

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AZALMIŞ OVER REZERVİ BULUNAN ERKEK DIŞI FAKTÖRE
BAĞLI PRİMER İNFERTİL KADINLARDA MİKORNA
SEVİYELERİ DEĞİŞİKLİĞİ**

Gözde KAYA

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2020

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AZALMIŞ OVER REZERVİ BULUNAN ERKEK DIŞI FAKTÖRE
BAĞLI PRİMER İNFERTİL KADINLARDA MİKRORNA
SEVİYELERİ DEĞİŞİKLİĞİ**

Gözde KAYA

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Serdar FİLİZ

BAP Proje Numarası: KOU Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi 2018/054

Etik Kurul Onay Numarası: KOÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu KİA 2015/216

KOCAELİ

2020

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Azalmış Over Rezervi Bulunan Erkek Dışı Faktöre Bağlı Primer İnfertil Kadınlarda MikroRNA Seviyeleri Değişikliği

Tez yazarı: Gözde KAYA

Tez savunma tarihi: 06.03.2020

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serdar FİLİZ

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURUL ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN (ÜYE)	Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN	
DANIŞMAN	Prof. Dr. Serdar FİLİZ	
ÜYE	Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ	
ÜYE	Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK	
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Özge Senem YÜCEL ÇİÇEK	
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU	

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2020

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Azalmış Over Rezervi Bulunan Erkek Dışı Faktöre Bağlı Primer İnfertil Kadınlarda MikroRNA Seviyeleri Değişkenliği

Amaç: Çalışmamızda azalmış over rezervi (AOR) bulunan erkek dışı faktöre bağlı infertil kadınların ovaryum folikül sıvılarında miRNA seviyeleri değişkenliklerini göstermeyi hedefledik. Bu sayede ekspresyonu gözlenen miRNA'ların kadın infertilitesinde noninvaziv belirteç olarak kullanılmasının önünü açmayı amaç edindik. Birçok biyolojik mekanizma miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir. Fakat infertilite nedenlerinden birisi olan AOR'da miRNA'nın rolüyle ilgili araştırma bulunmamaktadır. Üreme metabolizması ile miRNA arasındaki ilişkinin kurulması ve hangi miRNA tiplerinin bu süreçte rol oynadığının gösterilmesi bu tarz üreme hastalıklarının tedavisinde miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılmasını sağlayacaktır.

Yöntem: Çalışmamıza AOR hasta grubundan 62, kontrol grubu olarak 10 hasta dahil edildi. Hastalardan elde edilen folikül sıvılarından miRNA izolasyonu sağlandı. Ardından miRNA miktarları ölçülerek cDNA sentezi gerçekleştirildi ve Gerçek Zamanlı PCR ile ekspresyonları gözlemlendi. Sonuçlar elde edilen eşik döngüsü değerlerinin REST programına girilmesi ile değerlendirildi.

Bulgular: Hsa-miR-21 geninin ekspresyonunun AOR hasta grubunda (n=62), sağlıklı kontrol grubu (n=10) hastalarına göre 3.96 kat azaldığı saptanmıştır. Hsa-miR-27, Hsa-miR-144, Hsa-miR-146 ve Hsa-miR-190 genlerinin ekspresyonlarına sağlıklı kontrol grubu ve AOR hasta grubunda rastlanmamıştır.

Sonuç: miR21 geninin ekspresyonunun AOR hastalarının folikül sıvılarında azalması, miR21'in AOR için belirleyici bir gen olabileceğini göstermiştir. Ancak miRNA'ların bu tip hastalıkların patolojisinde ki yerlerinin tam olarak anlaşılması için daha fazla sayıda ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu konuyla ilgili elde edilen verilerin bu grup infertil hastalara gen terapisi veya benzeri yöntemlerle tedavinin önünü açabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Sözcükler: infertilite, azalmış over rezervi, mikroRNA, oosit

İNGİLİZCE ÖZET

Variability in MikroRNA Levels among Diminished Ovarian Reserve in Primary Infertile Women out of Male Factor

Objective: The aim of this study is to show the variability of miRNA levels in ovarian follicular fluid taken from primary infertile women with diminished ovarian reserve (DOR) without male factor. In this way, we aimed to pave the way for the use of miRNAs whose expression is observed as a noninvasive marker in female infertility. Many biological mechanisms are regulated by miRNAs. However, there is no research on the role of miRNA in AOR which is one of the causes of infertility. Determination of the relationship between reproductive metabolism and miRNA and demonstrating which types of miRNA play a role in this process will enable miRNAs to be used as biomarkers in the treatment of this kind of reproductive diseases.

Method: We included 62 patients in the AOR group and 10 patients in the control group. MikroRNA isolation was obtained from patients follicle fluids. Subsequently, cDNA synthesis was performed by measuring miRNA amounts and their expression was observed by Real Time PCR. The results were evaluated by entering the obtained crossing point values into the REST program.

Results: Expression of the hsa-miR-21 gene decreased by 3.96 times in the DOR patient group (n = 62) compared to the healthy control group (n = 10) patients. Expressions of Hsa-miR-27, Hsa-miR-144, Hsa-miR-146 and Hsa-miR-190 genes were not found in healthy control group and DOR patient group.

Conclusions: The reduction of miR21 gene expression in follicle fluids of DOR patients has shown that miR21 may be a determinant gene for DOR. However, further research is needed to completely understand the role of miRNAs in the pathology of such diseases. We believe that the data obtained on this subject may pave the way for treatment of this group of infertile patients by gene therapy or similar methods.

Key words: infertility, diminished ovarian reserve, microRNA, oocyte

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serdar FİLİZ'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan değerli Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin RT-PCR ile ilgili deney ve değerlendirmelerinde büyük emeği olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Dr. Öğretim Üyesi Deniz SÜNNETÇİ AKKOYUNLU'ya, Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye ve Uzm. Biyolog Büşra YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin istatistik çalışmalarında her türlü yardım ve desteği sağlayan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Canan BAYDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde fikir ve önerileriyle bana destek olan değerli çalışma arkadaşım Uzm. Embriyolog Begüm ALYÜRÜK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu süreçte de yanımda olarak bana destek veren aileme, sevgili eşim Anıl Aytaç KAYA'ya ve biricik kızım Nil Derin KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Gözde KAYA

KOCAELİ, Mart 2020

ETİK KURUL ONAYI



KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMA ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Birimi Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
TELEFON	0262 303 71 64 – 74 50
FAKS	0262 303 74 63
E-POSTA	etikkurul@kocaeli.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Azalmış Over Rezervi Bulunan Erkek Dışı Faktöre Bağlı Primer Infertil kadınlarda MicroRNA Seviyeleri Değişikliği			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	KOÜ KAEK 2015/216			
	EUDRACT NUMARASI				
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Serdar Filiz			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Histoloji&Embriyoloji			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doktora Öğrencisi Gözde Kaya			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji&Embriyoloji			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Bebek Ünitesi-Histoloji&Embriyoloji ABD			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA (DOKTORA TEZİ)			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	ÇOK MERKEZLİ	ULUSAL	ULUSLARARASI	
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarih	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	10.07.2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer		
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	10.07.2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer			
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer			

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>	
SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		TÜBİTAK & KOÜ Bilimsel Araştırmalar Fonu
BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
İLAN	<input type="checkbox"/>		
YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER	<input type="checkbox"/>		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 4/13	Proje No: KOU KAEK 2015/216	Tarih : 14.07.2015
	Prof. Dr. Serdar Filiz sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen Klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420), Hasta Hakları Yönetmeliği Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik (8 Mayıs 2014/ 28994), Helsinki Bildirgesi (2008), İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (Nisan 2013),ICH/GCP-Guideline for Good Clinical Practice (10 Haziran 1996)İnsan Denekleri İçeren Biyomedikal Araştırmaların Uluslar arası Rehber Kuralları (CIOMS, 2002), Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (10 Mart 2011/6212), Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesi (4 Nisan 1997), Ek Madde - 10 (6 Nisan 2011, 6225)) Resmî Gazetede 13.04.2013 tarih ve 28617 sayı ile yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (25 Haziran 2014/29041)
---------------	--

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: PROF. DR. NERMİN ERSOY
ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Nermin ERSOY Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	KOÜ Tıp Fak. Tıp Tarihi ve Etik AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	N. Ersoy
Prof. Dr. Dilek URAL Başkan Yrd.	Kardiyoloji	KOÜ Tıp Fak. Kardiyoloji AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	D. Ural
Prof. Dr. B. Faruk ERDEN Üye	Farmakoloji	KOÜ Tıp Fak. Farmakoloji AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	B. Faruk Erden
Prof. Dr. Gülcan TÜRKER Üye	Pediyatri	KOÜ Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hst.AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	G. Türker
Prof. Dr. Yavuz GÜRKAN Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	KOÜ TF Anesteziyoloji ve Reanimasyon	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Y. Gürkan
Prof. Dr. Hale M. KIR Üye	Biokimya	KOÜ Tıp Fak. Biokimya AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	H. M. Kir
Doç. Dr. Ayşe KARSON Raportör	Fizyoloji	KOÜ Tıp Fak. Fizyoloji AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	A. Karson
Uzm. Dr. Murat GÜVEN Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Derince Eğt. ve Arş. Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	M. Güven
Uzm. Dr. Berna A. ŞERİFİ Üye	Halk Sağlığı	İzmit 1 Nolu AÇSAP	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	B. A. Şerifi
Ersayın IŞIK Üye	Avukat	Kocaeli Barosu	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E. Işık
Yasemin ÖLSOY Üye	Hasta Hakları Temsilcisi	Ev Hanımı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Y. Ölsöy
Yrd. Doç. Dr. Önjen TAK	Danışman Dış Hekimi	KOU . Dış Hekimliği Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	O. Tak

* :Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Değerlendirme Formu
28 Nisan 2009 Versiyon No:1

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

06 / 03/ 2020

Gözde KAYA

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ÖZET	İİİ
İNGİLİZCE ÖZET	V
TEŞEKKÜR	VI
ETİK KURUL ONAYI	VII
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	İX
İÇİNDEKİLER.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
ÇİZİMLER DİZİNİ	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Dişi Üreme Sistemi.....	1
1.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi	1
1.1.2. Ovaryumun Anatomisi.....	3
1.1.3. Ovaryumun Histolojisi.....	5
1.2. İnfertilite	21
1.2.1. İnfertilitede Tanı Yöntemleri	21
1.2.2. Overlere ilişkin faktörler.....	22
1.2.3. Ovulasyon faktörlü infertilitenin araştırılması.....	26
1.2.4. Yapısal faktörlerin araştırılması.....	30
1.2.5. Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT).....	32
1.2.6. İnfertilite ve Azalmış Over Rezervi.....	35
1.2.7. MikroRNA (miRNA).....	37
1.2.8. MikroRNA 21 (miR-21)	50
1.2.9. MikroRNA 27 (miR-27)	53
1.2.10. MikroRNA 144 (miR-144)	54
1.2.11. MikroRNA 146 (miR-146)	55
1.2.12. MikroRNA 190 (miR-190)	56
2. AMAÇ	57
3. YÖNTEM	59
3.1 Situmulasyon Protokolü	59
3.2 Folikül Sıvısından miRNA İzolasyonu:	59
3.3. MikroRNA'ların Miktar ve Saflık Analizleri.....	60
3.4. cDNA Sentezi:.....	60
3.5. Real Time PCR:.....	61
3.6 Analiz..	62
3.6.1. Sonuçların Okunması.....	62
3.6.2.Sonuçların REST ile değerlendirilmesi	62
3.8 Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar.....	64
3.8.1.Kimyasal Malzemeler	64

3.8.2. Cihazlar	65
4. BULGULAR	66
4.1. RT-PCR Bulguları	66
4.2. Klinik ve Laboratuvar Bulguları.....	66
5. TARTIŞMA.....	71
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	93



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl: Mikrolitre

AFC: Antral Folikül Sayısı

AGO: Argonaute RISC Catalytic Component

AMH: Anti-Müllerien Hormon

AOR: Azalmış Over Rezervi

AP: Aktivasyon Proteini

ART: Yardımlı Üreme Teknolojileri

BKİ: Vücut Kitle İndeksi

BMP: Kemik Morfogenetik Protein

CCCT: Klomifen Sitrat Challenge Testi

EFORT: Eksojen Folikül Stimule Edici Hormon Over Rezerv Testi

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

ELF: Ökaryotik Başlatıcı Faktör

EMB: Endometriyal Biyopsi

EMT: Epitayal-Mezenkimal Geçiş

ER: Endoplazmik Retikulum

ET: Embriyo Transferi

E2: Estradiol

FFPE: Formalinle Fiksasyon Parafin Gömme

FISH: Floresan in Situ Hibrizasyon

FSH: Folikül Stimule Edici Hormon

FX: Finger X-Kromozomal Protein Geni

GAST: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon Agonist Uyarı Testleri

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon

HDLS: Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler

HSG: Histerosalpingografi

ICSI: Intra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IGF: Intra Foliküler Over İnsülin Büyüme Faktörü
IRAK: Interlökin Reseptör ile İlişkili Kinaz
ISH: In-Situ Hibridizasyon
IU: Ünite
IVF: In Vitro Fertilizasyon
KL: Korpus Luteum
KOH: Kontrollü Overyan Hiperstimülasyonu
LH: Luteinleştirici Hormon
LNA: Nükleik Asit Problemleri
MiRNA: Mikro Ribonükleik Asit
OMI: Oosit Maturasyon İnhibitörü
PCOS: Polikistik Over Sendromu
PDK: Fosfoinositid Bağımlı Kinaz
PGH: Primordiyal Germ Hücreleri
PMA: Forbol Miristik Asit
POF: Prematür Over Yetmezliği
pRB: Retinoblastoma Proteini
PTC: Papiller Tiroid Kanseri
pTEN: Fofotaz ve Tensin Homolog
REST: Relative Expression Software Tool
RP: Ribozomal Protein
TLN: Talin
TM: Erime Sıcaklıkları
TRAF: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü ile İlişkili Faktör
TSC: Tuberous Schlerosis Complex
TSS: Transkripsiyonel Başlangıç Bölgesi
USG: Ultrasonografi
VCD: Vinilsikloheksen Difoksit
VIP: Vazoaktif İntestinal Peptid

WT: Wilms tümörü baskılayıcı geni

YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri



ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. 5-6 haftalık embriyoda primordiyal germ hücrelerinin göçü, farklanmamış gonadlar, mezonefrik ve paramezonefrik kanallar	2
Çizim 1.2. Ovaryumun anatomisi.	4
Çizim 1.3. Ovaryum dokusunun hematoksilin-eozin ile boyanmış kesit görüntüsü...6	
Çizim 1.4. Primordiyal ve primer foliküller	7
Çizim 1.5. Folikül gelişimi	9
Çizim 1.6. Olgun bir folikül (Graaf folikülü).....	11
Çizim 1.7. PTEN/fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) sinyal yolağı	15
Çizim 1.8. İnfertilite tanısı ve tedavi algoritması: HSG, histerosalpingografi.....	22
Çizim 1.9. Histerosalpingografi (HSG)	30
Çizim 1.10. Histeroskopi	31
Çizim 1.11. İntrauterin İnseminasyon.....	33
Çizim 1.12. İn vitro Fertilizasyon (IVF).....	34
Çizim 1.13. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu.....	34
Çizim 1.14. Hayvan hücrelerinde miRNA biyogenezinin şematik gösterimi.....	39
Çizim 1.15. pri-miR-21'in genomik lokasyonu	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Termal Döngüleri.....	60
Çizelge 3.2. Deney Döngüleri.....	61
Çizelge 3.3. Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri	62
Çizelge 3.4. Kontrol ve Hasta grupları arasında biyokimyasal gebelik oranlarının karşılaştırılması.....	63
Çizelge 4.1. Yapılan RT-PCR sonucu elde edilen AOR grubu	66-67-68
Çizelge 4.2. Yapılan RT-PCR sonucu elde edilen kontrol grubu.....	69

1. GİRİŞ

1.1. Dişi Üreme Sistemi

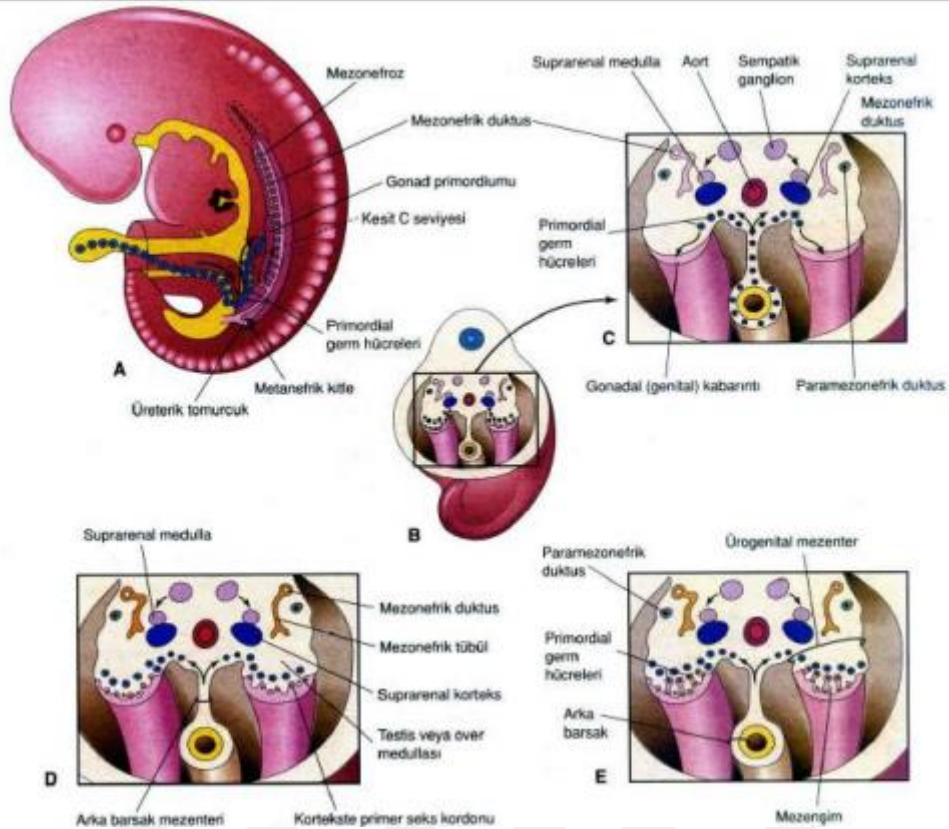
Dişi üreme sistemi; iç genital organlar olan iki ovaryum, iki tuba uterina (fallop tüpleri), uterus ve vajina ile dış genital organlardan oluşur. Bu sistem puberte ile menapoz arasında histofizyolojik döngüsel değişikliklere uğrar ve bu değişimler hormonal mekanizmaların kontrolündedir.

