitoplazmik matürasyonun gerçekleşme oranının ancak fertilizasyon başarısı ile

değerlendirilebileceği gözönüne alınırsa, nükleer ve sitoplazmik anlamda matürasyonunu tamamlayan oositlerin follikül çapının artışı ile korele olmadığı sonucuna varılmaktadır ve bu sonuç Teramoto ve arkadaşlarının çalışmalarını destekler niteliktedir.

Germinal vezikülün yıkımı ve mayoz bölünmenin kaldığı yerden devam edebilmesini için, FSH hem in vitro, hemde in vivo olarak kumulus ve granüloza hücrelerindeki G-proteini reseptörü olan FSH reseptörlerine bağlanır ve stimüle eder (Heitman ve Ijzerman 2008; Segaloff ve ark., 1990). Bu sinyal kaskadı, intrasellüler cAMP artışı ile prostaglandin E2 sentezinin düzenlenimini uyarr (Shimada ve ark., 2006; Yamashita ve ark., 2011). Prostaglandinlerin biyosentezinde en önemli basamak, yağ asidi prekürsörlerinin prostaglandin endoperoksidaz (Cox-1 ve Cox-2) enzimi ile prostaglandin G yapısına enzimatik dönüşümüdür. Ovaryan folliküllerin prostaglandinleri sentezlediği daha önceki çalışmalarla da gösterilmiştir. Büyükbaş hayvanlardan sığır preovulatuvar folliküllerinde granüloza ve kumulus hücrelerinde Cox-2 ve reseptörünün ekspresyonu gösterilmiştir (Nuttinck ve ark., 2002). Ancak, in vitro matürasyon süreçlerinde izole edilen kumulus-oosit komplekslerinde Cox-1 ekspresyonu gözlenmemiştir (Nuttinck ve ark., 2002). Oositin in vitro matürasyon sürecinde, kültür ortamında Cox-2 gen ekspresyonunun 0-6 saat içerisinde yükselerek maksimum seviyeye geldiği, 6-12 saat arasında düşüş gösterdiği ve 12-24 saatleri arasında ise değişim göstermediği raporlanmıştır (Waleed ve ark., 2014). Ancak, kültür ortamında gonadotrophinlerin varlığı ile Cox-2'deki 0-6 saat içerisindeki artışın, 12. saatte maksimum seviyeye ulaştığı da daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Calder ve ark., 2001; Nuttinck ve ark., 2002). Dişi maymunlarda yapılan bir çalışmada ovaryan stimülasyon sonrasında ovulasyon induksiyonu ile elde edilen oositlerin; %72.9 MII, %20.6 MI ve %6.7 GV oranlarında gözlemlenirken, siklooksijenaz inhibitörü olan "celecoxin" uygulaması sonrasında ise elde edilen oositlerde %35.6 MII, %30.4 MI ve %33.8 GV oranları saptanmıştır (Duffy ve ark., 2011). Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, prostaglandin E2 sentez ve aktivasyonunun oosit in vitro matürasyon sürecinde ve kumulus hücrelerinin ekspansiyonunda rol aldığı şeklinde yorumlanmıştır. Rodentlerde yapılan birçok çalışma ile prostoglandin E2 sentezinden sorumlu Cox-2

enziminin kumulus hücrelerinde ekspresyonu gösterilerek kumulus hücre ekspansiyonu ve oosit matürasyonundaki etkinlikleri rapor edilmiştir (Eppig ve ark., 1981; Hizaki ve ark., 1999; Lim ve ark., 1997; Takahashi ve ark., 2006). Bu çalışmada immatür oositlerde matür-fertilize olmamış oositlere göre Cox-2 ekspresyon seviyelerinin daha düşük olduğu tespit edildi. Oosit nüklear matürasyonunda mayoz bölünmenin devamını sağlayan hücre içi cAMP seviyesinin, Cox-2 aktivitesine bağımlı prostaglandin seviyesi ile bağlantılı olması bu çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir. Azalmış Cox-2 ekspresyonu oosit hücre içi düşük cAMP seviyeleri ve bunun sonucunda mayoz bölünmenin gerçekleşmeyerek matürasyonun durakladığını işaret etmektedir.

İn vitro matürasyon sürecinde 6 saat ve öncesinde (germinal vezikül yıkımı öncesi) prostaglandin E2 seviyesinde artış görülmesi, oosit matürasyonu ve kumulus ekspansiyonunda rolünün olduğunu fikrini destekler niteliktedir. Bu çalışmada da, istatistiksel anlamlılık görülmemekle birlikte, henüz matürasyonunu tamamlayamamış oositlerde (Grup 1) Cox-2 seviyesinin yüksek olduğu, matürasyonunu tamamlamış fakat fertilize olmamış (sitoplazmik matürasyonun tamamlanmaması muhtemel oositler) oositlerde (Grup 2) bu seviyenin düştüğü görülmüştür. Bu bulgular IVM sürecindeki ilk 6 saat ve sonrasındaki 6-12. saatlerdeki Cox-2 gen ekspresyon oranları ile benzerdir. Gonadotropin varlığında 12. saatte Cox-2 düzeyinin pik yapması da bu çalışmanın kontrol grubu olan, nüklear ve sitoplazmik matürasyonunu tamamlamış ve fertilize olmuş oositlerin (Grup 3) Cox-2 düzeylerindeki yükselmeyi açıklayabilir. Gonadotrofinlerin yokluğunda, prostaglandin E2'nin farklı dozlarda in vitro matürasyon besiyerine eklenmesi ile 24 saatlik kültür sonunda matürasyonunu tamamlayan oosit sayısının anlamlı ölçüde yükseldiği gösterilmiştir (Waleed ve ark., 2014). Adı geçen literatür bu çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir. Matürasyon besiyerine gonadotrofinler ile prostaglandin E2'nin beraber eklenmesi ise anlamlı etkiler göstermemiştir (Waleed ve ark., 2014). Bu verilerden yola çıkarak, besiyerine prostaglandin E2 eklenmesinin sadece germinal vezikül yıkımı sürecinde etkin olduğu sonucu çıkarılabilir. Bu yorumu, Cox-2 geni knock-out farelerde, gonadotrofinlerin yoksunluğunda,

prostaglandin E2 uygulaması ile germinal vezikül yıkımını tamamlayan matür oosit eldesinin gerçekleşmesi destekler (Takahashi ve ark., 2006).