1.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak döllenme sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar, erkek ya da dişi yapısal özelliklere sahip değildir. Gonadlar başlangıçta sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş, bir çift uzunlamasına düzenlenmiş gonadal kabartılar halinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına değin genital kabartılar içinde germ hücreleri gözlenmez.

Primordiyal germ hücreleri ilk kez, gelişimin 4. haftasında vitellus kesesinin allontoise yakın duvarında endoderm hücrelerinin arasında gözlenir. Sonbağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek, 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşır ve 6. haftada da genital kabartılara ulaşırlar (Çizim 1.1). Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonad gelişimi gerçekleşmez. Gonadların ovaryum ya da testise farklılaşmasında primordiyal germ hücrelerinin uyarıcı etkisi vardır. Primordiyal germ hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından önce ve ulaşması sırasında, genital kabartıların epiteli çoğalır ve hücreler altlarındaki mezenşimin içine girerler. Burada, primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz kolonlar oluşturulur. Erkek ve dişi embriyolarda primitif cinsiyet kordonları yüzey epiteline bağlıdır ve bu aşamada, erkek ya da dişi gonadların birbirinden ayırt edilebilmesi imkansızdır. Bu yüzden, bu evreye farklılaşmamış dönem, gonada da farklılaşmamış gonad denir (Sadler 2005).

Dişi embriyolarında gonadal gelişim erkek embriyolara göre daha yavaştır. X kromozomları ovaryumun gelişimi için gerekli genler içerir; ovaryum gelişmesinde otozomal bir genin rol oynadığı bilinmektedir. 10. haftaya kadar, ovaryumlar histolojik olarak ayırt edilmezler. Primitif cinsiyet kordonları dişi embriyolarda erkek embriyolaradaki kadar fark edilir değildir. Gonad taslağının medullasına kadar devam ederler ve gelişmemiş bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Normalde rete ovarii ve primitif cinsiyet kordonları dejenere olarak ortadan kaybolurlar ve yerlerini ovaryumun medullasını oluşturan stromaya bırakırlar.



Çizim 1.1: 5-6 haftalık embriyoda primordiyal germ hücrelerinin göçü, farklanmamış gonadlar, mezonefrik ve paramezonefrik kanallar gözlenmektedir. (Moore ve Persaud 2009)

Erken fõtal dönemde kortikal kordonlar olarak adlandırılan ikinci cinsiyet kordonları, gelişen gonadın yüzey sõlom epitelinin başlayarak, alttaki mezenşime doğru ilerlemeye başlar. Kortikal kordonlar sõlom epitelinin çoğalmasıyla kalınlaşırken, primordiyal germ hücreleri kordonların içine katılırlar. 16. haftada bu kordonlar primordiyal folikül denilen ayrı hücre gruplarına ayrılırlar. Her grup ortada primordiyal germ hücrelerinden gelişen bir oogonyum ve çevresinde kortikal kordon epitelinin gelişen tek sıra yassı folikül hücrelerinin bulunduğu primordiyal folikülleri oluşturur. Ovaryum folikülleri biçimlenirken yüzey epiteliyle olan bağlantılarını kaybederler. Yüzey epiteli ile ovaryum korteksi arasında tunika albuginea adı verilen ince fibröz bir kapsül oluşur. Mezonefroz gerilerken, ovaryum mezonefrozdan ayrılır ve mezovaryum denilen kendi mezoteliyle vücut duvarına asılır.

Fõtal dönemde 9. haftadan itibaren primordiyal germ hücreleri oogonyumlara farklılaşır ve mitoz bölünme ile sayıları hızla artar. 12. haftadan itibaren oogonyumlar primer oosite farklılaşmaya başlarlar. Primer oosite farklılaşanlar hemen 1. mayoz bölünmeye girerek profaz evresinde duraklarlar. Doğumdan öncesi, oogonyumların büyük bir bölümü dejenere olurken geriye kalan oogonyumlar gelişerek primer oositlere

dönüşürler. Primer oositlerin birçoğu doğum öncesi dejenere olur. Doğum sonrasında oogonyum oluşmaz. Doğumdan sonra iki milyon kadar primer oosit geriye kalır. Doğum sonrası ovaryum yüzey epiteli düzleşir. Ovaryum hilusunda, periton mezoteliyle devam eder (Moore ve Persaud 2009).

1.1.2. Ovaryumun Anatomisi

Ovaryumlar, iri badem büyüklüğünde, pelviste sağ ve solda kendilerine ait oyuntulara (fossa ovarica) yerleşik organlardır.

Embriyonel hayatın başlangıcında ovaryumlar, intraabdominal yerleşimliken, gelişimin ikinci ayından itibaren pelvis boşluğuna doğru inmeye (descensus ovarii) başlarlar. Bu süreç testisin inişine göre daha kısa zamanda tamamlanır. Ovaryumlar bu hareketle pelvis minorun duvarındaki fossa ovarica (Krause çukuru) adındaki çukurlara yerleşirler (Gövsa 2003). Fossa ovarica, arteria (a.) iliaca externa ile A. iliaca interna arasındadır. İlk gebelikte ovaryumlar, uterus ile karın boşluğuna çekilirler ve bir daha eski yerlerine dönemezler. Çoklu doğumlarda ovaryumlar biraz daha aşağıda yer alır.

Tuba uterinanın arka ve alt kısmında bulunan ovaryumlar, lig. latum uteri içinde yer alırlar. Uzun eksenini neredeyse vertikal yöndedir. Pembemsi-gri renkli olan ovaryumların yüzü ergenlik çağına kadar peritonla örtülü olup parlak ve düzdür. Puberteden sonra periton özelliğini kaybeder ve matlaşır. Ovulasyon ve doğurmaya koştur olarak da üzeri pürüzlü bir görünüm kazanır (Arıncı ve Elhan 2001).

1.1.2.1. Anatomik bölümleri

Ovaryumun anatomik olarak facies lateralis ve medialis adında iki yüzü, margo liber ve margo mesoovaricus adında iki kenarı ve extremitas tubaria ve extremitas uterina adında iki ucu bulunur.

Facies medialis: Tuba uterina ile çevrilidir. Pelvis boşluğunu görür. İnce bağırsak ve sigmoid kolon ile komşudur. Mesosalpinx ile iç yüz arasında bursa ovarica adında periton çıkması vardır. Arka kısmı ise tuba uterinanın infundibulumu ile yan yanadır.

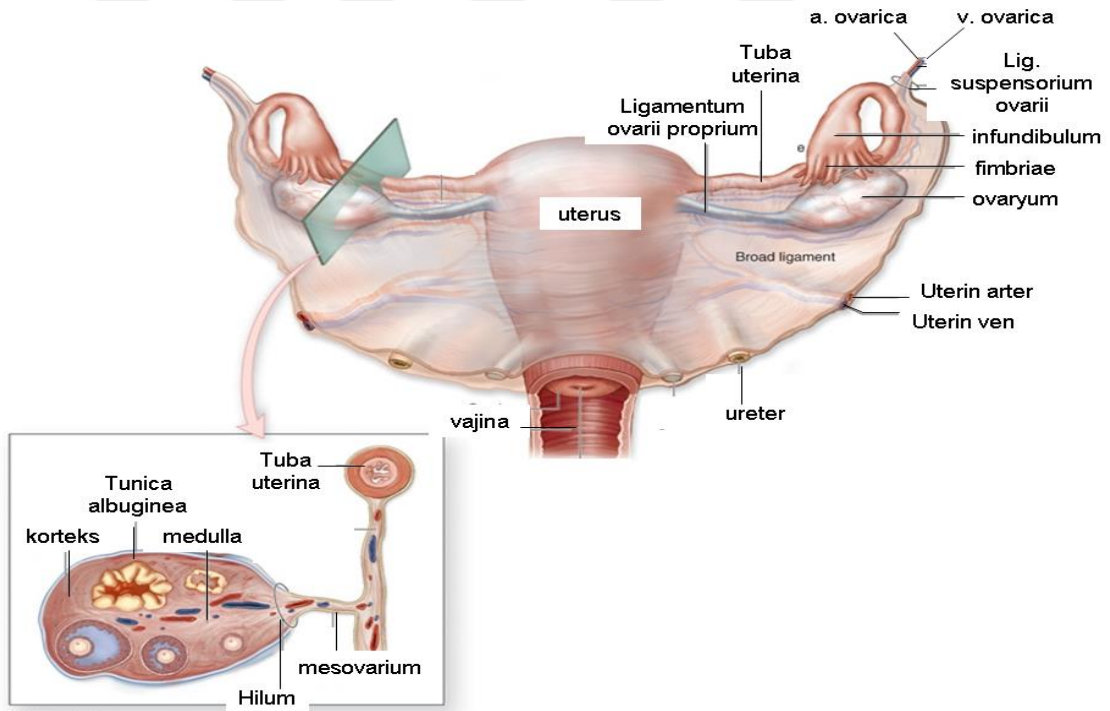
Facies lateralis: Pelvis duvarına bakan kısımdır. Bu kısım düze yakın bir içbükeylik gösterir. Facies lateralis, fossa ovarica adındaki çukura, paryetal peritonla örtülü olarak yerleşiktir.

Margo liber: Arka kenar ya da serbest olarak adlandırılır. Bu kenar hareketlidir. Ön kenardan daha içbükeydir. Margo liber, a. iliaca interna, venae (v.) iliaca interna ve ureter ile yan yanadır.

Margo mesovaricus: Ön kenardır ve bu kenara mesovarium adında ve ovaryumu ligamentum latum uteri'ye bağlayan periton katlantısı tutunur. Bu tutunma çizgisine Farre-Waldeyer çizgisi adı verilir. Mesovarium içinde yer alan damar ve sinirlerin, bu kenar üzerinde, organa giriş çıkış yaptıkları yer hilum ovarii olarak adlandırılır.

Extremitas tubaria: Üst kısımdaki ucundan, tuba uterinanın infundibulum parçası ile komşudur. Ayrıca fimbriae tubae ve ligamentum (lig.) suspensorium ovarii olarak adlandırılan içinde ovaryuma ait ven, arter ve sinirlerin bulunduğu periton kıvrımı bulunur.

Extremitas uterina: Alt kısımdaki uçtur ve üst uçtan daha da dardır. Lig. ovarii proprii adında ve fibröz dokudan oluşmuş olan bir bağ, ovaryumun alt ucundan uterusun dış köşesine tutunur. Bu ligament, ligamentum latum uterinin içindedir ve düz kas lifleri bulundurulur.



Çizim 1.2. Ovaryumun anatomisi. Herbrandson (2005)'den alınmıştır.

a. Ovaryumun Arterleri: Aorta abdominalis'ten çıkan a. ovarica'lar birinci Lumbar vertebra hizasında aorta abdominalis'ten ayrılan a. ovarica, lig. ovarii suspensorium içerisinde devam eder ve mesovariuma gelir. Burada a. uterina'nın bir dalı olan ramus ovaricus ile anastomozlaşır. Hilum ovarii'den organa giren arter, medulla-korteks sınırında oluşturduğu pleksustan dağılan dallarıyla, foliküllerin etrafını çevreleyen zengin kapiller ağırları oluşturur. Damarların çapı döngü evrelerine göre değişiklik gösterir.

Damarlar foliküllerin gelişimi sırasında daha geniştir. Ovulasyon sonrasında ise daralır (Çizim 1.2).

b. Ovaryumun Venleri: Önce plexus ovaricus denen venöz bir ağ oluşur. Buradan çıkan venler birleşerek az bölümü plexus uterovaginalis'e, büyük bir bölümü ise lig. ovarii suspensorum içerisindeki v. ovarica'ya açılırlar. v. ovarica, a. ovarica'larla birlikte devam ederler. Sol taraf v. renalis'e, sağ tarafı ise v. cava inferior'a doğru açılır.

c. Ovaryumun Lenf Damarları: Kan damarlarıyla birlikte devam ederler. Nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'lere doğru açılırlar.

d. Ovaryumun Sinirleri: Plexus hypogastricus inferior (ya da plexus pelvici) ve a. ovarica'nın etrafındaki plexus ovaricus'dan gelir. Parasempatikleri 10. kafa çifti nervus vagus'tan, sempatikleri ise n. splanchnicus minor ve bir kısmı ise torakal medulla spinalis segmentlerinden gelir (Erkoçak 1982).

1.1.3. Ovaryumun Histolojisi

Ovaryumlar, boyu yaklaşık 3cm, eni 1,5cm ve kalınlığı 1cm olan badem biçiminde organlardır.

Ovaryumun üç katmanı vardır:

Epitel katı: Ovaryumun yüzeyini örter ve tek sıra kübik epitelden oluşmuştur. Germinatif epitel olarak da isimlendirilir. Epitelin peritona bakan kısmında mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyalar gözlenir. Hücre sitoplazması mitokondriler ve pinositoz veziküllerinden yana zengindir.

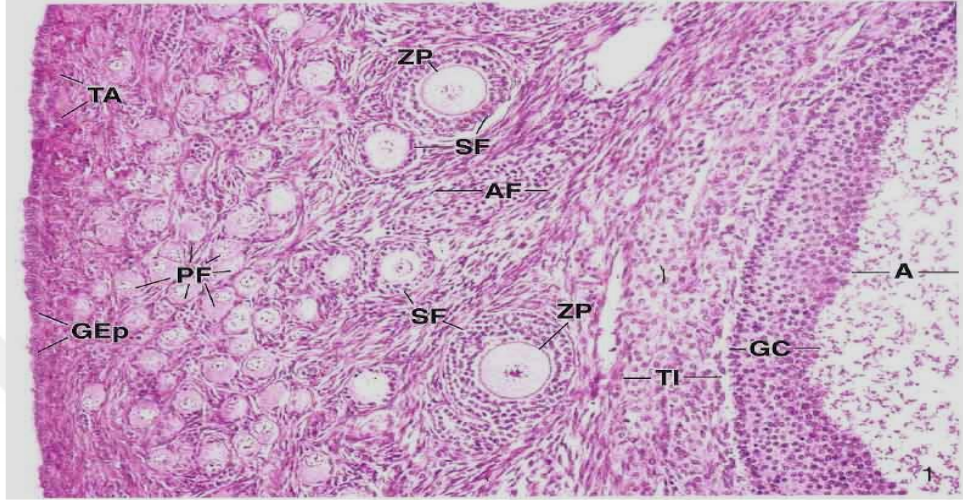
Tunika albuginea: Bağ dokusundan yapılmış tabakadır. Yaş ilerledikçe kalınlaşır. Az damarlı, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır ve kollajen lifler yüzeye paralel demetler oluşturmuştur.

Ovaryum stroması: Ovaryumun destek dokusudur. Ovaryumlar dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki kısımdan oluşur (Gövsa 2003).

a.Korteks: Organın dış kısmındaki işlevsel bölümdür. Çeşitli gelişim basamaklarındaki ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapılarını içerir. Korteks stromasında elastik, kollajen lifler ile ince uzun mekik şeklinde stroma hücreleri bulunur. Stroma hücreleri fibroblastlardan farklı olarak hormon salgılayan teka interna hücrelerine değişebilen hücrelerdir.

b.Medulla: Kan, lenf damarları ve sinirlerden zengin, açık renkli iç bölümdür. Korteks ve medullayı yapısal olarak kesin sınırlarla ayırmak mümkün değildir. Medulla stroması korteks ile benzerdir. Elastik liflerden zengin, düz kas hücreleri bulunduran fibroelastik gevşek bağ dokusundan meydana gelmiştir. Medullada ayrıca oksidasyon ve

diğer enzimleri içeren hücreler vardır. Bu hücrelerin sayıları yaş ile birlikte artar, menopozda %80 oranına ulaşırlar. İntertisiyel hücreler ise poligonal şekilli, ortada yuvarlak çekirdeği bulunan, belirgin çekirdekçikleri olan epitelooid hücreler olarak tanımlanırlar.



Çizim 1.3. Ovaryum dokusunun hematoksilien-eozin ile boyanmış kesit görüntüsü. A: Antrum, GEp: Germinal Epitel, AT: Atretik Foliküller, TA: Tunika Albuginea, TI: Tunika İnterna, ZP: Zona Pellusida, PF: Primordiyal Foliküller, SF: Sekonder Foliküller, GC: Granüloza hücreleri. (Ross 2003)

Sitoplazmalarında küçük yağ damlacıkları vardır. Luteinize hücreler ile benzerlikler gösterdikleri için atreziye giden foliküllerin teka internalarından oluştuğu düşünülmektedir. Bunlar ovaryum stromasında teker teker ya da gruplar halinde bulunabilirler ve östrojen salgırlar. Bu hücreler, çok doğuran memelilerde fazladır ve intertisiyel bezler olarak isimlendirilirler; insanda menarşdan sonra azalır, erişkinlerde ise yok denecek kadar az sayıdadırlar. Hilus hücreleri ise, diğer bir iri epitelooid hücre grubudur. Bu hücreler küçük adacıklar şeklinde hilusta gözlenirler. Testisin Leydig hücrelerine benzerlik gösterirler ve sitoplazmalarında yağ damlacıkları, lipofuskin pigmenti, Reinke kristallerini içerirler ayrıca androjenleri salgırlar (Tekelioğlu 2002).

1.1.3.1. Folikül gelişimi

Ovaryum folikülleri bir ya da daha fazla folikül hücresi veya granüloza hücresi tabakası ile çevrili bir oosit içerir (Junqueira ve Carnerio 2009). Ovaryumlar histolojik olarak 3 ana tipte folikül bulundurlar (Ross 2003) (Çizim 1.3).

1- Primordiyal Folikül

2- Büyüyen Folikül

a- Primer Folikül

b- Sekonder (Antral) Folikül

3- Olgun (Graaf) Folikül

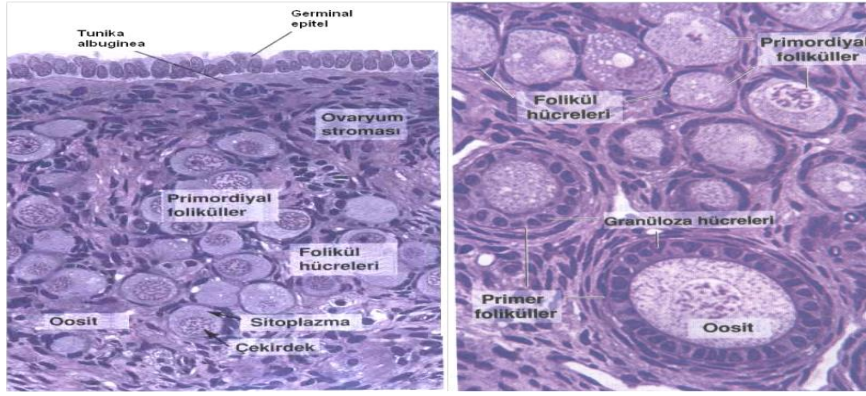
a. Primordiyal Folikül

Primordiyal germ hücreleri 4. hafta başında yolk kesesi duvarında, allantoisin başlangıç bölümüne yakın, endodermal hücrelerin arasında belirirler. Embriyonun katlanması esnasında yolk kesesinin dorsal kısmı embriyo içine dahil olur ve primordiyal germ hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara doğru göç ederler (Moore ve Persaud 2009). Primitif ovaryumdaki germ hücrelerinden oogonyular gelişmeye başlarken, yüzey epiteli ise folikül hücrelerine farklılanır (Nahirney ve Ovale 2009).

Gebeliğin 7. ayına gelindiğinde, oogonyuların çoğu primer oositlere farklılaşmıştır. Fakat, primer oositlerin çoğu atrezi olarak isimlendirilen yıkımla yok olurlar. Sonuç olarak, pubertede ovaryumlar yaklaşık olarak 300.000-400.000 oosite sahip olurlar. Her menstrüal siklusa genellikle tek bir oosit serbest kaldığı ve kadının doğurganlık çağının yaklaşık 30-40 yıl sürdüğü varsayıldığında yalnızca 450 kadar oosit atılmış olur. Diğer oositler ise atrezi yoluyla ortadan kaybolurlar. Atrezi, kadının üreme çağı boyunca devam eder ve 40-45 yaşlarında geriye yaklaşık 8000 kadar oosit kalır (Junqueira ve Carnerio 2009).

Primordiyal foliküllerin büyüüp gelişmesi gonadotropin uyarımına bağlı değildir. Olgun ovaryumda primordiyal foliküller tunika albugineanın altında bulunan korteks stromasının içerisinde yer alırlar. Primordiyal folikülde oosit tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrelenmiştir. Folikül hücrelerinin dış yüzeyi bazal lamina ile belirlenmiştir. Bu evrede oosit ve etrafını saran folikül hücreleri birbirlerine çok yakın konumda bulunur (Bak. Çizim 1.4).

Folikül içindeki oositin çapı yaklaşık 30 µm, ökromatik kromatinli ve bir ya da daha fazla nükleolus bulunduran eksantrik konumlu bir nükleusa sahiptir. Oosit sitoplazması ooplazma olarak isimlendirilir ve Balbiani cisimciği içerir. Balbiani cisimciği; Golgi membranları ve vezikülleri, endoplazmik retikulum (ER), birçok mitokondri ve lizozomların birikmesiyle oluşan bir yapıdır. Ayrıca, insan oositleri annülat lamel içerir ve birçok küçük vezikül, sferik mitokondrilerle ooplazmaya dağılmış vaziyettedir. Annülat lameller nükleer zarf benzeri bir membran birikiminden oluşur. Bu birikimin her bir tabakası nükleer por yapısı içerir (Ross 2003).

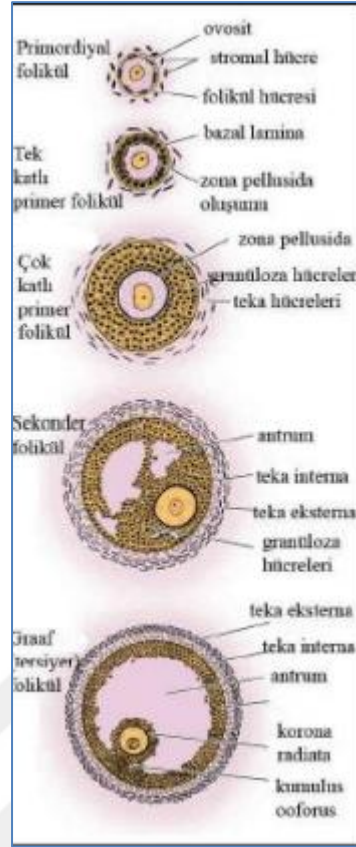


Çizim 1.4. Primordiyal ve primer foliküller. (Junqueira and Carneiro 2009)

b. Primer Folikül

Erişkin ovaryumunda folikül gelişimi, foliküllerin büyüme evresine girmek için folikül havuzunu terketmesi ile başlar. Daha sonra, folikül hücresel proliferasyon ve farklılaşma sürecini içeren erken büyüme evresine başlar. Folikül büyümesi dişi üreme sürecinin herhangi bir kısmında hatta doğum sonrasında bile başlayabilir. Pubertede, ovaryan siklus ve gebelik süresince devam ederek doğurganlık döneminin ardından sona erer (Gougeon 1996).

Primordiyal folikül büyüyen folikül aşamasına geldiğinde oosit, folikül hücreleri ve stromada değişimler meydana gelir. Başlangıçta oosit genişler ve etrafını çevreleyen folikül hücreleri çoğalarak kübik hale gelirler. Folikül hücreleri kübik hale geldiğinde ise bu folikül primer folikül olarak isimlendirilir (Ross 2003). Tek katlı kübik folikül hücre katmanı içeren foliküller tek tabakalı (ünilaminer) primer folikül olarak isimlendirilirler. Folikül hücreleri çoğalmaya devam eder ve çok katlı foliküler epiteli veya granüloza tabakasını oluştururlar. Buradaki hücreler aralık bağlantıları (gap junction) sayesinde iletişim kurar ve bu durumdaki folikül çok tabakalı (multilaminer) primer folikül ya da preantral folikül olarak isimlendirilir (Junqueira ve Carneiro 2009). Oosit büyüdükçe oosit ve folikül hücreleri arasında asidofilik ve homojen bir yapı olan zona pellusida belirir. Zona pellusida ışık mikroskopunda ilk olarak oositin etrafı kübik ya da silindirik folikül hücreleri ile kuşatıldığında ve oosit çapı 50-80 μm 'ye eriştiğinde görülür. Jel kıvamında, glikozaminoglikan ve glikoprotein bakımından zengin bir yapıda olan zona pellusida gelişmekte olan oosit ve çevresindeki folikül hücreleri tarafından sentezlenir (Larsen 2001, Ross 2003).



Çizim 1.5. Folikül gelişimi. (Çelik 2016)

Granüloza hücreleri artarken folikülün çevresindeki stroma hücreleri bazal laminanın hemen dışında teka adı verilen bir bağ dokusu hücre kılıfı oluşturur. Teka tabakası geliştikçe iki tabakaya ayrılır. İç kısımda bulunan teka interna, kübik şekilli salgı hücrelerinden oluşur ve oldukça fazla damarlanmış bir tabakadır. Tamamen farklılaşan teka interna hücreleri steroid salgılayan hücreler haline gelirler. Luteinleştirici hormon (LH) reseptörü taşıyan bu hücreler, LH uyarımına cevap olarak östrojen öncülü androjenleri üretirler. Teka interna tabakası salgı hücrelerine ilave olarak, fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük damarlardan oluşan zengin bir dolaşım ağı içermesiyle tipik bir endokrin organ görünümü sergilemiş olur. Teka eksterna ise dış kısımda bulunan tabakadır ve düz kas hücreleriyle kollajen lif demetleri içerir. İki teka katmanı arasındaki sınır tam olarak belli değildir. Buna karşılık, teka interna ve granüloza tabakası arasındaki sınır, hücrelerinin morfolojik olarak birbirinden farklı olması ve iki tabaka arasında kalın bir bazal membran bulunması sebebiyle iyi seçilir (Kieszenbaum 2006, Ross 2003).

c. Sekonder Folikül

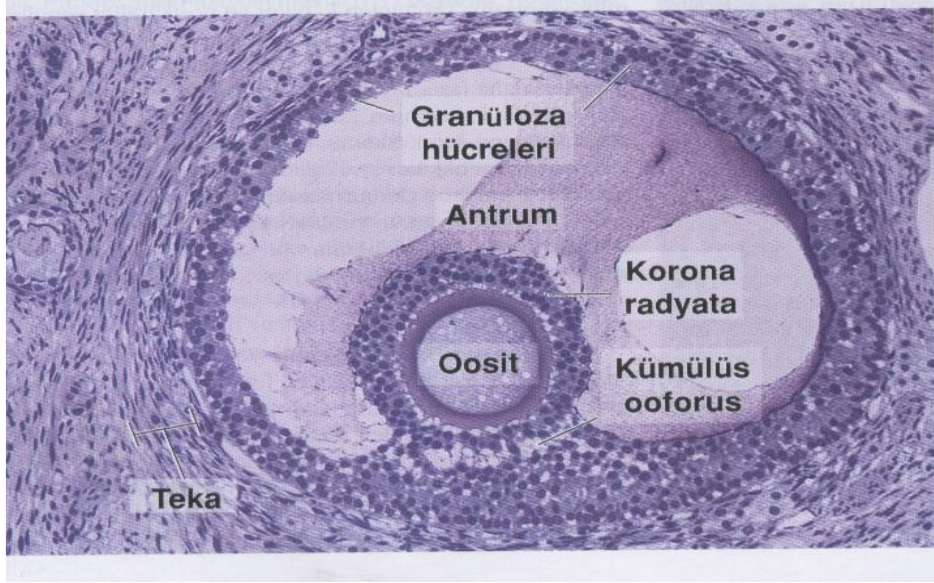
Foliküller asıl olarak granüloza hücrelerinin boyutunun ve sayılarının artmasıyla büyürken kortikal bölgenin daha alt bölgelerine doğru göç eder. Bu aşamada folikül hücreleri arasında sıvı (likör folikülü) birikmeye başlar. Sıvıyı içeren küçük boşluklar birleşerek daha büyük bir boşluk olan antrumunu oluştururlar. Bundan sonra, bu foliküller sekonder ya da antral folikül olarak isimlendirilir. Folikül sıvısı plazma bileşenleri ve folikül hücrelerinden salgılanan ürünleri içerir. Folikül sıvısı glikozaminoglikan, steroid-bağlayıcı proteinler, hormonlar, büyüme faktörleri, antioksidanlarda dahil bazı proteinler ve yüksek konsantrasyonda steroidler bulundurur (Junqueira ve Carnerio 2009). Eksantrik konumlu, yaklaşık 125 µm çapına ulaşan oosit daha fazla büyümmez. Büyümenin inhibisyonu, granüloza hücrelerinden antral sıvıya salınan, küçük, 1-2 kDa ağırlığındaki bir peptid olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından gerçekleştirilir. OMI yoğunluğu ile antral folikül büyüklüğü birbirleriyle direk olarak ilişkilidir.

Sekonder folikülün çapı arttıkça granüloza hücre tabakası ile çevrili olan antrumun da genişliği artar. Granüloza hücre tabakası oositi çevreleyen bölge dışındaki her bölgede aynı kalınlıktadır. Oosit çevresinde ise granüloza hücrelerinin oluşturduğu kümelenmeye kümülüs ooforus adı verilir. Kümülüs ooforusun oositi çevreleyen ve ona en yakın kısımda olan granüloza hücrelerine ise korona radyata adı verilir. Bu hücreler ovülasyon sırasında oositle birlikte atılır. Korona radyata ile oosit aralık bağlantıları aracılığı ile birbirleriyle bağlantı kurarlar ve birlikte kümülüs oosit kompleksi olarak adlandırılırlar (Bak. Çizim 1.5).

Belli bir çapa ulaşıp içinde antrum oluşan foliküller bu evreden sonra hormonlara bağımlı hale gelir ve gelişimlerine devam edebilmek için gonadotropinlere ihtiyaç duyarlar. İnsanda yeterli miktarda hormonla karşılaşan foliküller içinden seçilen bir folikül baskın hale gelerek gelişimini son evreye kadar sürdürür (Ross 2003).

3. Olgun (Graaf) Folikül

Graaf folikülü olarak da bilinen olgun foliküller 10 mm veya daha büyüktürler. Bu büyüklüklerinden dolayı ovaryumun yüzeyinde bir çıkıntı olarak gözlenebilirler. Antrum genişledikçe granüloza hücre tabakası giderek incelir. Granüloza hücrelerinin arasındaki boşluk büyüdükçe ovülasyona hazırlık olarak kümülüs oosit kompleksiyle folikülün geriye kalan kısmı arasındaki bağlantı zayıflar (Bak. Çizim 1.6).



Çizim 1.6. Olgun (Mittler, Graaf) bir folikül (Junqueira ve Corneiro 2009).

Granüloza tabakasının kalınlığı azaldıkça boşluk da büyür. Kümülüs ooforus kompleksinin folikülün geri kalan bölümüyle bağlantısı gevşer ve ovulasyona hazırlanır. Teka tabakası daha dikkat çeker hale gelir. Teka interna hücrelerinin içinde lipit damlacıkları birikerek bu hücelere tipik steroid sentezleyen hücre görünümü verir. İnsanlarda LH, teka interna hücrelerinde androjen üretimini sağlar. Östrojen öncülleri olarak görev alan androjenler buradan granulosa hücrelerinin düz endoplazmik retikulumlarına (DER) geçerler ve folikül stimule edici hormon (FSH)'ın etkisiyle östrojenlere dönüştürülürler. Yükselen östrojen seviyeleri granulozaların artmasını ve dolayısıyla da folikülün genişlemesini arttırırlar (Ross 2003).

Ovulasyondan yaklaşık 24-36 saat önce adenohipofizden LH salgılanması tetiklenir. Kandaki LH hormonu seviyesinde meydana gelen aşırı artış (pik) sonucu granulosa hücrelerindeki LH reseptörleri hassasiyetlerini kaybeder ve LH'a cevap olarak daha fazla östrojen üretemezler. Oositin birinci mayotik bölünmesi bu dalga ile tetiklenerek durakladığı yerden devam etmeye başlar. LH yükselmesinden 12-24 saat kadar sonra gerçekleşen bu olay, oositin mayoz I'i tamamlayarak birinci kutup cisimciğini oluşturması (maturasyonu-olgunlaşması), sekonder oositin oluşması ve ovulasyonun meydana gelmesi ile sonuçlanır.

Normalde her menstrual döngüde bir ovaryumdaki bir folikül gelişmesini bitirir ve içindeki sekonder oositi atar. Her döngüde ovaryumlar arasında dönüşümlü gerçekleştirilen bu olay zaman zaman, kendiliğinden veya klomifen sitrat içeren ilaçlar gibi dış faktörler sebebiyle

her iki ovaryumda da aynı anda meydana gelebilir. Bu durumda eğer döllenme gerçekleşirse çoklu gebelikler gerçekleşebilir (Ross 2003).

1.1.3.3. Folikül gelişmesinde etkili bazı faktörler

Doğal menstrual döngüsü olan kadınların folikül sıvısında beş tip insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGF-BP) tespit edilmiştir. Bu proteinler, granüloza hücreleri tarafından sentezlenir. IGF-BP 1, folikül gelişimi esnasında sabit kalır. IGF-BP 2,4 ve 5 atreziye uğrayan foliküllerde, IGF-BP 3 ise dominant foliküllerde yüksek oranda bulunmuştur. IGF-BP'lerin folikül seçimi ve atrezisinin düzenlenmesinde gonadotropin seviyelerini etkileyerek rol aldığı düşünülmektedir (Tekelioğlu 2002).