Serum seviyesinde Cox-2 konsantrasyonunun değerlendirildiği çalışmalarda (Jesam ve ark., 2010; Hester ve ark., 2010) Cox-2 inhibitörleri ile kontrasepsiyon hedefleri ön planda tutulmuştur. Folliküler sıvı seviyesinde Cox-2 konsantrasyonunun değerlendirildiği çalışmalarda ise (Duffy ve ark., 2001; Tokuyama ve ark., 2001 ve 2003), miktar tayinini saptamaktan öteye geçmemekle birlikte, sadece folliküler rüptür oluşumundaki rolü değerlendirilmiştir. Bu çalışmada hem serum hem de folliküler sıvı seviyesinde yaşa bağlı Cox-2 konsantrasyon farklılıkları gözlenmemiştir. Serum seviyesinde Cox-2 konsantrasyonu ile diğer hasta karakteristik özellikleri arasında korelasyon görülmezken, folliküler sıvı seviyesinde Cox-2 konsantrasyonu ile serum AMH konsantrasyonu ve OPU'da elde edilen matür oosit oranı arasında negatif korelasyon görülmüş, ayrıca ovulasyon indüksiyon yöntemine göre de anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Kumulus Cox-2 ekspresyonunun hasta karakteristik özellikleri ile korelasyonu (yaş, BMI ve ovulasyon indüksiyon günü FSH konsantrasyonu vb) daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Adriaenssens ve ark., 2010). Adı geçen çalışmada artan yaş ile (ovaryumun gonadotrofinlere yanıtının azalması sonucunda) kumulus hücrelerinde Cox-2 mRNA ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. İlerleyen yaş ile serum AMH düzeyi arasında negatif korelasyonun olması beklendiği için, follikül sıvısı ve kumulus hücreleri seviyesinde Cox-2 konsantrasyonlarının yaş ve AMH konsantrasyonu ile negatif korelasyonu birbiriyle uyumludur. Bu çalışmada kumulus hücrelerinde ve oositlerde farklı matürasyon aşamalarındaki oositlerde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının korelasyonu değerlendirildi. Hasta yaşı ve AMH oranları vb parametrelerle korelasyonu örnek sayılarının azlığı nedeniyle değerlendirilmedi. Bununla birlikte follikül sıvısı seviyesinde elde edilen veriler literatürü destekler niteliktedir.

Potansiyel sikloksijenaz inhibitörü olan indomethacin'in üreme dönemindeki dişi sıçanlara uygulanması sonucunda, bu sıçanlarda ovulasyon düzeninde bozulma ve ovaryan Kiss1 ekspresyonunda düşüş görülürken, Kiss1R ve

Cox-2 ekspresyonlarında değişim gözlemlenmemiştir. Kiss1 ekspresyonundaki düşüş prostaglandin E2 uygulaması ile bazal seviyesine geri dönmüştür. Dişi sıçanlarda gonadotrophin uygulamasını takiben, ovulasyon sürecinde Cox-2 inhibisyonunun sadece ovaryan Kiss1 mRNA ekspresyonunun baskılanması ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Gaytan ve ark., 2009). Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, oosit matürasyon sürecinde hem oosit hem de kumulus hücrelerindeki Kiss1 ve Cox-2 mRNA ekspresyonlarının korelasyon gösterdiği ve ilişkili olduğu yorumu yapılabilir. Ayrıca serum ve folliküler sıvı seviyesinde Kiss1 ve Cox-2 konsantrasyonları ise anlamlı derecede pozitif korelasyon göstermektedir. Bu çalışmada da matür oositlerin elde edildiği serum ve follikül sıvısı örneklerinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 ekspresyon seviyeleri arasında pozitif korelasyon saptandı. İmmatür oositlerin kumulus hücrelerinde Kiss1 ve Cox-2 mRNA ekspresyonlarının matür oositlere oranla düşük olması da literatürü destekler niteliktedir. İmmatür oositleri çevreleyen kumulus hücrelerindeki Kiss1 ve Kiss1R mRNA ekspresyon seviyelerinin matür oositlere göre daha düşük olmasına karşın, Cox-2 mRNA ekspresyon seviyelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kumulus hücrelerinde Cox-2 mRNA ekspresyon seviyesinin periovulatuvar dönemde en yüksek seviyede tespit edilmiş olması ile bağlantılı olarak, erken yükselen Cox-2 ekspresyonunun oositin matürasyonunu tamamlamadan erken ovüle olması şeklinde yorumlanabilir.