Folikül gelişimi, ovulasyon ve luteal fonksiyonlar gonadotropinler aracılığıyla kontrol edilir. Fakat son zamanlarda, lokal faktörlerinde folikül gelişmesinin düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (Tekelioğlu 2002). Gonadotropinlerin endokrin etkilerine ilaveten granüloza hücrelerinden salınan inhibin, aktivin, folikülostatin de folikül olgunlaşmasında parakrin etki gösterir. Aktivin, FSH reseptör sayısını artırır; folikülostatin ise aktivinin olduğu ortamda FSH reseptörlerinin sayısını azaltabilir. Endojen inhibin düzeyindeki yükseliş FSH'ı baskılar. Menstrual döngünün luteal fazında LH inhibin sentezinin artmasını sağlar.

Oositlerden elde edilen birinci büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF9)'dur. Yokluğunda primer foliküllerin oluşabildiği ancak bu aşamadan sonra folikül gelişiminin durakladığı ve bunun infertiliteye yol açtığı farelerde gösterilmiştir.

Bütün bunlardan başka, memelilerde folikül gelişimini başlatan faktörelere; Wilms tümörü baskılayıcı geni (WT1), retinoblastoma proteini (pRb), epidermal büyüme faktörü (EGF), vazoaktif intestinal peptid (VIP), kit ligandlar da eklenebilir (Tekelioğlu 2002).

Primordiyal Folikül Seçilim Mekanizması

Primordiyal foliküllerin dinamiklerini açıklamaya yönelik pek çok model ve çok sayıda soru işareti bulunmaktadır. Soru işaretlerinin asıl sebebi, primordiyal foliküllerin bir kısmı büyürken geri kalan kısmının sabit kalması veya atreziye uğramasıdır. En çok bilinen hipotezlerden birisi Henderson ve Edwards'ın 'production-line' hipotezidir (Hendersan ve Edward 1968). Bu hipoteze göre, embriyonik gonad gelişimi süresince mayotik duraklamaya giren ilk oositler, erişkin üreme hayatını tetikleyen ilk oositlerdir.

Oositlerin başlangıç öncülleri olan primordial germ hücreleri (PGH) ekstraembryonik ektoderme komşu proksimal epiblasttan ekstraembryonik ektodermal

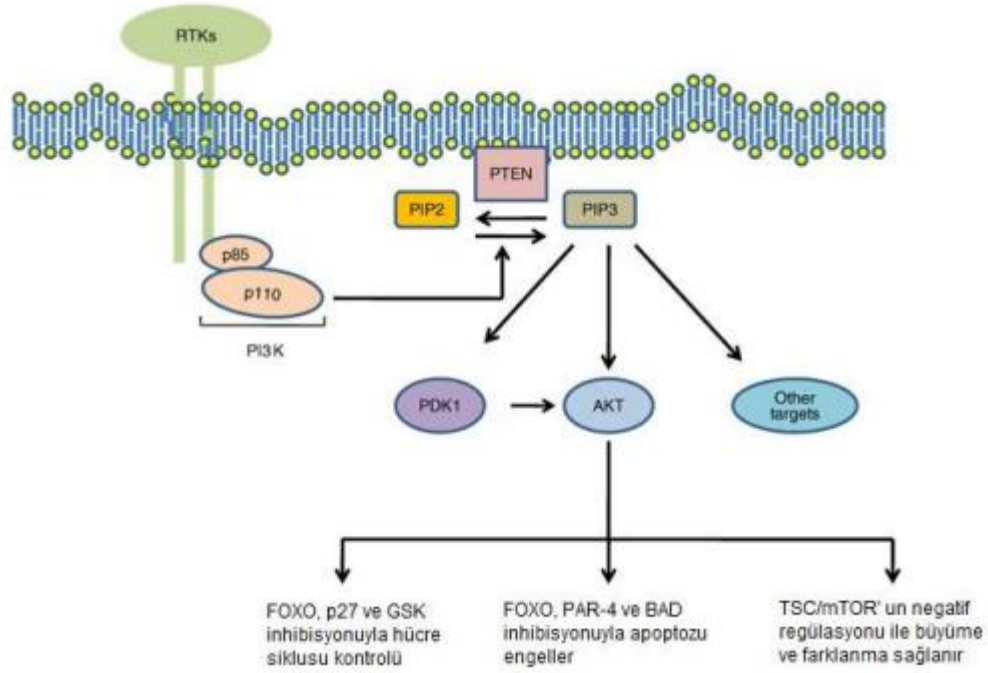
kökenli bone morphogenetic protein (BMP) 4 ve BMP8b ile ekstraembryonik endoderm kaynaklı BMP2 sinyali ile gelişmeye başlamaktadır (Ying ve Zhao 2001, Ohinata ve diğ. 2009). BMP4'e cevap olarak epiblast hücrelerinin bir kısmı germ hücre özellikleri kazanmaktadır. Germ hücre kompetansının kazanılması süreci interferonla uyarılan bir transmembran proteini olan Fragilis'in germ hücresi üzerinde sentezlenmesi ile başlar. Fragilis sonrasında germ hücrelerinin son barsak (hindgut) mezenteri üzerinden gonada yolculuğu sırasında sadece germ hücrelerinde var olan Stella isimli genin ekspresyonunu uyararak somatik hücre kaderinden (somatic cell fate) kaçması ve pluripotensinin devam ettirilmesini sağlar (Ohinata ve diğ. 2009, Lange ve diğ. 2003).

Primordiyal germ hücreleri ilk olarak insanda 3 veya 4. gebelik haftalarında vitellus kesesinin dorsal duvarının endoderminde yaklaşık 100 kadar hücre olarak kendilerini gösterirler. Endodermal hücrelerden daha büyük olmaları, daha az organel içeren şeffaf sitoplazmaları ile diğer hücrelerden ayırt edilirler (Mc ve diğ. 1953). Yedinci hafta civarında gonadın germ hücreleri ile kolonizasyonu tamamlanır. Germ hücreleri overin oluşumu ve devamı için gereklidir, germ hücresi veya oosit bulunmayan over dokusu kord benzeri yapılara dönüşerek dejenere olmaktadır (Merchant-Larios ve diğ. 1981). Gonada ulaşan PGH daha hızlı mitoz bölünmeler geçirerek sayıları kısa sürede 6. haftada 10 bin iken 8. haftada 600 bine, 20. haftada ise 6 milyona ulaşır. Bu dönemden sonra mitoz bölünmeler azalır 28. haftada sona erer ve eş zamanlı başlayan atrezi 20. haftada üst seviyeye ulaşır. Bu sebeple, 20. haftadan sonra germ hücre sayısı azalmaya başlar, yenidoğanda 1 milyon, pubertede 300-400 bin kadar kalır. Sadece %1 civarı ovulatuvar aşamaya kadar ulaşan bu hücrelerin çoğu atreziye gider ve menopoza sonrası bin kadarı overlerde kalır (Öktem ve Oktay 2008).

Overyan rezerv, ovaryumdaki primordiyal foliküllerin sayısı tarafından belirlenir. Sessiz primordiyal foliküller antral folikül aşamasına ulaşmadan önce kademeli olarak gelişip büyürler. Sonra bir grup antral folikül daha fazla büyümek için gonadotropinlerin siklik stimülasyonunun etkisiyle baskın hale gelir. Primordiyal folikül havuzunun büyümesini başlatan mekanizma/mekanizmalar halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Mutant fare modellerinde yapılan çalışmalar, primordiyal foliküllerin dormant halde kalmasının bir takım baskılayıcı moleküllerin etkisi altında kalmasından dolayı olabileceğini ileri sürmektedir (Çelik 2016). Bu inhibitörler; Foxo3a, FoxL2, fofotaz ve tensin homolog (pTEN), tuberous schlerosis complex (Tsc1), siklin bağımlı kinaz inhibitör 1B (p27kip1 veya p27) ve anti-Mullerian hormondur (AMH). Kemirgenlerde pTEN, Tsc1 ve Foxo3a genlerin oosit-spesifik delesyonu sonucu dormant primordiyal foliküllerin toplu

aktivasyonu belirtilmiştir. Diğer oosit ve somatik hücre kaynaklı büyüme faktörleri (GDF9 ve bazı BMP ailesi üyeleri büyüme faktörleri) de gonadotropin bağımsızdır. Bu faktörlerin etkileşimleri, erken foliküler fazda granüloza hücreleri ve teka hücrelerinden salınan hormon ve androjenlerle kontrol edilir. İlginç olarak, bu faktörlerin bazıları dominant folikülün seçimi, prematür lüteinizasyonun inhibisyonu ve gonadotropinlere yanıt gibi folikülün büyüme aşamalarında önemli rollere sahiptir (Öktem ve Urman 2010). Primordiyal folikülden primer folikül gelişimdeki en önemli baskılayıcılardan birisi de p27'dir (Öktem ve Urman 2010). p27, tümör büyüme faktörü β (TGF- β) gibi sinyallere cevap olarak ekspresyon olur ve hücre siklusunun G1 fazında sabit kalmasından sorumludur (Thomas ve Pollars 2008). Büyüme faktörlerinden mahrum kalan, G0 fazında bulunan veya kontakt inhibisyonuna maruz kalan hücrelerde p27 ekspresyonu yükselirken, hücre siklusuna giren hücrelerde ise düşer (Sher ve Roberts 1999). p27'nin degradasyonu G1/S geçişi için önemli bir rol oynar. p27, D tip siklinler/CDK4 kompleksleriyle güçlü ve siklin E/CDK2 kompleksiyle de zayıf etkileşimlere girer. D tip siklinler ve CDK4 kompleksleriyle etkileşime girdiğinde CDK4'ün katalitik aktivitesini ve böylece CDK4'ün Rb proteinini fosforlamasını (pRb oluşumunu) baskılar. Gerçekten de p27, siklin D veya pRb genleri bulunmayan farelerle yapılan bazı çalışmaların fenotipik sonuçları, p27 ve pRb eksik olan farelerde hiperplazi ve tümör oluşumu göstermiştir (Veinberg 1991, Sicinski ve diğ. 1995). p27 geni olmayan farelerde vücut büyüklüğünün artması, birçok organda hiperplazi ve tümör gelişimi, p27'nin büyümeyi sınırlamadaki ve tümör baskılanmasındaki önemine işaret etmektedir (Pagano ve diğ. 1995, Besson ve diğ. 2007). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar p27'nin, primordiyal foliküllerin oosit ve folikül hücrelerinde sentezlenerek, primordiyal folikülün uykuda kalmasını sağladığını göstermektedir. p27 geni silinmiş farelerde oositin büyümesi ve pregranüloza hücrelerinin farklılanıp proliferasyonu sonucu prematür folikül aktivasyonu gözlenmiştir (Rajareddy ve diğ. 2007). Mevcut çalışmalar, p27 geninin memeli ovaryum gelişiminde önemli bir belirleyici olduğunu göstermektedir (Sicari ve diğ. 2012). pTEN ve Tsc ile ilgili literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. pTEN, fosfoinositid-bağımlı kinaz-1 (PDK1) inhibisyonu ile P70-S6 kinaz 1 (S6K1)'in fosforile halde tutulmasını sağlar ve bu sayede S6K1, ribozomal protein S6 (rpS6) ve ökaryotik başlatıcı faktör 4B'yi (eIF4B) fosforilleyerek oosit gelişimini sağlayan protein translasyonu gerçekleştirir. Daha açık bir ifadeyle, primordiyal havuzun sonlanmaması için pTEN molekülünün PDK1'i aktive etmesi ve bu sayede oosit gelişiminin duraklatılması gerekmektedir. pTEN'in AKT yolağını düzenlemesi ile hücre siklusu, apoptoz, büyüme ve farklılaşma ile ilgili birçok yolda çok

kritik rollerinin olduğu bilinmektedir (Çizim 1.7). Tsc molekülü de pTEN molekülüne benzer şekilde aynı yolağı mTORC1 yolağı üzerinden baskılamaktadır. Bu inhibisyon sayesinde primordiyal havuz sessizliğini bozmamaktadır. pTEN ve Tsc1 geni silinmiş kemirgenlerle gerçekleştirilen deneyler, pTEN ve Tsc delesyonlarında primordiyal folikül rezervin tükendiğini doğrulamaktadır (Adhikari ve Liu 2009, Adhikari ve diğ. 2010).



Çizim 1.7. PTEN/fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) sinyal yolağı. Keniry ve Parsons (2008)'dan alınmıştır.

AMH, ovaryumda gelişen foliküllerin granüloza hücreleri tarafından sentezlenir ve primordiyal folikülden primer foliküle gelişim evresinde primordiyal folikül havuzunu korumada görev alır. AMH seviyesi küçük antral folikül sayısı ile orantılı olarak serumda belirlenebilir. Kadınlarda AMH seviyesi yaşa ve post-menopozal evreye bağlı olarak düşer. Prematür overyan yetmezliğe sahip olan kadınlarda ise antral folikül sayısının yokluğuna bağlı olarak ölçülemeyecek kadar düşüş gösterir. AMH seviyesi son zamanlarda ovaryan folikül havuzunu gösteren bir belirteç olarak klinik alanlarda da kullanılmaktadır (La Marca 2010).

1.1.3.4. Oogenezis

a. Doğum öncesi (prenatal) Olgunlaşma

Primordiyal germ hücreleri, genetik olarak dişi olan gonadlara varır varmaz oogonyumlara farklılaşırlar. Peşpeşe geçirdikleri mitoz bölünmelerle sayıları artan oogonyumlar 3. ayın sonunda kümeler halinde dizilerek yassı epitel hücreleriyle

çevrelenirler. Bir küme içinde bulunan oogonyumların hepsi büyük olasılıkla tek bir primitif üreme hücresinden gelişir (Sadler 2005).

Oogonyumların çoğunluğu mitoz bölünmelere devam ederken, bir kısmı bölünmesini I. mayoz bölünmenin profaz safhasında durdurarak primer oositlere farklılar. Bundan sonraki birkaç ay içinde oogonyumlar hızla sayılarını artırır ve gelişimin 5. ayında ovaryum içindeki üreme hücrelerinin sayısı yaklaşık 7 milyona ulaşır. Bu sırada hücre ölümü başlar ve oldukça fazla sayıda oogonyum ve primer oosit atretik hale gelir. 7. ayda yüzeeye yakın bulunanlar dışında oogonyumların çoğu dejenere olur. Geriye kalan primer oositlerin tümü, birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler ve her biri ayrı ayrı tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşmuş bir katmanla çevrelenir. Primer oosit, etrafındaki yassı epitel hücreleriyle birlikte primordial folikül olarak adlandırılır. Primordiyal folikül açıkça belirgin bir bazal lamina ile çevre dokudan ayrılmıştır (Moore ve Persaud 2009).

b. Doğum sonrası (Postnatal) Olgunlaşma

Doğuma yakın evrede primer oositlerin hepsi birinci mayoz bölünmenin profaz safhasının diploten döneminde ve dinlenme halinde kalırlar. Primer oositlerin bu durumu puberteye kadar devam eder. Bu süreçte, oositin olgunlaşması folikül hücreleri tarafından salgılanan oosit olgunlaşmasını baskılayan madde (OMI) tarafından baskılanır. Doğumda ovaryumlardaki primer oosit miktarı yaklaşık 700.000 ile 2 milyon arasında değişir.

Puberteye kadar primer oositlerin büyük bir çoğunluğu atreziye uğrar. Puberte başlangıcında bu sayı azalarak 300-400.000'e kadar düşer. Bir kadının üreme sürecinde bunların 450-500 kadarı ovulasyon ile birlikte atılır. Diğerleri atreziye uğrar. Oositlerin bir kısmı olgunlaşmadan 40 yıldan daha uzun bir zaman birinci mayoz bölünmenin profaz safhasında bekler.

Puberteye gelindiğinde ovaryumlar artık primordiyal foliküllerden beslenen bir folikül havuzuna sahip olmuşlardır (Gartner ve Hiatt 2007).

1.1.3.5. Ovulasyon

Menstrüal döngünün 14. gününde granüloza ve teka hücreleri tarafından salınan östrojen ile birlikte kandaki östrojen düzeyi artar. Bu yüzden hipofiz bezinin ön lobundan FSH salınımı baskılanırken, LH salınımı artar. Kan LH düzeylerindeki artıştan sonra ovaryumun kan akımında artış görülür ve kapiller ve postkapiller venüllerden plazma proteinleri sızarak ödeme neden olurlar. Lokal olarak, prostaglandinler, histamin, vazopressin ve kolajenaz salınır. Granüloza hücreleri daha fazla miktarda hiyaluronik asit

üretir ve gevşemiş bir hal alırlar. Folikül duvarının küçük bir bölümü, tunika albugineadaki kollajen yıkımı, iskemi ve bazı hücrelerin ölümü nedeniyle zayıflar. Foliküler sıvı basıncındaki yükseliş ve büyük olasılıkla düz kas hücrelerinin kasılmasıyla birlikte bu zayıflama, folikül dış duvarının yırtılmasına ve dolayısıyla ovulasyona neden olur. Ovulasyonun yakın zamanda gerçekleşeceğinin bir göstergesi, folikül yüzeyinde stigmanın belirmesidir; bu kan akımının durması sonucu folikül duvarının renk ve saydamlığında oluşan bölgesel değişikliktir (Gartner ve Hiatt 2007, Junquera ve Carneiro 2009).

Birinci mayoz bölünme ovulasyonun hemen öncesinde tamamlanır. Kromozomlar yavru hücreler arasında eşit olarak bölünür, ancak sekonder oositlerden biri sitoplazmanın neredeyse tamamını alırken diğeri birinci kutup cisimi haline gelir. Birinci kutup cisimi, çekirdek ile birlikte çok az miktarda sitoplazma barındıran çok küçük bir hücredir. Birinci kutup cisimi atıldıktan sonra, oositin çekirdeği ikinci mayoz bölünmeye başlar; bu bölünme metafaz safhasına geldiğinde durur (Junquera ve Carneiro 2009).

Folikül duvarının yırtılmasıyla, oosit ve birinci kutup cisimi, zona pellusida, korona radyata ve bir miktar folikül sıvısıyla beraber ovaryumdan periton boşluğuna atılır. Tuba uterinanın ucundaki fimbriyaların hareketi sayesinde oosit tuba uterinanın içerisine çekilir (Gartner ve Hiatt 2007, Junquera ve Carneiro 2009).

1.1.3.6. Korpus luteum (KL)

Ovulasyondan sonra yırtılan tersiyer folikülün duvarında geride kalan granüloza ve teka interna hücreleri hayatlarını etraflarında bulunan damarlar sayesinde sürdürürler. Graaf folikülün ovulasyon sonrası iç basıncı düşer (Gürgen 2009). Folikül sıvısının boşalması ile folikül duvarı kıvrıntılı bir şekil alır. Folikül boşluğuna doğru biraz kanama gerçekleşir, bu kan burada pıhtılaşır. Bu yapıya korpus hemorajikum adı verilir. Granüloza ve teka interna hücreleri yapısal olarak değişikliğe uğrarlar. LH hormonunun etkisiyle birlikte hücrelerin sitoplazmalarında sarımsı renkte bir pigment birikmeye başlar. Bu hücreler büyürler ve granüloza lutein ve teka lutein hücrelerine dönüşürler. Granüloza lutein hücreleri yaklaşık olarak 30 µm çapında ve steroid salgılayan hücrelerin yapısal özelliklerini gösterirler. Teka lutein hücreleri ise 15 µm çapında olup, daha koyu renkte boyanan hücrelerdir. Bu hücrelerin meydana getirdiği geçici endokrin bez yapısına “korpus luteum” (sarı cisim) adı verilir. Bu yapı ovaryumun korteks bölümünde bulunur, progesteron ve östrojen hormonu salgırlar. Bu hormonların etkisiyle, uterus mukozası embriyonun implante olabilmesine uygun duruma gelerek sekretuar ya da progestasyonel evreye giriş sağlanır (Junquera ve Carneiro 2009, Gürgen 2009).

2.1.3.7. Tuba uterina

Tuba uterina fertilizasyonun gerekleŖtiđi ve zigotun ilk b3l3nmelere baŖladığı, yaklaşık 12 cm uzunluğunda ve oldukça hareketli kaslardan oluŖan bir kanaldır. İnfundibulum olarak adlandırılan uç kısmı periton boŖluđuna açılır ve fimbriya adında çok sayıda parmaksı uzantılardan oluŖan bir yapılanma g3sterir; intramural b3l3m3 ise uterus duvarını geçerek uterusun i boŖluđuna doğru açılır.

Tuba uterinanın duvarı 3 kısımdan oluŖur: 1) lamina propria ile desteklenen mukoza, 2) kas tabakası, 3) seroza tabakası.

Mukoza, en çok ampulla b3l3m3nde olmak 3zere uzunlamasına kıvrımlar bulundurur. İnamural b3l3m3de kıvrıntılar azalarak l3mene doğru uzanan k33k çıkıntılara d3n3Ŗ3r ve i y3zeyi hemen hemen p3r3zs3z bir hal alır. Mukoza tek katlı silindirik epitel ve gevŖek bağ dokusundan oluŖan bir lamina propriadan meydana gelir. Epitel iki tipte h3cre içerir. Bunlardan birinde titrete t3yler bulunurken, diğeri salgı yapıcı 3zellikte t3yler yer alır. Titrete t3yler uterusu doğru hareketi sağlayarak tuba uterinanın y3zeyini 3rten ince sıvı tabakanın hareketini sağlamaya yardımcı olur.

Ovulasyon sırasında tuba uterina aktif olarak hareket eder. Çok sayıda fimbriyadan oluŖan saçaklı g3r3n3mdeki uç ovaryumun y3zeyine doğru yakınlıŖır. Bu ovaryumdan serbest bırakılan oositin tuba uterinaya aktarılmasını kolaylaŖtırır. Oosit, kasların kasılması ve silyalı h3crelerin hareketleriyle desteklenerek tuba uterinanın infundibulumundan içeri girer. Tuba epitelinin salgısı oosit için besleyici ve koruyucu bir role sahiptir. D3llenme gerekleŖmediđi takdirde, oosit yaklaşık 24 saat kadar canlı kalır.

D3llenme genellikle tuba uterinanın ampulla b3l3m3nde gerekleŖir ve d3llenmeyle birlikte diploid kromozom sayısına ulaŖılır. Bu aŖama sonrasında zigot adını alan d3llenmiŖ oositte h3cre b3l3nmeleri baŖlar. Zigot yaklaşık 5 g3n kadar devam eden bir yolculuk ile uterusu taŖınır. Tuba uterinanın mukozasını 3rten ince sıvı tabakasının kasılmaları, oositin ya da zigotun uterusu doğru taŖınmasına yardımcı olur (Ross 2003, Kierszenbaum 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).

1.1.3.8. Uterus

Uterus armut Ŗeklinde bir organdır ve bir g3vde (korpus), aŖađıda uterus boŖluđunun daraldığı kısım iç ağız (internal os) ile i ağızdan aŖađıya doğru uzanan silindirik bir yapı olan serviksten meydana gelir. Uterus g3vdesinin kubbe Ŗeklindeki kısmına fundus adı verilir.

Korpus duvarı 3 tabakalıdır: 1) endometriyum, 2) miyometriyum, 3) adventisya veya seroza.

Endometriyum; Epitel ile basit tübüler bezler bulunduran lamina propriadan meydana gelir. Bezler miyometriyuma yakın alt kısımlarda bazen dallanmalar gösterir. Epitel tipi tek katlı silyalı ve salgılayıcı silindirik epiteldir. Uterus bezlerinin epitelleri yüzey epiteline benzer olsalar da, bezlerde silyalı hücreler çok az ya da yoktur. Endometriyum işlevsel olarak iki tabakadan meydana gelir; 1) menstruasyon esnasında dökülen yüzeysel olan fonksiyonel tabaka ve 2) menstruasyon esnasında dökülmeyen ve menstruasyondan sonra yenilenecek olan fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturan bazal tabaka. Fonksiyonel tabakanın mikroskopik özellikleri, menstrual siklusun evrelerine göre değişgenlik gösterir. Menstrual siklus yaklaşık olarak 28 gün civarı sürer. Menstrual siklus birbirini takip eden üç evreden oluşur; ilk olarak siklusun başlangıcı olan menstrual evre 4-5 gün sürerken sonraki evre olan proliferasyon evresi yaklaşık 9 gün devam eder. Bu evre esnasında ovaryumda olgunlaşan foliküllerden salınan östrojenin uyarıcı etkisiyle endometriyumun kalınlığında artış gerçekleşir. Hem epitelde hem de lamina propriadaki hücrelerde mitoz bölünmeler görülür. nc olarak; ovulasyonun gerçekleştiği 14. güden sonra endometriyum yaklaşık 13 gün devam edecek olan sekresyon ya da progestasyonel evreye girer. Bu evrede endometriyal bezler salgılama işlevlerini gerçekleştirmeye başlar. Tübüler bezlerin dış kısımları dzensizleşmeye ve kıvrılmaya, döşeyici epitelde ise glikojen birikimi başlar. Bez lümenini glikojen ve glikoproteinden zengin bir salgı kaplar. Sekresyon evresi korpus luteumda üretilen progesteron ve östrojen hormonlarının kontrolü altındadır.

Menstrual siklusun sonunda korpus luteumun gerilemesine bağlı olarak kandaki steroid hormonlarının seviyelerinin azalması iskemik evrenin başlamasına neden olur ve yaklaşık 1 gün sürer. Gebelik olmuşsa, endometriyum lamina propriasındaki stromal hücreler büyüyerek artan progesteron düzeyine cevap olarak lipid ve glikojen depolar. Bu endometriyal değişimlere desidual reaksiyon adı verilir. Çünkü; endometriyumun fonksiyonel tabakası doğum esnasında desidua olarak dökülür.

Miyometriyum; Bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinin oluşturduğu uterusun en kalın tabakasıdır. Düz kas demetlerini sınırları açıkça belirlenemeyen dört tabaka oluşturur. Gebelik sırasında miyometriyum hem hiperplazi (düz kas hücre sayısının artışı) hem de hipertrofi (hücre boyutlarının artışı) sonucu büyür. Gebelik sırasında uterusun kollajen içeriği önemli miktarda artar. Gebelik sonrasında bazı düz kas hücrelerinde bozulmalar meydana gelir, bazılarının boyutları küçülür ve kollajenaz enziminin etkisiyle yıkılır. Bu sayede uterusun boyutları gebelik öncesindeki boyutlarına yakın ölçülere iner (Ross 2003, Kierszenbaum 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).

1.1.3.9. Serviks uteri

Serviks, uterusun altındaki silindirik bölümdür ve histolojik olarak uterusun geri kalan bölümünden daha farklıdır. Yüzeyinde mukus salgısı yapan tek katlı silindirik epitel vardır. Serviks az sayıda düz kas lifi içerir ve temel olarak sıkı bağ dokusundan (%85) meydana gelir. Vajina lümenine doğru çıkıntı yapmış olan serviksin dış bölümü ise çok katlı yassı epitel ile döşelidir.

Serviks mukozası oldukça fazla dallanmış, müköz servikal bezler bulundurur. Bu mukoza menstruasyon esnasında dökülmez. Servikste salgılar oositin dölllenmesinde önemli bir görev alırlar. Ovulasyon esnasında müköz salgılar sulanır ve spermin uterusu girmesine yardımcı olurlar. Luteal fazda ya da gebelikte, progesteron seviyeleri müköz salgıları değiştirerek daha visköz bir hal almasına sebep olur ve mikroorganizmaların geçişi engellenmiş olur. Doğumdan önce servikte görülen genişleme ise kollajenin yoğun bir biçimde parçalanmasına ve bunun neden olduğu yumuşamaya bağlıdır (Ross 2003, Kierszenbaum 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).

1.1.3.10. Vajina

Vajina duvar bezleri içermez ve üç tabakadan meydana gelir; mukoza, müküler tabaka ve adventisya. Vajinanın lümeninde yer alan mukus, uterus boynundaki bezlerden salgılanır.

Erişkin bir kadında vajina mukozasının epiteli çok katlı yassı epitelden oluşur. Hücreleri az miktarda keratohiyalin bulundurabilir. Bununla beraber klasik keratinleşmiş epitelde olduğu gibi, hücrelerin keratin plaklarına dönüşmesi ile izlenen yoğun keratinizasyon burada görülmez. Östrojen uyarımı ile vajina epiteli büyük oranda glikojen sentezleyip biriktirir. Vajinal hücrelerin dökülmesi ile bu glikojen vajina lümeninde birikir. Vajinadaki bakteriler glikojeni dönüştürerek vajinanın genelde düşük olan pH'sını sağlayan laktik asidi meydana getirir. Vajinadaki asidik ortam bazı patojenlere karşı koruyucu bir etki sağlamış olur.

Vajina mukozasının lamina propriyası elastik liflerden oldukça zengin gevşek bağ dokusundan meydana gelmiştir. Vajina mukozasında duyuşal sinir sonlanmaları hemen hemen hiç bulunmaz, bulunan birkaç çıplak sinir sonlanması ise büyük olasılıkla ağrı duyusunu algılayan sinir liflerine aittir.

Vajinanın kas tabakası temel olarak longitudinal seyreden düz kas lifi demetlerinden meydana gelmektedir. Özellikle en iç alanda sirküler düz kas lifi demetleri de görülmektedir.

Müsküler tabakanın dış bölümündeki kalın elastik liflerden zengin sıkı bağ dokusu örtüsü olan adventisya, vajinayı çevredeki dokularla birleştirir. Vajinanın oldukça elastik oluşu vajina duvarındaki bağ dokusu içinde elastik liflerin fazla miktarda bulunmasına bağlıdır. Bu bağ dokusunda yaygın bir venöz pleksus, sinir demetleri ve sinir hücresi grupları izlenir (Ross 2003, Kierszenbaum 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).

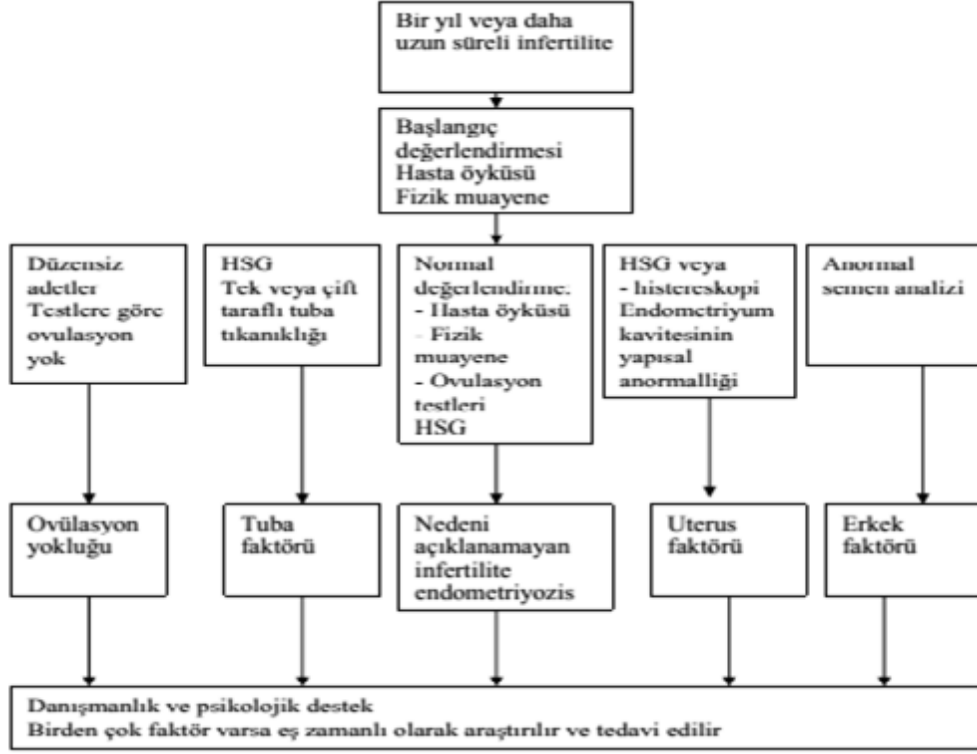
1.2. İnfertilite

İnfertilite genel anlamda sağlıklı popülasyona göre daha az gebe kalabilme yeteneği olarak tanımlanırken özgün anlamda bir çiftin korunmasız 1 yıl cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememeleri şeklinde tanımlanır. Çiftlerin yaklaşık olarak %10-15'i infertilite tanısı almaktadır. Fekundabilite ise belli zaman diliminde bir toplulukta görülen konsepsiyon oranıdır. Normal fertil çiftlerde ise aylık konsepsiyon oranı %20'dir.

İnfertilitenin en sık nedenleri tubal-peritoneal patoloji (%30-40), anovulasyon (%15) ve erkek faktörüdür (%30-40). Geri kalan bölümü ise açıklanamayan infertilite grubunu oluşturmaktadır (Moody ve diğ. 2004).

1.2.1. İnfertilitede Tanı Yöntemleri

İnfertil çiftlerin değerlendirilmesinde amaç; infertiliteye sebep olan faktörleri belirlemek, prognoz hakkında bilgi vermek, araştırma sırasında danışmanlık, destek ve eğitim sağlamaktır. Değerlendirmede ilk adım anamnez ve fizik muayenedir. Sonrasında, erkekte ve kadında ayrı ayrı olmak üzere laboratuvar bulguları değerlendirilir (Kızılkaya 2009, Kavlak 2002). Erkeklerde yapılan değerlendirme testleri; semen analizi (spermiyogram), sperm fonksiyon testleri, sperm canlılık testleri, immünolojik değerlendirmeye dayalı testler (antisperm antikorları-asa), radyolojik değerlendirme ve testis biyopsisidir (Bak. Çizim 1.8). Kadınlarda yapılan değerlendirme testleri ise ovulasyon faktörlü infertilitenin araştırılması (FSH, LH olmak üzere, progesteron, östradiol (E2) ve tiroid uyarıcı hormon (TSH)'ın serum konsantrasyonlarının belirlenerek değerlendirilmesi), ovulasyonun belirlenmesi (bazal vücut ısısı, LH ölçümü, midluteal progesteronun belirlenmesi), servikal faktörlere dair infertilitenin araştırılması, yapısal faktörlerin araştırılarak değerlendirilmesi (Histerosalpingografi (HSG), Histeroskopi, Endometriyal Biyopsi (EMB) ve tanısal laparoskopidir (Kayıkçı ve diğ. 2002, Kızılkaya 2009).



Çizim 1.8. İnfertilite tanı ve tedavi algoritması: HSG, histerosalpengografi. **Jonahten (2011)**'den alınmıştır.

Kadında yapılan değerlendirme testleri

Fertilizasyon için, hipotalamus, hipofiz, overler, tuba uterina, uterus, serviks ve vajina dahil bütün üreme sisteminin fonksiyonel ve yapısal olarak sağlıklı durumda olması gerekmektedir.