Gonadotrophin ile ovaryan stimülasyona ek olarak kisspeptin uygulamasının dişi sıçanlarda hem oosit matürasyonunu hem de ovulasyonu indüklediği gözlemlenmiştir (Roa ve ark., 2006). Buna ek olarak, insan çalışmalarında normal, düzenli menstrüel siklusun preovulatuvar fazında kisspeptinin LH salınımını stimüle eden en potansiyel araç olduğu gösterilmiştir (Dhillon ve ark., 2005; Jayasena 2011; Chan ve ark., 2012). Bu veriler değerlendirildiğinde, kisspeptin uygulamasının LH piki oluşturmaları sebebiyle, tedavi sürecindeki hastalarda ovulasyon indüksiyonu ve final oosit matürasyonunun tetikleyicisi olarak uygulanması düşünülmüştür (Teles 2008; Humaidan ve ark., 2011). Standart rekombinant FSH ve GnRH antagonist uygulaması ile süperovulasyonun tetiklenmesi ve prematür ovulasyonun engellenmesini takiben subkutan tek doz Kiss1 uygulaması ile final oosit maturasyonu hedeflenmiştir. Farklı dozlarda Kiss1 uygulanmasında optimal doz 6,4

ve 12,8 nmol/kg olarak belirlenmiştir. Uygulama sonrasında serum Kiss1, LH, FSH ve progesteron seviyeleri artmıştır. Her iki dozda da oosit matürasyonu gözlemlenmiştir ve oosit eldesi nispi olarak diğer dozlara oranla daha kolay gerçekleşmiştir. Ovulasyon indüksiyonu için kullanılan standart yöntemler ile Kiss1 uygulaması blastosist formasyon oranı açısından kıyaslandığında, sırasıyla %51,2 ve %49,9 gibi benzer oranlar raporlanmıştır. %40 oranında biyokimyasal gebelik gözlemlenirken, %28 oranında klinik gebelik ve 12 canlı doğum raporlanmıştır (Abbara ve ark. 2013). Kisspeptin uygulamasının IVF tedavilerindeki güvenilirliği düşünüldüğünde, doğal bir peptid oluşu ve konsantrasyonunun gebeliğin başlangıcından 9. haftasına kadar yaklaşık olarak 7.000 kat artmış seviyede olması, uygulanan ekzojen kisspeptinin yarı ömrünün 28 dakika olması ve yan etkilerinin gözlemlenmemiş olması nedeniyle güvenilir olarak düşünülmektedir (Dhillon 2005; Jayasena 2013). Agresif kontrollü ovaryan stimülasyon süreci ya da PCOS etiyojisi ile IVF tedavisi gören hastalarda %1-3 oranlarında ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) gözlemlenebilir (Mansour ve ark., 2014) ve bu durumda IVF tedavi döngüleri iptal edilir. OHSS görülme riski henüz tam anlamıyla ön görülebilir ya da önüne geçilebilir durumda değildir (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008). Bir çok OHSS olgusunun nedeninin endojen LH veya ekzojen hCG uygulaması sonrası LH reseptörlerinin aşırı uyarılmasına bağlı olduğu yönündedir ve yeni yöntemler için çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar arasında, gonadotrophin dozunu azaltmaya ek olarak luteal destek de hCG yerine progesteron kullanımı en kabul gören ve gebelik oranlarına etkisi olmayan bir yöntem olarak tanımlanmıştır (Van der Linden ve ark., 2011). Diğer alternatif yöntem olarak endojen LH yerine GnRH agonist kullanımı düşük gebelik oranları nedeniyle tamamen kabul görmemiştir (Youssef ve ark. 2011). Bu çalışmada ovulasyonu indüklemek amacıyla kullanılan hCG ve GnRH agonist uygulamaları sonucunda, hCG sonrası serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 seviyelerinde anlamlı artış saptandı. Preovuluar dönemde kisspeptinin LH salınımını uyarıcı etkisi dikkate alındığında, hCG uygulamasının ovulasyonun tetiklenmesinde daha etkin olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bu çalışmada GnRH agonisti uygulanan hasta sayısının az olması sonuçların yorumlanmasında sınırlayıcı bir etkidir. Bu perspektifle daha kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

Oosit in vitro matürasyonu, potansiyel OHSS olgularında ovaryan stimülasyonun riskli olması sebebiyle oosit matürasyonunun tamamlanması anlamında bir seçenektir. Ayrıca oosit matürasyon yetersizliği gözlemlenen IVF olgularında da IVM uygulamaları ön plana çıkmaktadır. Domuz oosit in vitro matürasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada klasik FSH ve LH eklentisi olan IVM kültür ortamına Kiss1 eklenmesinin matürasyon oranlarını anlamlı derecede arttırdığı gözlemlenmiştir. Kiss1R ekspresyonu gözlemlenen hücrelerde, Kiss1 varlığının hücresel olarak Ca^{+2} dalgalanmalarını indüklediği de daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Liu ve ark., 2008; Castano ve ark., 2009; Constantin ve ark., 2009; Kroll ve ark., 2011). Kumulus hücre yapı ve fonksiyonlarının farklılaşmasının düzenleniminde, oosit sitoplazmik ve nükleer matürasyon sürecinde Ca^{+2} iyonlarının önemli rol oynadığı düşünüldüğünde, insan oosit in vitro matürasyon süreçlerinde de kültür ortamına Kiss1 eklentisinin matürasyon oranlarını arttırması da beklenir. Bu çalışmada Kiss1 ve Kiss1R'ün oositin matürasyonundaki etkinliğini destekler niteliktedir. Özellikle bu çalışmada düşük over rezervli olguların ağırlıklı olması matürasyon arrestlerinin sık görüldüğü etyoloji grubu olarak yorumlanabilir. Literatürde bunu destekler niteliktedir (Hourvitz ve ark., 2010). Ancak literatürde infertilite etyolojisi ve IVM kültür ortamlarında kisspeptinin etkinliği kapsamında bir çalışma bulunmamakta ve bu süreçte rol oynayan moleküler mekanizmaların aydınlatılabileceği çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak; bu çalışma "kontrollü ovaryan stimülasyon döngülerinde oosit ve mikroçevresinde kisspeptin matürasyonu arttırıcı etki göstermektedir ve Cox-2 bu gelişimsel süreçte rol oynamaktadır" hipotezinden yola çıkarak, kan serumu ve follikül sıvısına ek olarak insan oositleri ve kumulus hücrelerinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının, oosit matürasyon seviyesi ve hastanın klinik parametreleri dikkate alınarak değerlendirildiği ilk çalışmadır. Bu çalışmada oositin nükleer ve sitoplazmik matürasyonunda kisspeptin ve reseptörünün artan konsantrasyonları görülmüştür. Örnek sayısının sınırlı olması nedeniyle elde edilen verilerle kisspeptinin matürasyon sürecinde gerekli olduğu söylenemez. Fakat kisspeptinin kullanılan ovaryan stimülasyon protokolü ve ovulasyonu tetikleme

protokolü gibi klinik yaklaşımlarla korelasyonunun varlığı, ovulasyon gününde stimülasyon sürecinde kontrol mekanizması niteliğinde değerlendirilebilecek nitelikte olan reseptör seviyesindeki azalma ve Cox-2'nin özellikle ovulasyon öncesi final oosit matürasyonundaki negatif etkisi in vitro uygulamalarda, oosit matürasyon arresti görülen olgularda yeni yaklaşımlara yönlendirici olabilir. Bu konuda daha fazla materyalin değerlendirildiği ve moleküler mekanizmaların irdelenebileceği daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.



6.KAYNAKLAR

Abbara A, Jayasena CN, Nijher GK et al (2013) Kisspeptins—a novel physiological trigger for oocyte maturation in IVF treatment. *Human Reproduction; Supplement 1; European Society of Human Reproduction and Embryology 29th Annual Meeting, London. Abstract O-107.*

Adhikari D, Liu K (2010) mTOR signaling in the control of activation of primordial follicles. *Cell Cycle* 9: 1673–1674.

Adriaenssens T, Wathlet S, Segers I et al (2010) Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Hum Reprod* 25: 1259–1270.

Avrech OM, Goldman GA, Rufas O et al (1997) Treatment variables in relation to oocyte maturation: lessons from a clinical micromanipulation-assisted in vitro fertilization program. *Assist Reprod Genet* 14: 337–342.

Bar-Ami S, Zlotkin E, Brandes J et al (1994). Failure of meiotic competence in human oocytes. *Biol Reprod* 50: 1100–1107.

Ben-Ami I, Freimann S, Armon L et al (2006) PGE₂ up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE₂ and LH in ovulation. *Mol Hum Reprod* 12: 593–599.

Bergh C, Broden H, Lundin et al (1998) Comparison of fertilization, cleavage and pregnancy rates of oocytes from large and small follicles. *Hum Reprod* 13: 1912–1915.

Borum K (1961) Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res* 24: 495–507.

Broekmans FJ, Knauff EAH, te Velde ER et al (2007) Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab* 18: 58–65.

Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ et al (2006) Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 5: 712–726.

Burns KH, Viveiros MM, Ren Y et al (2003) Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* 300: 633–636.

Calder MD, Caveney AN, Westhusin, ME et al (2001) Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂(PGE₂) receptor Messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE₂ induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biol Reprod* 65: 135–140.

- Campbell BK, Baird DT (2001) Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. *J Endocrinol* 169: 333–345.
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655–1657.
- Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM et al (1998) Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* 204: 373–384.
- Carneiro J (2002) *Basic Histology* (Lange Medical Book). 10 edition ed. McGraw-Hill/Appleton & Lange.
- Castano JP, Martinez-Fuentes AJ, Gutierrez-Pascual E et al (2009) Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: multiple signals underlie function diversity. *Peptides* 30:1 0–15.
- Castellano JM, Gaytan M, Roa J et al (2006) Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 147: 4852–4862.
- Cejudo Roman A, Pinto FM, Dorta I et al (2012) Analysis of the expression of neurokinin B and kisspeptin in granulosa cells. *Fertil Steril* 97: 1213–1219.
- Chan YM, Butler JP, Sidhoum VF et al (2012) Kisspeptin administration to women: a window into endogenous kisspeptin secretion and GnRH responsiveness across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 97(8): 1458–1467.
- Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V et al (2010) The kisspeptin/ neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology* 147: 301–311.
- Ciofi P, Krause JE, Prins GS (1994) Presence of nuclear androgen receptor-like immunoreactivity in neurokinin B-containing neurons of the hypothalamic arcuate nucleus of the adult male rat. *Neurosci Lett* 2: 193–196.
- Ciofi P, Leroy D, Tramu G (2006) Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* 141: 1731–1745.
- Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH et al (2009) Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 21: 673–682.
- Clarkson J, Herbison AE. (2006) Postnatal development of kisspeptin neurons in Mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147: 5817–5825.

Constantin S, Caligioni CS, Stojilkovic S et al (2009) Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Endocrinology* 150: 1400-1412.

Coticchio G, Albertini DF, De Santis L (2013) Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells Springer-Verlag London. pp: 19–37.

Dahl SK, Amstalden M, Coolen L et al (2009) Dynorphin immunoreactive fibers contact GnRH neurons in the human hypothalamus. *Reprod Sci* 8: 781–787.