1.2.2. Overlere ilişkin faktörler

1.2.2.1. Ovulasyon bozuklukları:

Ovulasyon aşamasındaki bozukluklar bütün fertilité sorunlarının %30-40'ını oluşturur. Bu aşamadaki bozukluklar kadına ait infertilitenin en kolay tanı konan ve en iyi tedavi edilebilen hastalıklarıdır. Luteal faz disfonksiyonu, anovulasyon ve amonere ovülasyon bozuklukları arasında yer alır. Anovulasyon luteal fazın ortasında serum progesteron konsantrasyonununun 30 nmol/L seviyesinin altında olması ya da siklus boyunca gelişen bir folikülün olmaması durumudur. İnfertil çiftler değerlendirilirken ilk olarak ovulasyonun varlığı belirlenir (Kızılkaya 2009, Speroff 2007).

1.2.2.2. Over ve hipotalamo- hipofizer infertilite nedenleri:

Overlerde oluşan bir patoloji infertiliteye sebep olabileceği gibi, overleri kontrol eden üst mekanizmalarda meydana gelen bir patoloji de infertilite sebebi olabilmektedir (Kavlak 2002).

1.2.2.3. Hipergonadotropik amenore:

Nadiren de olsa, tümörler yüksek oranda gonadotropin üretebilirler ve bu durum genellikle akciğer kanseri ile ilişkilidir. Overler normal görünümlü folikülleri barındırır fakat gelişmekte olan folikül hücreleri lenfosit ve plazma hücrelerinin infiltrasyonu ile çevrelenmiştir (Boyar 2013).

1.2.2.4. Hipogonadotropik amenore:

Bazı infiltratif hastalıklar veya tümörler GnRH salgılanmasını düşürüp amenoreye sebebiyet verebilir (Boyar 2013).

1.2.2.5. Hiperprolaktinemi:

Hiperprolaktinemi overyal disfonksiyona sebep olabilmektedir. Prolaktin artışı ile bağlantılı olan amenore GnRH'nin pulsatil salgılanmasının inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Prolaktinomalar en fazla görülen hipofiz tümörleridir ve genellikle hiperprolaktinemiye sebep olurlar. Prolaktin kaynaklı olan infertilitede genellikle galaktore, amonere, oligomenore, luteal yetmezlik ve foliküler disfonksiyon görülmektedir. Prolaktin seviyesini arttıran diğer durumlar, gebelik ve emzirme esnasında görülen fizyolojik artış, stres veya ilaç kullanımı olabilir (Boyar 2013, Barın ve ve diğ. 2015, Beksaç 2006).

1.2.2.6. Hipotiroidizm:

Menstrüel düzensizlikler ve kanama sorunlarına hipotiroidili kadınlarda çok sık rastlanır. Hipotiroidizm, TSH'ye bağlı prolaktin seviyesindeki yükselişlere veya amenoreye sebep olabilir (Boyar 2013, Beksaç ve diğ. 2006).

1.2.2.7. Hipertiroidizm:

Hipertiroidizmde östradiol serum düzeyleri yükselebilir. Siklus ortası LH ve FSH pikleri düşebilir veya hiç olmayabilir. Tirotoksikozun tedavi edilmesi ile menstruel fonksiyon ve fertilité genellikle normale döner (Durmazoğlu 2015, Beksaç ve diğ. 2006).

1.2.2.8. Polikistik over sendromu (PCOS)

Polikistik over sendromu üreme çağındaki kadınları etkileyebilmektedir. Kronik anovulasyon ve hiperandrojenizm ile karakterize olmuştur. Düzensiz menstruel kanamalara ve anovulasyona neden olarak infertiliteye sebep olmaktadır. Hipotalamik düzeyde Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) ve dolayısıyla hipofizer gonadotropinlerin (FSH, LH) salgılanmasında bir bozukluk sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. PCOS'lu kadınların %30-40'ında LH seviyesi artış gösterir. Artmış LH sekresyonu insülin rezistansı, artış gösteren büyüme faktörleri, ovaryan steroidogeneizde blok, overyan ve adrenal androjen sekresyonunda disregülasyon gibi nedenlerle androjen seviyesindeki yükseliş foliküler arrest ve anovülasyona sebep olabilmektedir. Diğer tıbbi klinik durumların dışarıda tutulması ve aşağıdaki bulgulardan ikisinin varlığında PCOS tanısı konur:

- Oligoamenore veya amenore belirtileri
- Hiperandrojenemi
- Hiperandrojenizm
- USG ile saptanan polikistik overler

(Jonathen 2011, Baran 2009, Kızılkaya 2009, Beksaç ve diğ. 2006).

1.2.2.9. Hipertekozis: Over stromasını kaplayan teka hücrelerinin hiperplazisi sonucunda oluşmaktadır. Overler normal boyutlarda veya büyümüş olabilir. Kitleler en fazla 7cm çapına ulaşabilir. PCOS'un daha hızlı ve ciddi seyreden, tedaviye oldukça direnç gösteren bir formudur (Ulusoy 2005, Kızılkaya 2009, Beksaç ve diğ. 2006).

1.2.2.10. Luteal disfonksiyon: Yetersiz bir luteal faz, korpus luteum tarafından progesteron salgılanmasındaki yetersizliklerden kaynaklanır. Serum progesteron seviyeleriyle luteal faz anormallikleri arasında bağlantı olduğu düşünölmektedir. İnfertil kadınların yalnızca %3- 4'ünde luteal faz yetmezliği bulunur (Jonathen 2011, Kızılkaya 2009).

1.2.2.11. Servikse ilişkin faktörler: Servikal faktörler; serviksin yapısal anomalileri, servisit ve servikal mukus anormalliklerini kapsamaktadır. Servikal stenoz konizasyon sonrasında meydana gelen skar dokusu, dört ve üzerinde yapılan mekanik dilatasyon (abortus, dilatasyon & küretaj, uterusun boşalması vb.) ya da yoğun lazer kullanılması gibi durumlarda infertiliteye sebebiyet verebilmektedir. Stenoz, endoservikal epitelin yapısal bozukluğuna neden olur bu da servikal mukusun bozulmasına sebep olmaktadır. Enfeksiyon ya da kronik servisit servikal mukusun özelliğini yitirmesine neden olarak infertilite sorunlarını ortaya çıkartabilir. Servikal mukusun pH'ındaki, kalitesindeki veya yoğunluğundaki değişimler mukusun fizyolojik işlevine engel olabilir (Uğur 2014, Kızılkaya 2009).

1.2.2.12. Uterusa ilişkin faktörler: İnfertil çiftlerin neredeyse yarısında bu faktör belirlenmektedir. Anatomik uterin faktörler, konjenital anomaliler, adenomlar, endometriyal yaralanmalar ve submukoz fibroidleri kapsamaktadır. Uterin faktörler gebelik oluşumunu düşük oranda da olsa etkilemesine rağmen oluşmuş gebeliklerin %25'i kaybedilmektedir. Bu durumda unutulmuş RİA'lar ve mukoza lezyonları, çok sık görülmesine de üreme yetersizliğine neden olabilir. Endometriyumun, implantasyondan luteal faza ve olgun desiduaya ilerlemesinde oluşan en küçük defektler bile infertiliteye sebep olabilmektedir. Bütün bunların dışında uterus agenezisi ve hipoplazisi gibi bazı uterus anomalilerinde de gebelik şansı yoktur. YÜT ile birlikte fertilizasyon sağlanabilir (Jonathen 2011, Kızılkaya 2009, Beksaç ve diğ. 2006).

1.2.2.13. Endometriyozis: Endometriyozis, endometriyum stromasının ektopik olarak bulunması şeklinde tanımlanan ve pelvik ağrı ile infertilitenin birlikte bulunduğu bir hastalıktır. Endometriyozisli olgularda genellikle potansiyel faktörler; bozulmuş folikülogenez, azalmış fertilizasyon, immünolojik faktörler (Antiendometrial antikorlar, antiover antikorları, antinükleer ve lupus antikoagülasyon antikorlar), implantasyon defektleri, mekanik faktörler (over kapsülündeki fibrozdan dolayı oositin atılamaması, tubal obstrüksiyon gibi), intraperitoneal inflamatuvar yanıt ve endokrin anormalliklerdir. Endometriyozisi olan kadınların yaklaşık olarak yarısının çocuk sahibi olabilmeleri için tedavi edilmeleri gerekir. İnfertilite sebebi ile başvuran kadınların yaklaşık olarak %25'inde endometriyozis belirlenmektedir (Hassa 2004, Kızılkaya 2009, Speroff ve Fritz 2007, Beksaç ve diğ. 2006).

1.2.2.14. Tubal faktörler: İnfertilite nedenlerinden %25-30'unu tubal faktörler oluşturmaktadır. Tüplerin kısmen ya da tamamen tıkalı olması sperm ile yumurtanın buluşmasına engel olarak fertilizasyonu imkansız hale getirir. Tubal faktörlerin sebep olduğu infertilite cerrahi olarak tedavi edilebilir. Tubal cerrahinin başarısı tuba çevresindeki adhezyon formasyonunun ölçüsüne, fallop tüpünün fimbria uçlarının durumuna ve lümeninin hangi oranda hasar gördüğüne bağlıdır. Hasar gören tüpün fizyolojik fonksiyonu geri döndürülemez bir şekilde değişmiş olur. Uterin kavite ile ilişkisi devam eden hidrosalpinks varlığında IVF ile elde edilen gebelik ve canlı doğum oranları azalmaktadır (Demiroglu ve diğ. 2006, Kızılkaya 2009, Speroff ve Fritz 2007, Beksaç ve diğ. 2006).

1.2.2.15. Peritoneal faktörler: Bu faktörler, abdominal kavitenin peritoneal yüzeyindeki bir anomali veya endometriyozis sebebiyle ovulasyon esnasında oositin overden tubal ostiuma taşınmasını engel olan durumlarda ortaya çıkar. Genellikle travma (ameliyat, pelvik yaralanmalar) ve kronik inflamasyon (enfekte kürtajlar, rüptüre apandisit, mezenterik lenfadenit, gonore, PID) sonucu ortaya çıkan peritubal ve paratubal yapışıklıkları kapsar. Peritoneal faktörler infertilitenin yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır. Peritoneal faktörlerin belirlenmesinde laparaskopi standart uygulamadır (Jonathen 2011, Kızılkaya 2009, Beksaç ve diğ. 2006).

1.2.2.16. Vulva ve vajinaya ait faktörler: Vulva ve vajinada oluşan bir anatomik bozukluk koitusa engel olmaktadır. Bunlar imperfore himen, vajinada enine veya boyuna septum varlığı, parsiyel veya total vajina yokluğu gibi durumlardır. Bu durumlarda koitusun yani dolayısıyla spermlerin vajinaya geçişi önlenmektedir. Disparoni tam olmayan veya nadir olan cinsel ilişkiye sebep olduğundan infertilite nedeni sayılabilir. Ayrıca vajinismus da bir infertilite nedeni olarak sayılabilmektedir. Bazen normal koitus olsa ve spermler vajina arka forniksine ulaşsa bile vajinanın spermler üzerine negatif etkisi olabilir. Bazı kişilerde vajina asididitesi yüksek oranda veya bu asidideyi nötröle eden servikal mukus yetersiz oranda olabilmektedir. Ortaya çıkan asit ortamın, arka forniksde biriken spermlerin üzerine öldürücü etkisi vardır (Kavlak 2002).

1.2.3. Ovulasyon faktörlü infertilitenin araştırılması

Ovulasyon ile ilgili bozuklukları dışarıda bırakabilmek için ovulasyonun varlığı doğrulanmalıdır. Siklus ortası ağrı, premenstrual semptomların görülmesi ve dismenore ile birlikte düzenli menstrüal siklusu olan kadınların birçoğunda menstrüal siklusun 14.

gününde ovulasyon gerçekleşir. Ayrıca oositlerin azalması ya da tükenmesi ve prematür overyan yetmezliğin ortadan kaldırılması amacıyla over rezervi değerlendirilmelidir. Anormal over fonksiyonu; HPA eksenindeki düzensizlikle ya da primer over disfonksiyonu ile ilişkili olabilmektedir. Bu yüzden bu eksenin değerlendirilmesi gerekir. Anamnez ve fizik muayene sonrası endokrinolojik değerlendirme yapılarak FSH, LH, progesteron, E2 ve TSH'nin serum konsantrasyonları değerlendirilir (Kızılkaya 2009).

Ovulasyonun belirlenmesi/doğrulanması; Bu değerlendirmede kullanılan yöntemler ovulasyonun tahmin edilmesine ya da saptanmasına olanak sağlar. Ovulasyonun değerlendirilmesi için kullanılan testler indirekt ve direkt olarak ayrılır. Direkt testler (USG, Laparoskopi) genellikle pahalı ve invaziv teknikler olmaları sebebi ile ovulasyonun doğrulanmasında öncelikli olarak tercih edilmeyebilirler. İndirekt testlerle (bazal vücut ısısı, kan, idrar ya da tükürkte LH ölçümü, midluteal progesteron tayini vb.) ovulasyonun varlığı tespit edilebilmektedir (Kızılkaya 2009).

1.2.3.1. Bazal vücut ısısı (Basal body temperature-BBT):

Bazal vücut ısısı, dinlenme halindeki vücut ısısı olarak tanımlanabilir. Ovulasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini, ovulasyon zamanını belirten basit, ucuz ve klasik bir ölçüm yöntemidir. Kadının vücut ısısının her gün sabah uyanınca ve herhangi bir aktivitede bulunmadan önce oral yolla ölçülüp kaydedilmesi ile bir grafik meydana getirilir. Ölçüme siklusun ilk gününde başlanıp, üç siklus süresince devam edilip sonrasında değerlendirilmelidir. Ovulasyondan sonra oluşan korpus luteum tarafından salgılanan progesteronun ısı üzerinde etkisi vardır. Vücut ısısının yükselmeye başlaması, progesteron konsantrasyonu 5ng/ml'nin üzerine çıktığını gösterir. Progesteronun salgılanması menstrüel siklusun foliküler fazı esnasında, bazal vücut ısısında yaklaşık 1,7 °C artışa sebep olur. Progesterondaki artış ovulasyondan iki gün önce ya da bir gün sonraki herhangi bir zamanda ortaya çıkabileceğinden, vücut ısısındaki yükselme ovulasyon zamanını kesin olarak belirlememekte fakat ovulasyonun gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Normal bir luteal faz en azından 10 gün vücut ısısının artışı ile karakterizedir. Ovulasyonun ardından vücut ısısında 10-11 günden daha kısa süren yükseliş luteal faz bozukluğunu düşündürülebilir. Ancak hastalık, stres, enfeksiyon, uykusuzluk gibi faktörler de vücut ısısını arttırabileceğinden, bu durumların varlığı mutlaka değerlendirilmelidir. Çiftlere BBT sonucuna göre beklenen ovulasyondan 3-4 gün önce ve 2 gün sonraki süreçte 36- 48 saatte bir cinsel ilişki önerilebilir (Speroff ve Fritz 2007, Jonathen 2011, Kızılkaya 2009, Aktaş 2007).

1.2.3.2. Midluteal dönemde serum progesteron düzeyinin değerlendirilmesi:

Ovulasyon değerlendirme testlerinin içerisinde en iyisidir. Ovulasyonun ardından korpus luteumun belirmesiyle birlikte luteinize olan granüloza hücrelerinden progesteron salgılanmaya başlar. Ovulasyonu takip eden 7. günde progesteron en yüksek değerine ulaşır. Progesteronun yükselişinin saptanması ovulasyonun gerçekleştiğini gösterir. 3ng/mL altındaki progesteron düzeyi foliküler fazı, 3 ng/mL. nin üzerindeki düzey ise ovulasyonu gösterir. Midluteal dönemde (18-24. günler arası ortalama 21. gün) alınan kandaki progesteron değeri en azından 6,5 ng/mL olmalıdır. Tek ölçümde progesteron düzeyinin >10 ng/mL ya da ovulasyondan sonraki 5 ve 9. günler arasındaki üç ölçümün toplamı >30 ng/mL olması yeterli luteal desteğin oluştuğunu belirtir. Luteal fazın yeterliliğini belirlemede iki ya da üç siklus arası değerlere göre karar verilmesi de bazı araştırmacılar tarafından önerilmektedir. Ovulasyonun zamanlaması için serum progesteron ölçümü yapılacak ise en uygun zaman siklus uzunluğuna göre ayarlanmalıdır. Bu, yaklaşık olarak beklenen menstruasyondan 1 hafta öncesidir (Speroff ve Fritz 2007, Jonathen 2011, Kızılkaya 2009, Kılınç 2007).

1.2.3.3. İdrarda günlük LH takibi:

Vücut sıvılarında (kan, idrar, tükürük) LH ölçümü ovulasyon hakkında fikir verebilmektedir. Kanda LH piki oluştuğundan sonra idrarda yapılacak LH seviyesi ölçümü sonucu yaklaşık 24-36 saat içerisinde oluşacak ovulasyonu gösterir. Test sonuçları günlük alınan sıvı miktarına ve testin yapılış zamanına göre değişkenlik gösterebilir. Hastalara testin yapılmasından kısa süre önce fazla miktarda sıvı almaması gerektiği hakkında bilgi verilmelidir. Yapılan testlerde, en iyi LH piki ile korelasyonun öğleden sonra geç saatlerde (saat 16.00-22.00) olduğu görülmüştür. İdrar LH'nin belirlenmesi cinsel ilişki ve intrauterin inseminasyon (IUI) zamanlamasında kullanılabilir. Sonuç olarak, fertilitenin en yüksek olduğu dönem, LH yükselişinin olduğu gün ve onu izleyen sonraki iki gündür. İlk pozitif testin olduğu günün ardındaki gün en uygun ilişki ya da inseminasyon günü olmalıdır (Speroff ve Fritz 2007, Jonathen 2011, Kızılkaya 2009).

1.2.3.4. Over rezervinin değerlendirilmesi:

Azalan over rezervi, kalan oositlerin sayı ve kalitesinin düşük olması sebebiyle fekondabilite olumsuz etkilenir. Buna yönelik yapılan testler, hem azalan over rezervine hem de tedavi sırasındaki kontrollü overyan hiperstimülasyona (KOH) yanıt alınmasını belirlemede yardımcı olmaktadır. 30-35 yaş üzeri tüm infertil kadınlarda, açıklanamayan infertilitesi olan ve ovulasyon indüksiyonuna yetersiz yanıt öyküsü olan kadınlarda over

rezervini değerlendirmek için; siklusun ikinci veya üçüncü günü FSH, östradiol ve klomifen sitrat challenge testi (CCCT) yapılması önerilebilir (Kızılkaya 2009). Serum inhibin B ve Anti-Müllerian Hormon (AMH) seviyeleri, antral folikül sayısı (AFC) ve over boyutu, ayrıca gonadotropin serbestleştirici hormon agonist uyarı testleri (GAST), eksojen folikül stimule edici hormon over rezerv testi (EFORT) gibi dinamik testler over rezervinin belirlenmesinde kullanılabilecek seçeneklerdir (Durdağ ve Berker 2008).

Siklusun 3.günü FSH düzeyi; Erken foliküler fazda yani siklusun 2-4. ortalama 3. gününde FSH ve östradiol düzeyleri değerlendirilir. FSH ve östradiol seviyeleri gonadotropinlere karşı olan cevabı verir. FSH değerinin 10-15 mIU/mL'den düşük seviyede olması yeterli over rezervini gösterir. Bunun üzerindeki değerler anormal olarak değerlendirilir. Yüksek östradiol düzeyi de (>80 pg/mL) over rezervinin tükendiğini ya da azaldığını gösteren bir bulgu olarak kabul görür (Kızılkaya 2009).

Klomifen sitrat challenge test (CCCT); Klomifensitrat (CC) hipotalamustaki östrojen reseptörleri ile etkileşime girerek LH ve FSH sekresyonunu yükseltir. Test FSH yanıtının biyolojik olarak değerlendirilmesine olanak sağlar. Siklusun ikinci veya üçüncü günü bazal FSH ve östradiol ölçümünden sonra, 5-9. günleri arasında klomifen sitrat (her bir gün için 100 mg/gün) oral olarak verilir ve 10. günde tekrar FSH ölçümünün değerlendirilmesi yapılır. Aşırı FSH yanıtı kendiliğinden ya da yardımcı üreme teknikleri (YÜT) ile gebelik oluşumu olasılığının düşük seviyede olduğunu göstermektedir (Kızılkaya 2009).

1.2.3.5. Ultrasonografi (USG);

Ovulasyon gerçekleşene kadar dominant folikülün gelişimi takip edilerek ovulasyonun varlığı kanıtlanabilir. Abdominal ve transvajinal yollar ile pelvik yapılar değerlendirilebilirken (overyan kistler vb.) ovulasyon açısından da antral folikül sayısı, folikül gelişimi, olgunluğu, endometriyum kalınlığı görüntülenir (Jonathen 2011, Kızılkaya 2009). Ovulasyonun gerçekleştiğini gösteren üç ultrasonografik bulgu vardır:

1. Folikül kollapsı-folikülün dairesel yapısının yok olması
2. Douglas boşluğunda serbest sıvı (ovulasyon sıvısı) bulunması
3. Folikül eksojenitesinin artış göstermesi

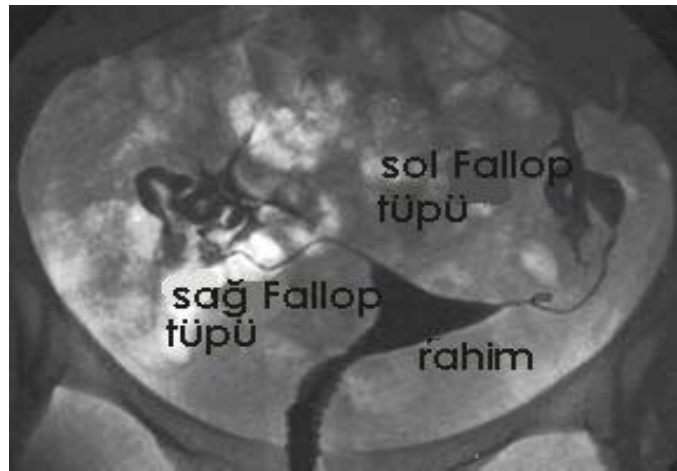
Korpus luteum ultrasonografik düzeyde düzensiz şekilli, internal ekoları olan yıldız şekline benzeyen bir görünümüdür. Ultrasonografik incelemeler sayesinde yetersiz folikül gelişimi, prematür over yetmezliği, rezistan over sendromu (Savage sendromu), hipoplazik

overler, endometriyoma ve polikistik over sendromu gibi durumların incelenmesi sağlanır (Kızılkaya 2009).

1.2.4. Yapısal faktörlerin araştırılması

1.2.4.1. Histerosalpingografi (HSG):

HSG tubaların açık olduğunu tespit etmek için kullanılır. Tuba tıkanıklıklarını tespit emekte %85-100 duyarlılığa sahiptir. Servikal kanaldan uterusu radyoopak boyalı solüsyonun (3-6 ml) yavaş bir şekilde enjekte edilmesi yöntemi ile uygulanır. Enjekte edilen madde uterus kavitesinden tubalara ve periton boşluğuna doğru devam eder. İşlem sırasında fluoroskopi altında çekilen düz grafiler (x-ray) tubaların açık ya da kapalı olup olmadığını, uterin ya da tubal bir yapısal anomalinin var olup olmadığını gösterebilir (Çizim 1.9) HSG esnasında kramp oluşumunu önlemek amacıyla nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar kullanılabilir. Endometriyal poliplerin tespit edilmesinde de faydalı olabilir. Erken foliküler fazda, menstrual kanamanın sona ermesinden 2-5 gün sonra uygulanır. Zamanlamanın bu şekilde ayarlanması, olası bir gebeliğin bozulma riskini en aza indirmektedir. Ayrıca endometriumdan menstrual kalıntılar tam olarak dışarı atılmış olmaktadır. Böylece menstrual kalıntıların işlem sırasında verilen sıvı yardımı ile tüplere, oradan da peritoneal kaviteye geçerek oluşturabileceği emboli riski en az orana indirilmiş olmaktadır. (Speroff ve Fritz 2007, Jonathen 2011, Kızılkaya 2009).



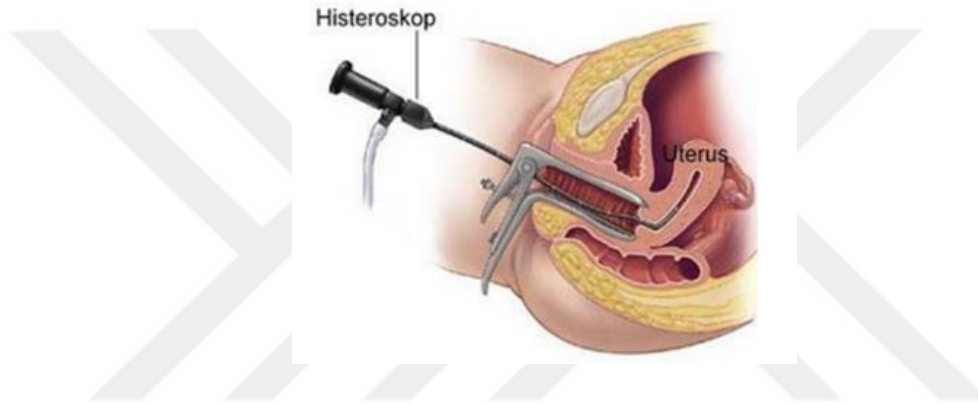
Çizim 1.9. Histerosalpingografi (HSG) (basaronal.com)'dan alınmıştır.

HSG sayesinde proksimal ve distal tubal tıkanıklıklar, salpenjitler, endometriyal polipler, fibroidler, miyomlar, septa varlığı, uterusun yapısal patolojileri ve uterin

yapışıklıklar (Asherman sendromu) belirlenebilir. Hem tanı amaçlı hem de tedavi yöntemi olarak kullanılır (Kızılkaya 2009).

1.2.4.2. Histeroskopi:

Genellikle daha ileri evre bir tetkik yöntemidir. Uterin kavitenin histeroskop yardımı ile endoskopik olarak incelenmesidir. Fertiliteye olumsuz etkisi olan intrauterin patolojinlerin tanı ve tedavisinde kesin sonuç vermesi avantajıdır. Histeroskopide uterin kavitenin CO₂ ya da yüksek moleküler ağırlıklı dextran ile doldurulması ile incelenmesi sağlanır (Çizim 1.10). Bu yöntem HSG ve histerosonografiyi tamamlar ve özellikle cerrahi girişim düşünülüyorsa kullanılır (Speroff ve Fritz 2007, Kızılkaya 2009).



Çizim 1.10. Histeroskopi (basaronal.com)'dan alınmıştır.

Histerosonografi; uterin kavitenin değerlendirilmesi için kullanılır. İntrauterin bir kateter ile uterin kaviteye sıvı (genellikle serum fizyolojik tercih edilir) aktarılarak transvajinal USG ile kavite değerlendirilmektedir.

1.2.4.3. Rubin testi (boyar madde insuflasyonu):

Karbondioksit gazının basınçla özel bir kanül aracılığıyla servikal kanaldan verilmesi işlemidir. Basıncın 180 mm/Hg'nin altında olması ve geçen gazın sesinin stetoskop ile duyulması fallop tüplerinin açık olduğu anlamına gelir. Fallop tüpleri açık ise karbondioksit, hasta dik oturduğunda abdominal kaviteden yükselir ve subdiyaframatik alanı irrite ederek hastada geçici omuz ağrısına sebep olur. Bu da sonuç olarak fallop tüplerinin açık olduğunu ispat eden subjektif bir bulgudur (Kızılkaya 2009).

1.2.4.4. Endometriyal biyopsi (EMB):

Endometriyal biyopsi endometriyumun progesterona olan cevabını değerlendirir. Luteal faz yetersizliği veya bozukluğunun tespit edilmesinde temel araştırma yöntemidir.

Test genellikle 28 gün süren siklusun 24 ve 26. günleri arasında veya beklenen mensden 2-3 gün öncesinde yapılmaktadır. Küçük bir kanül aracılığı ile uterustan alınan biyopsi sonucu sekretuar endometriyal yapının incelenmesi, ovulasyonun histolojik olarak kanıtıdır. Histolojik olarak siklusun hangi gününde olduğunun hesaplanmasına olanak sağlar. Ayrıca biyopsi endometriumun hormonlara karşı verdiği cevabı yansıttığından luteal fazın yeterli olup olmadığını da belirtebilir. Biyopsi işleminin riski oldukça az olmakla birlikte; enfeksiyon, kanama, mevcut gebeliğin sonlanması ve uterus perforasyonu gibi riskleri de taşımaktadır (Speroff ve Fritz 2007, Kızılkaya 2009).

1.2.4.5. Tanısal laparoskopi:

Laparoskopi menstrual siklusun ilk yarısında foliküler fazda gerçekleştirilmektedir. İşlemden 8 saat önce kadına oral olarak bir şey verilmez. Çoğunlukla genel anestezi altında ve kadın litotomi pozisyonunda iken ön abdominal duvarda açılan kesiden, küçük bir endoskop yardımı ile batına girilir. Batın içi organlarla abdominal duvarı eleve etmek amacıyla periton içine bir iğne aracılığı ile CO₂ verilir. Laparoskopide uterus, fallop tüpleri ve overlerin incelenebilir. Ayrıca laparoskopi sayesinde endometriyozis ve pelvik adezyonlar gibi peritoneal ve tubal faktörler tespit edilebilir. Laparoskopi sırasında transservikal olarak enjekte edilen metilen mavisi ile tüplerin açık olup olmadığı da tespit edilir. HSG sonucu anomali şüphesi olmadığı takdirde laparoskopi hastanın değerlendirilmesinde en son uygulanması gereken invaziv bir yöntemdir. Bu nedenle laparoskopi infertilite değerlendirmesinde son basamaktır. Ancak ileri yaş hasta gruplarında, pelvik adezyon ya da endometriyozis şüphesi olan kadınlarda erken dönemde laparoskopi düşünülebilmektedir (Jonathen 2011, Kızılkaya 2009).

1. 2. 5. Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT)

1.2.5.1. Yardımcı üreme tekniklerinde tedavi aşamaları

Yardımcı üreme tekniklerindeki tedavi basamaklarından birisi olan Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon (KOH) konsepti IVF pratiğinden doğmuştur (Akın 2005). Bir diğer basamak ise ovulasyon indüksiyon protokolleri uygulamalarıdır. Kısa protokolde gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) uygulanmasına siklusun ilk günü başlanıp, insan koryonik gonadotropini (hCG) gününe kadar devam edilirken 3. günden itibaren tedaviye FSH/hMG (insan menopozal gonadotropin) eklenir. Çok kısa protokolde ise siklusun 1. günü GnRH ile başlanır ve 3 günün ardından kesilir. Tedavi FSH/hMG ile devam ettirilir. Amaç, uyarıcı etkiden (flare-up) faydalanmaktır. Uzun protokolde; GnRH uygulamasına önceki siklusun 21. gününde başlanır. Mensin 3. gününde hipofizer overyan supresyonun

sağlanıp sağlanmadığı kontrol edilir. Eğer serum östradiol düzeyi 50 pg/ml'den az ise yeterli olduğu düşünülerek FSH/hMG tedaviye eklenir ve GnRH uygulamasına hCG gününe değin devam edilir. Uzun protokolün başka bir uygulaması ise siklusun ilk günü analog tedavisine başlanması ve serum estrodiol düzeyi 50 pg/ml altında seyrettiğinde FSH/hMG eklenmesidir (Kızılkaya 2009).

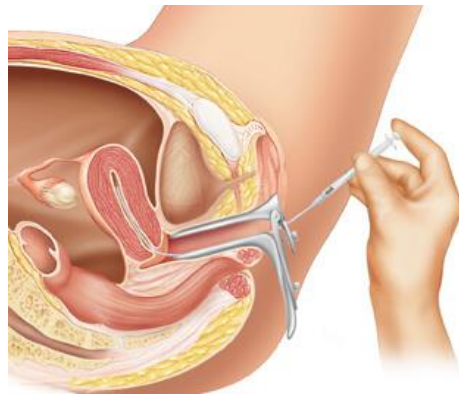
1.2.5.2. Yardımcı üreme tekniklerinde kullanılan yöntemler

İntrauterin inseminasyon (IUI)

Ciddi hipospadias, retrograd ejakülasyon, nörolojik impotans ve seksüel disfonksiyonu bulunan erkeklerde tercih edilebilecek bir tedavi yöntemidir. İnfertilite olgularının tedavisinde ilk basamak olarak kullanılan bir uygulamadır. Ovulasyon zamanında laboratuvarında özel ve uygun basamaklardan geçirilerek hazırlanan sperm katater aracılığıyla uterus içine enjekte edilir (Çizim 1.11).

İntrauterin inseminasyonun aşamaları:

- Overyan stimülasyon
- Siklusun takibi
- İnseminasyon zamanının ayarlanması
- Spermelerin hazırlanması
- Hazırlanan sperm ile inseminasyonun gerçekleştirilmesi (Speroff ve Fritz 2007, Kızılkaya 2009)



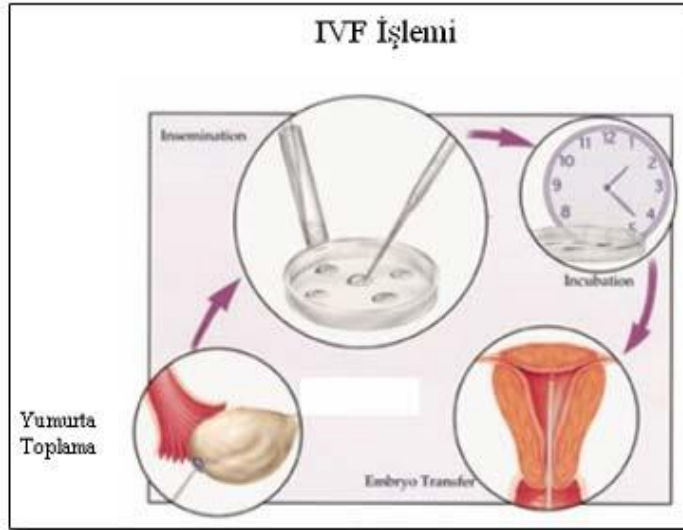
Çizim 1.11. İntrauterin İnseminasyon (Matthews 2019).

İn-Vitro fertilizasyon (IVF) ve Embriyo transferi (ET)

IVF'in temel prensibi; oosit ve spermin laboratuvar ortamında bir araya getirilerek fertilizasyonun kendiliğinden gerçekleşmesini sağlamaktır. Fertilizasyonun ardından embriyoların uterusu yerleştirilmesi aşamasına ise Embriyo Transferi (ET) adı verilir.