De los Santos MJ, Garcia-Laez V, Beltran-Torregrosa D et al (2012) Hormonal and molecular characterization of follicular fluid, cumulus cells and oocytes from pre-ovulatory follicles in stimulated and unstimulated cycles. *Hum Reprod* 27: 1596–1605.

De Roux N, Genin E, Carel J et al (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci* 100: 10972–10976.

Dekel N (2005) Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 234: 19–25.

Dhillon WS (2005) Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90(12): 6609–6615.

Dong J, Albertini D.F, Nishimori K et al (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383: 531–535.

Dorrington JH, Armstrong DT (1979) Effects of FSH on gonadal functions, Recent Dragovic R.A, Ritter L.J, Schulz S.J et al (2005) Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology* 146: 2798–2806.

Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ et al (2007) Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biol Reprod* 76: 848–857.

Duffy DM, VandeVoort CA (2011) Maturation and fertilization of non-human primate oocytes are compromised by oral administration of a COX2 inhibitor. *Fertil Steril* 95: 1256 – 1260.

Duffy DM, Stouffer RL (2001) The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. *Mol Hum Reprod* 7(8):731-9.

Durinzi KL, Saniga EM, Lanzendorf SE (1995) The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil Steril* 63: 404–406.

- Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P et al (2002a) Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143: 1076–1084.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B et al (1999) Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140: 5789–5796.
- Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP (2002b) Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 124: 601–609.
- Ectors FJ, Vanderzwalmen P, Van Hoeck J et al (1997) Relationship of human follicular diameter with oocyte fertilization and development after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12: 2002–2005.
- Elvin J.A, Clark A.T, Wang P et al (1999) Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13: 1035–1048.
- Emekci O, Ozay AC, Acar B (2016) Role of kisspeptin in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol Endocrinol* 22: 1-5.
- Eppig JJ (1981) Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biol Reprod* 25: 191–195.
- Espey LL (1980) Ovulation as an inflammatory reaction: a hypothesis. *Biology of Reproduction* 22: 73–106.
- Findlay JK, Drummond AE, Britt KL et al (2000) The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Mol Cell Endocrinol* 163: 81–87.
- Foradori CD, Coolen LM, Fitzgerald ME et al (2002) Colocalization of progesterone receptors in parvicellular dynorphin neurons of the ovine preoptic area and hypothalamus. *Endocrinology* 11: 4366–4374.
- Fortune JE (2003) The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 78: 135–163
- Fortune JE, Eppig JJ (1979) Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries in vitro, *Endocrinology* 105: 760–768.
- Fragouli E, Lalioti MD, Wells D (2014) The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Hum Reprod Update* 20: 1–11.

Franceschini I, Lomet D, Cateau M (2006) Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 3: 225–230.

Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871–1875.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM et al (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25: 279–283.

Garcia-Ortega J, Pinto FM, Fernández-Sánchez M et al (2014) Expression of neurokinin B/NK3 receptor and kisspeptin/KISS1 receptor in human granulosa cells. *Hum Reprod* 29: 2736–2746.

Gardner D.K, Weissman A, Howles C.M, et al (2009) *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives* 3th ed.

Gaytan F, Gaytan M, Castellano JM et al (2009) KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: 520–531.

George JT, Seminara SB (2012) Kisspeptin and the hypothalamic control of reproduction: lessons from the human. *Endocrinology* 11: 5130–5136.

Goubillon ML, Forsdike RA, Robinson JE et al (2000) Identification of neurokinin B-expressing neurons as a highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology* 11: 4218–4225.

Greenwald GS (1972) Of eggs and follicles. *Am J Anat* 135: 1–3.

Han SK, Gottsch ML, Lee KJ et al (2005) Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25: 11349–11356.

Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC et al (2008). A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod* 23: 699–708.

Hayashi M, McGee EA, Min G et al (1999) Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140: 1236–1244.

Heitman LH, Ijzerman AP (2008) G protein-coupled receptors of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: a case for GnRH, LH, FSH, and GPR54 receptor ligands. *Med Res Rev* 28: 975–1011.

Hester KE, Harper MJ, Duffy DM (2010) Oral administration of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor meloxicam blocks ovulation in non-human primates when administered to simulate emergency contraception. *Hum Reprod* 25(2): 360-367.

Hickey TE, Marrocco DL, Amato F et al (2005) Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 73: 825–832.

Hillier SG, Miro F (1993) Inhibin, activin, and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. *Ann N Y Acad Sci* 687: 29–38.

Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD (1994) Follicular oestrogen synthesis: the ‘two-cell, two-gonadotrophin’ model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 100:51–54.

Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y et al (1999) Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. *PNAS* 96: 10501–10506.

Hourvitz A, Maman E, Brengauz M et al (2010). In vitro maturation for patients with repeated in vitro fertilization failure due to “oocyte maturation abnormalities”. *Fertil Steril* 94(2): 496-501.

Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B et al (2010) The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci* 11: 1984–1998.

Hsueh A, Kawamura K, Cheng Y et al (2014) Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews* doi: 10.1210/er.2014-1020

Hsueh AJ, Dahl KD, Vaughan J et al (1987) Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 84: 5082–5086.

Hu YC, Wang PH, Yeh S et al (2004) Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci* 101: 11209–11214.

Humaidan P, Kol S, Papanikolaou EG (2011) Copenhagen GnRH Agonist Triggering Workshop Group. GnRH agonist for triggering of final egg maturation: time for a change of practice? *Hum Reprod Update* 17(4): 510–524.

Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T et al (2016) Ovarian kisspeptin expression is related to age and to monocyte chemoattractant protein-1. *J Assist Reprod Genet* 33(4):535-43.

Jamnongjit MHS (2005) Oocyte maturation: the coming of age of a germcell. *Semin Reprod Med* 23: 234–41.

Jayasena CN, Comminos A, Nijher G et al (2013) Twice-daily subcutaneous injection of kisspeptin-54 does not abolish menstrual cyclicity in healthy female volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 98(11): 4464–4474.

Jayasena CN, Nijher GMK, Comminos AN et al. (2011) The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 96(12): 1963–1972.

Jayasena CN (2011) The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 96(12): 1963–1972.

Jayasena CN (2013) Twice-daily subcutaneous injection of kisspeptin-54 does not abolish menstrual cyclicity in healthy female volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 98(11): 4464–4474.

Jesam C, Salvatierra AM, Schwartz JL et al (2010) Suppression of follicular rupture with meloxicam, a cyclooxygenase-2 inhibitor: potential for emergency contraception. *Hum Reprod* 25(2): 368–373.

Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, et al. (2005) Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122: 303–315

Kanasaki H, Purwana IN, Oride A et al (2013) Circulating kisspeptin and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) do not correlate with gonadotropin serum levels. *Gynecolo Endocrinol: Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 29: 583–587.

Khamsi F, Roberge S (2001) Granulosa cells of the cumulus oophorus are different from mural granulosa cells in their response to gonadotrophins and IGF-I. *J Endocrinol* 170: 565–573.

Kierszenbaum AL ve Tres LL (2012) *Histology and Cell Biology: An introduction to pathology* 3rd ed Philadelphia: Saunders.

Kol S, Adashi EY (1995) Intraovarian factors regulating ovarian function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 7: 209–213.

Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L et al (2005) Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* 3: 372–386.

Kroll H, Bolsover S, Hsu J et al (2011): Kisspeptin-evoked calcium signals in isolated primary rat gonadotropin-releasing hormone neurones. *Neuroendo* 93: 114–120.

- Latif R, Rafique N (2015) Serum kisspeptin levels across different phases of the menstrual cycle and their correlation with serum oestradiol. *Neth J Med* 73(4): 175-178.
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ et al (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 23: 1731–1737.
- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL (2010) Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 8: 3479–3489.
- Li M, York JP, Zhang P (2007) Loss of Cdc20 Causes a securin-dependent metaphase arrest in two-cell Mouse embryos. *Mol Cell Biol* 27: 3481–3482.
- Liang CG, Su YQ, Fan HY et al (2007) Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 21: 2037–2055.
- Lim H, Paria BC, Das SK et al (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell* 91: 197–208.
- Liu X, Lee K, Herbison AE (2008) Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons through a phospholipase C / calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology* 149: 4605-4614.
- Liu X, Lee K, Herbison AE (2008) Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology* 9: 4605–4614.
- Mansour R (2014) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2006. *Hum Reprod* 29(7): 1536–1551.
- Matsumoto H, Ma W, Smalley W et al (2001) Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation. *Biology of Reproduction* 64: 1557–1565.
- Mehlmann LM (2005) Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Dev Biol* 397–404.
- Merhi Z, Thornton K, Bonney E et al (2016) Ovarian kisspeptin expression is related to age and to monocyte chemoattractant protein-1. *J Assist Reprod Genet* 33(4): 535-543
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG et al (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 5: 1761–1766.

Mikuni M, Pall M, Peterson CM et al (1998a) The selective prostaglandin endoperoxide synthase-2 inhibitor, NS-398, reduces prostaglandin production and ovulation in vivo and in vitro in the rat. *Biology of Reproduction* 59: 1077–1083.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA et al (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276: 28969–28975.

Nakanishi T, Kubota H, Ishibashi N et al (2006) Possible role of mouse poly(A) polymerase mGLD-2 during oocyte maturation. *Dev Biol* 289 :115–26.

Nilsson EE, Skinner MK (2002) Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol. Reprod* 67: 1018–1024.

Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T et al (2003) Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. *Biol Reprod* 69: 1042–1052.

Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M et al (2009) Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 136:1869–1361878.

Nuttinck F, Reinaud P, Tricoire H, et al (2002) Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Mol Reprod Dev* 61: 93–101.

O'Shaughnessy PJ, Dudley K, Rajapaksha WR (1996) Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 125: 169–175.

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA (2009) Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 6: 713–743.

Ochsner SA, Russel DL, Richards JS (2003) Decreased expression of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice. *Endocrinology* 144: 1008–1019.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S et al (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411: 613–617.

Oktay K, Briggs D, Gosden R.G (1997) Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol* 82(11): 3748-3751

Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF et al (2001) Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem* 276: 11387–11392.

Otsuka F, Yao Z, Lee T et al (2000) Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275: 39523–39528.

Peng J, Tang M, Zhang BP et al (2013) Kisspeptin stimulates progesterone secretion via the Erk1/2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat luteal cells. *Fertil Steril* 99: 1436–1443.

Peng J, Xu H, Yang B et al (2010) Plasma levels of kisspeptins in postmenopausal Chinese women do not show substantial elevation. *Peptides* 31: 2255–8.

Peters H. (1969) The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 62: 98–116.

Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C et al (2012) Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* 92(3): 1235–1316.

Pompolo S, Pereira A, Scott CJ et al (2003) Evidence for estrogenic regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by glutamatergic neurons in the ewe brain: an immunohistochemical study using an antibody against vesicular glutamate transporter-2. *J Comp Neurol* 1: 136–144.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine (2008) Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 35: 301–342.

Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D et al (2004), NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305: 1157–1159.

Ramaswamy S, Seminara SB, Pohl C et al (2007) Effect of continuous intravenous administration of human metastin 45–54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 7: 3364–3370.

Reddy P, Shen L, Ren C et al (2005) Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in Mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev Biol* 281: 160–170.

Roa J, Vigo E, Castellano et al (2006) Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female rat. *Endocrinology* 147: 2864–2878

Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML (2007) Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 7: 2744–2750.

Ross MH (2011) *Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molacular Biology*. 6th edition ed. Vol. LWW: 6th edition.

Saadeldin IM, Koo OJ, Kang JT et al (2012) Paradoxical effects of kisspeptin: it enhances oocyte in vitro maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during in vitro culture. *Reprod Fertil Dev* 24(5): 656–668.

Schally AV, Arimura A, Kastin A. J et al (1971) Gonadotropin releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173(4001): 1036–1038.

Schmidt KL, Kryger-Baggesen N, Byskov AG et al (2005) Anti-Mullerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro, *Mol Cell Endocrinol* 234: 87–93.

Scott RT, Hofmann GE, Muasher SJ, et al (1989) Correlation of follicular diameter with oocyte recovery and maturity at the time of transvaginal follicular aspiration. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 6: 73–5.

Segaloff DL, Sprengel R, Nikolics K (1990) Structure of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Recent Prog Horm Res* 46: 261–301.

Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE et al (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349 (17): 1614–1627.

Shiina H, Matsumoto T, Sato T et al (2006) Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 103: 224–229.

Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I et al (2006) Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 20: 1352–1365.

Shimizu T, Wolfe LS (1990) Arachidnoic acid cascade and signal transduction. *Journal of Neurochemistry* 55: 1–15.

Sirois J, Sayasith K, Brown KA et al (2004) Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Human Reproduction Update* 10: 373–385.

Skorupskaitė K, George JT, Anderson RA (2014) The kisspeptins-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human Reproduction Update* 20 (4): 485–500.

Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ et al (2008) Variation in kisspeptin and RF amide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 11: 5770–5782

Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF et al (2005) Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 9: 3686–3692.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69: 145–182.

Szybek K (1972) In-vitro maturation of oocytes from sexually immature mice. *J Endocrinol* 54: 527–528.

Takahashi T, Morrow JD, Wang H et al (2006) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E₂ directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 281: 37117–37129.

Tanabe T, Tohnai N (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostagl Other Lipid Mediat* 68: 95–114.

Tanaka N, Espey LL, Kawano T et al (1991) Comparison of inhibitory actions of indomethacin and epostane on ovulation in rats. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 260: 170–174.

Teles MG (2008) A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 358(7): 709–715.

Teles MG, Bianco SD, Brito VN et al (2008) A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 7: 709–715.

Teramoto S, Osada H, Sato Y et al (2016) Nondominant small follicles are a promising source of mature oocytes in modified natural cycle in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 106 (1): 113-118

Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE et al (2009). Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol Reprod* 81(1): 16–25.

Tokuyama O, Nakamura Y, Muso A et al (2001) Expression and distribution of cyclooxygenase-2 in human periovulatory ovary. *Int J Mol Med* 8(6): 603-606.

Tokuyama O, Nakamura Y, Musoh A et al (2003) Expression and distribution of cyclooxygenase-2 in human ovary during follicular development. *Osaka City Med J* 49(1): 39-47

Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE et al (2000) A maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat. Genet* 26: 267–268.

Uenoyama Y, Inoue N, Pheng V et al (2011) Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of axo-axonal regulation of GnRH release. *J Neuroendocrinol* 10: 863–870.

- Vaccari S, Horner K, Mehlmann LM et al (2008) Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Dev Biol* 316: 124–134.
- Van der Linden M, Buckingham K, Farquhar C et al (2011) Luteal phase support for assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst*(10): CD009154.
- Vitt UA, Hayashi M, Klein C et al (2000) Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 62: 370–377.
- Waleed FM, Abayasekara DR, Wathes DC et al (2014) Role of PTGS2-generated PGE2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. *Reproductive BioMedicine Online* 28: 388– 400
- West A, Vojta PJ, Welch DR et al (1998) Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 1: 145–148.
- Winston NJ (1997) Stability of cyclin B protein during meiotic maturation and the first mitotic cell division in mouse oocytes. *Biol Cell* 89: 211–9.
- Wittmaack FM, Kreger DO, Blasco L et al (1994) Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in in vitro fertilization cycles: a 6-year data collection. *Fertil Steril* 62: 1205–1210.
- Wu X, Wang P, Brown CA et al (2003) Zygote arrest 1 (Zar1) is an evolutionarily conserved gene expressed in vertebrate ovaries. *Biol Reprod* 69: 861–867.
- Yamashita Y, Okamoto M, Kawashima I et al (2011) Positive feedback loop between prostaglandin E2 and EGF-like factors is essential for sustainable activation of MAPK3/1 in cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Biol Reprod* 85: 1073–1082.
- Yan C, Wang P, DeMayo J et al (2001) Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 15: 854–866.
- Yoshino O, McMahon HE, Sharma S et al (2006) A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the Mouse. *Proc Natl Acad Sci* 103: 10678–10683.
- Youssef MA (2011) Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte triggering in antagonist assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst* 11 (5): CD001750.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

AC : Adenil siklaz
AKT : protein kinaz B
AMH : Anti-Müllerian hormon
AVPV : Anteroventral periventriküler çekirdekler
BMP15: Bone morphogenetic protein 15
BMP6 : Bone morphogenetic protein 6
Ca⁺²: Kalsiyum
cAMP : Siklik adenozin monofosfat
cGMP : Siklik guanozin monofosfat
CNP : c- tip natriuretic peptit
Cox-1: Siklooksijenaz-1
Cox-2: Siklooksijenaz-2
Cx37: Konneksin 37
Cx43: Konneksin 43
E2: Östrodiol
EGF-I : Epidermal growth faktör benzeri peptit
ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases
FOXO3a : Forkhead box O3
FSH : Follikül stimüle edici hormon
GDF9 : Growth differentiation factor 9
GnRH : Gonadotropin salgılatıcı hormon
GPR 12 : G-protein reseptör -12
GPR 3: G-protein reseptör -3
hCG : İnsan koryonik gonadotropini
ICSI : İntra-sitoplazmik sperm enjeksiyonuna
IGF : Insulin Growth Faktör
IVM: İn vitro matürasyon
KISS1/KP : Kisspeptin
KISS1R /GPR54 : Kisspeptin reseptörü
KIT: Proto-oncogene receptor tyrosine kinase
KL : KIT ligand
LH: Lüteinize edici hormon
LHR : Luteinizan hormon reseptör
MPF : Mayoz başlatıcı faktör ()
Nobox : Newborn Ovary Homeobox-Encoding Gene
Npr2 : Natriüretik peptit reseptör 2
NSAID : Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar
PDE3A : Fosfodiesteraz 3A
PGE2 : Prostaglandin E2
PGH: Primordiyal germ hücreleri
PGHS : Prostaglandin G/H sentaz
PGS : Prostaglandin sentaz
PGTS : Prostaglandin endoperoksit sentaz
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKA : Protein kinaz A
PKC : Protein kinaz C
PTEN : Phosphatase and tensin homolog
Sohlh1: Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1
TGFB : Transforming growth factor
TSC1 : The tumor suppressor tuberous sclerosis complex 1
YAP: Yes associated protein
ZP: Zona pellucida



8.EKLER

8.1 Şekil Listesi

Şekil 1: Primordial Follikül (Ross 2011)

Şekil 2: Ünilaminar primer folliküller (Ross 2011)

Şekil 3: Multilaminar primer folliküller (Ross 2011)

Şekil 4: Sekonder folliküller (antral) (Ross 2011)

Şekil 5: Matür (graaf) folliküller (Ross 2011)

Şekil 6: TVUSG follikül çap ölçümü

8.2 Grafik Listesi

Grafik 1: Hasta İnfertilite Etyolojileri Dağılım Yüzdesi

Grafik 2: Relatif Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviyeleri (a-c);
Relatif Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviye değişimleri (d)

Grafik 3: Relatif Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviyeleri (a-c);
Relatif Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 mRNA ekspresyon seviye değişimleri (d)

8.3 Tablo Listesi

Tablo 1: Gruplara göre örnek dağılımı

Tablo 2: Genlere ait primerler dizaynları

Tablo 3: Hasta Karakteristik Özellikleri Dağılımı

Tablo 4: Follikül Ortalama Çapları

Tablo 5: Gruplara göre follikül çapı ile follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonlarının korelasyonu

Tablo 6: Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

Tablo 7: Serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

Tablo 8: Gruplar arasında serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

Tablo 9: Grup içi serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

Tablo 10: Follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

Tablo 11: Gruplar arasında follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

Tablo 12: Grup içi follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

Tablo 13: Serum ve follikül sıvısı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları korelasyonu

Tablo 14: Serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları ile hasta karakteristik özellikleri ve endokrin parametrelerinin korelasyonu

Tablo 15: Ovulasyon indüksiyon yöntemi ile serum Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

Tablo 16: Folliküler sıvı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları ile hasta karakteristik özellikleri ve endokrin parametrelerinin korelasyonu

Tablo 17: KOH ile folliküler sıvı Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 konsantrasyonları

Tablo 18: Kumulus hücrelerinde Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 ekspresyon seviyeleri miktar, güvenilirlik değeri, p değeri

Tablo 19: Oosit Kiss1, Kiss1R ve Cox-2 ekspresyon seviyeleri miktar, güvenilirlik değeri, p değeri

9.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, değerli bilgi ve deneyimleri ile eğitimimi sağlayan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı değerli Öğretim Üyelerinden tez danışmanım Doç. Dr. Berrin AVCI 'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Semiha ERSOY ve diğer Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Şahin A. SIRMALI, Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU, Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ, Prof. Dr. Zehra MİNBAY ve Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR' e eğitim sürecimdeki tüm emeklerinden ötürü teşekkür ederim.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkez Sorumlusu Prof. Dr. Gürkan UNCU ve Uzm. Dr. Işıl KASAPOĞLU başta olmak üzere ve tüm çalışanlarına tez süresinde ki emeklerinden dolayı teşekkür ederim. Merkez Embriyoloji laboratuvarı çalışanlarından Seda SARIBAL'a tez sürecindeki yardımlarından ötürü ayrıca teşekkür ederim.

Laboratuvar imkanlarını esirgemeyen ve tecrübeleriyle yol gösteren Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Barbaros ORAL ve Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ferah BUDAK'a teşekkür ederim.

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm asistan arkadaşlarıma ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak, beni yalnız bırakmayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Göktan KUŞPINAR

10.ÖZGEÇMİŞ

11 Ağustos 1988 yılında Kayseri’ de doğdu. İlk ve orta okul eğitimini TED Kayseri Koleji’nde 2001 yılında, lise eğitimini Küçükçalık Anadolu Lisesi’nde 2006 yılında tamamladı. 2007 - 2011 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik lisans eğitimini takiben 2013 yılından itibaren Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.