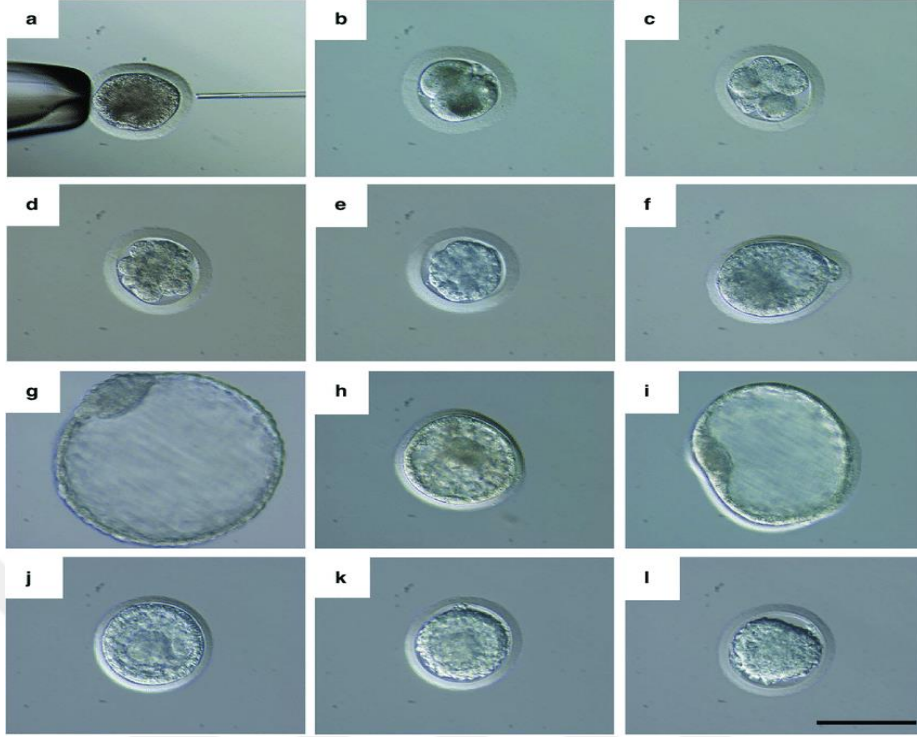
IVF'in Aşamaları (Çizim 1.12):

- Folikül gelişimi amacıyla over stimülasyonu
- Foliküllerin büyümesinin takibi (vajinal ultrasonla) oosit olgunluğuna karar verilmesi ve hCG enjeksiyonu
- Oositlerin toplanması (aspirasyonu)
- Spermlerin elde edilmesi
- Embriyo transferi (Kızılkaya 2019).



Çizim 1.12. İn vitro Fertilizasyon (IVF) (Kolday 2019).

İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)



Çizim 1.13. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu ve embriyo gelişimi. (Tıraş 2019).

IVF uygulamalarında şiddetli (ağır) erkek faktörü varlığında veya nedeni açıklanamayan infertilite olgularında ICSI-mikroenjeksiyonu aracılığı ile fertilizasyon sağlanır.

Başlıca ICSI endikasyonları; şiddetli oligoastenoteratozoospermi, tekrarlayan başarısız IVF denemeleri, antisperm antikorlar, ejakülatuar disfonksiyonlar, bilateral vaz deferensin konjenital yokluğu, bilateral ejakülatuar duktus obstrüksiyonu, başarısız vazovazektomi ve vazoepididimostomi, young sendromu ve azospermidir. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda kullanılan spermier ejakülattan veya testis dokusundan aspirasyon yoluyla ya da ekstraksiyon yöntemi ile sağlanır. Mikroenjeksiyon uygulanan gametler enjeksiyondan 16-18 saat sonra değerlendirilerek fertilizasyona karar verilir. Olgun oositlerin %65-80'i bu yolla fertilize olur. ICSI sonrası embriyolar (18. saat), nükleer evreden blastokist aşamasına (5 ya da 6.gün) kadar uygun görülen bir gelişim aşamasında uterusu yerleştirilir (Çizim 1.13) (American Society for Reproductive Medicine 2012, Beksaç ve diğ. 2006).

1.2.6. İnfertilite ve Azalmış Over Rezervi

Aynı yaş grubunda ki kadınların over stimülasyonuna cevapları çok farklı olabilir ve hepsinin farklı üreme potansiyelleri vardır. Over rezervi kavramı, üreme potansiyelini,

kalan oositlerin sayısının ve kalitesinin üzerinden değerlendirilmesine dayanır. Azalmış veya azalan over rezervi (AOR); üreme çağındaki kadınların over stimülasyonuna yanıtının düzenli mens gören benzer yaştaki kadınlara kıyasla düşük olan kadınları tanımlamak için kullanılır.

AOR, menopoz veya prematür over yetmezliğinden farklıdır (Cooper ve diğ. 2012). Her ne kadar over rezervi testleri yaygın bir şekilde uygulanmış olsa da, şu anda kullanımda olan testlerin bu durumla ilgili üç durumu; oosit kalitesi, oosit miktarı ve doğurganlığı tahmin edebilme yeteneği üzerinde tartışmalar devam etmektedir.

AOR nedeni ya da nedenleri henüz bilinmemektedir. Normal bir oosit havuzunda ki anormal hızda bir atrezi ya da anormal derecede küçük bir oosit havuzunda ki normal atrezi gibi patolojik sebeplerden ya da çan şeklinde ki nüfus dağılımının en uç noktasında yaşa bağlı azalma gibi sebeplerden ötürü gerçekleşip gerçekleşmediği bilinmemektedir. Oosit kaybı ve üreme potansiyelinde ki azalma; sistemik kemoterapiye, pelvik ışınlamaya maruz kalma ve genetik anormallikler ile (örneğin, 45, X kromozom mozaikliği, FMR1 premutasyonu) ilişkilidir. Azalmış over rezervi, sigara içmenin olası olması dışında, diğer yaşam tarzına bağlı davranışlar ile ilişkilendirilmemiştir (Cooper ve diğ. 1995).

Oosit sayısı ve kalitesi yaşla birlikte düşmekle birlikte, fertilité, benzer yaştaki kadınlar arasında önemli ölçüde değişmektedir. Bu nedenle, over rezerv testleri olarak bilinen birçok biyokimyasal ölçüm ve over görüntüleme yöntemleri üreme potansiyelini ve/veya over rezervini tahmin etmek amacı ile kullanılmaktadır. Düzenli mens olan kadınlarda, over rezervi testleri, menopoz ya da menopoz başlangıcında olup olmadığını veya fertilitéde ki azalmanın patolojik bir nedenden ötürü yaşanıp yaşanmadığını ayırt etmemektedir. İnfertil çifte yaklaşan klinisyenler, hastaların yaş gibi unsurlarını göz önüne alarak bireysel danışman olur ve tedavi planını şekillendirirler. Over rezerv testinin amacı, çiftlerin tedavi seçenekleri arasından seçim yapmalarına yardımcı olmak amacıyla danışmanlık ve planlama sürecine daha fazla prognostik bilgi eklemektir. Bununla birlikte, over rezerv testlerinin yanlış paylarının olduğunu ve hastaların yardımcı üreme teknolojisine (ART) veya diğer tedavilere erişimini engellemek için kullanılan tek kriter olmaması gerektiğini vurgulamak önemlidir. Azalmış over rezervinin kanıtları gebe kalamamak anlamını taşımamaktadır (Practice Committee of the Amerikan Society for Reproductive Mecisine 2015).

AOR, yardımcı üreme teknikleri kullanıldığında bile zayıf doğurganlık oranları ile karakterizedir. Azalmış over rezervi kavramı üzerinde bir birlik oluşmuş olsa da tanımı belirsiz kalmaktadır.

Azalmış over rezervini, prematür over yetmezliğinden (POF) ve zayıf over yanıtından (POR) ayırt etmek önemlidir. Erken menopoz veya primer over yetmezliği de denilen POF, 40 yaşından önce over fonksiyonlarının bitmesi ile ilgilidir. Üç belirtinin görüldüğü durumlarda tanımlanır: (i) en az 4 ay boyunca amenore, (ii) serum konsantrasyonlarında düşük östradiol ve (iii) yüksek oranda folikül uyarıcı hormon (FSH) (40IU/l' den fazla birkaç hafta arayla en az iki örnek (De Vos ve diğ. 2010, Goswami ve Conway 2005). POF ile ilişkili infertilite yardımcı üreme teknikleri ile tedavi edilemez.

Öte yandan POR, AOR'a daha yakın gibi görünmektedir. Bologna Avrupa Üreme Derneği (ESHRE) konsensusu, aşağıdaki üç özelliğin en az ikisinin mevcut olduğu durumlarda, kadınları “zayıf over yanıtı” olarak tanımlar: (i) ileri anne yaşı (≥ 40 yaş) veya POR için risk faktörlerinden herhangi birisi, (ii) öncesinde zayıf bir over yanıtı (geleneksel bir stimülasyon protokolüyle ≤ 3 oosit) ve (iii) anormal bir over rezerv testi (yani, antral foliküler sayım (AFC) $< 5-7$ foliküller veya AMH $< 0.5-1.1$ ng /ml) (Ferraretti ve diğ. 2011). Sonuç olarak, bu tanımlamaya dahil olabilmek için, bir kadının 40 yaşından büyük olması veya daha önce en az bir kontrollü over hiperstimülasyonu döngüsü geçirmiş olması gerekir. Bu nedenle, yardımcı üreme tekniklerini hiç geçirmemiş olan zayıf over rezervi belirteçlerine sahip genç bir infertil kadın Bologna kriterlerini karşılamamaktadır.

Bugüne kadar, AOR ile ilişkili infertiliteye sahip kadınlar için uygun tedavi konusunu ele alan hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla, belirteçler, cutoff değerleri ve değerlendirme teknikleri dahil olmak üzere AOR'un tanımına dair uluslararası bir fikir birliğinin yanı sıra bu özel popülasyona odaklanan çalışmalara da şiddetle ihtiyaç vardır. Tanımlamada spesifik test ve standartlar kullanılmalı ve iyileştirmeler gerçekleştikçe değişiklikler söz konusu olmalıdır.

Sonuç olarak AOR tanımı için; (i) POR için risk faktörlerinden herhangi birini taşıyor olması ve/veya (ii) anormal bir over rezerv testi (yani, antral foliküler sayım (AFC) $< 5-7$ folikül veya anti-Müllerian hormonu (AMH) $< 0.5-1.1$ ng/ml) kullanılabilir. (Cohen ve diğ. 2015).

1.2.7. MikroRNA (miRNA)

MikroRNAs aynı zamanda miRNA'lar olarak adlandırılırlar, ilk kez 20 yıl önce tanımlanmıştır (Lee ve diğ. 1993, Winghtman ve diğ. 1993). Ambros (2004), *Caenorhabditis elegans*'ın lin-4 geninden elde edilen özel 22 nükleotidlik (nt)-long

ribonükleik asit (RNA)'da tanımlanmıştır. Başlangıçta bu küçük RNA varlığının nematodlarla sınırlı olduğu düşünülmüş fakat 7 yıl sonra insan ve diğer omurgalılarda gelişimin zamanlamasıyla ilişkili olan homoloğu; LET7 geni bulunmuştur. Bunun sonrasında, çok sayıda miRNA tanımlandı ve bunların hareket mekanizmaları ve fonksiyonlarına olan ilgi gitgide hızlanarak artmıştır (Pasquinelli ve diğ. 2000, Bartel 2004).

1.2.7.1. RNA ve miRNA biyogenez tipleri

RNA'lar hücrenin sentezlediği moleküllerdir. Bilinen temel görevi; proteinler içinde çevrilen genetik bilgiyi çekirdekten sitoplazma içerisine aktarmaktır. Bununla birlikte, yeni RNA tipleri yeni rolleriyle, “noncoding RNA (protein kodlamayan RNA)” olarak adlandırılır, bunlar yeni ortaya çıkarılmıştır. MikroRNA'lar; RNA polimeraz II ve/veya RNA polimeraz III tarafından transkribe edilen 100-1000 nt primer (pri-miRNA'lar) uzunluğundadır. Pri-miRNA'lar; 60-70 nt pre-miRNA'lar üretmek üzere sırasıyla ribonükleaz Drosha ve Pasha (DGCR8) tarafından işlenir. Bu ürünler daha sonra Exportin-5 tarafından sitoplazmaya taşınır ve burada ribonükleaz Dicer ile bağlantı kurarak çift zincirli miRNA'nın kazanımı sürecini gerçekleştirir. Dicer; miRNA içeren, RNA'nın küçük düzenleyici süreçleri için gerekli RNase III sitoplazmik enzimidir (Zhang ve diğ. 2007).

1.2.7.2. Terminoloji

“miR”; miRNA'nın matur formunu temsil eder, “mir” ise; pre-miRNA'yı temsil eder. MikroRNA'lar genellikle sırayla küçük harf eklenerek belirtilir örneğin; miR-30b ile miR-30d hemen hemen aynıdır. Pre-miRNA'lar hemen hemen birbirleriyle aynı olan miRNA'lardan meydana gelir fakat bunların tire-sayı sonekiyle gösterilen genomik orijinleri birbirinden farklıdır. Örneğin; mir-194-1 ve mir-194-2 herikiside miR-194'den orijin alırlar fakat genomda farklı bölgelerde yer alırlar. Türler öne konulan üç harfle gösterilir, örneğin; hsa-miR-30d insan miRNA'sı iken (*Homo sapiens*) mmu-miR-30d fare miRNA'sıdır (*Mus musculus*). (Moreno-Moya ve diğ. 2014).

1.2.7.3. MikroRNA'nın rolü

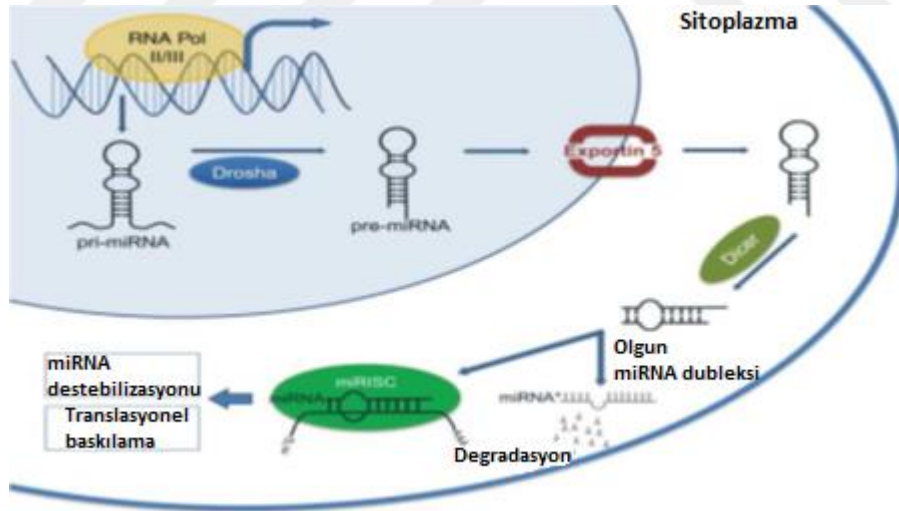
MikroRNA'lar bütün dokularda eksprese edilir ve hücrenel farklılaşma, proliferasyon, apoptozis gibi geniş spektrumlu süreçleri düzenler (He ve Hannon 2004). Görevleri bilinen miRNA'lar birbirlerinden çok farklı olabilirler örneğin; kanserde birçok miRNA onkogen düzenleyicisi olarak doğrudan karakterize edilmiş ve sınıflandırılmıştır

(onkomiRler); bunun aksine diğerleri tümör baskılayıcıları olarak tanımlanmıştır örneğin; let-7 ailesi; RAS, MYC, HMGA2 onkogenlerini ve hücre döngüsünün kontrol noktasını hedefler (Zahng ve diğ. 2007).

Üreme biyolojisinde tanı amaçlı miRNA'nın incelenmesine doğru bir eğilim olmasına rağmen birçok çalışma fonksiyonel rollerini araştırmamıştır. Çalışmalardaki ana konu üreme biyolojisiyle ilgili olan endometriozis (Wang ve diğ. 2013), endometriyal kanser (Gilabert-Estelles ve diğ. 2012), endometriyal reseptivite (Altmae ve diğ. 2013), dezidualisyon (Estella ve diğ. 2012), preeklampsi (Yang ve diğ. 2011) ve ektopik gebeliklerdir (Zhao ve diğ. 2012).

Bu moleküller sadece dokularda bulunmazlar, aynı zamanda birçok biyolojik örnekte yer alırlar (kanın tamamında, serum, plazma, ürin ve tuz). Küçük miktarlardaki miRNA'ların özel RNA ekstraksiyon metotlarıyla geri kazanımları sağlanabilir ve sonuçta bazı şirketler kolon merkezli kitler geliştirerek optimal seviyede geri kazanımı sağlayabilirler. Küçük RNA fraksiyonlarının doğru saflaştırılması jel-elektroforezi ile doğrulanabilir. (Moreno-Moya ve diğ. 2014).

1.2.7.4. MikroRNA biyogenezi



Çizim 1.14. Hayvan hücrelerinde miRNA biyogenezinin şematik gösterimi. Donedeu ve diğ. (2012)'den alınmıştır.

Primer miRNA (pri-miRNA) transkriptinin sentezi (genellikle RNA Pol II ile) ve ardından Drosha içeren mikroişlemci kompleksi tarafından sıralı nükleer işlemin ardından, miRNA prekürsörünün (pre-miRNA) Exportin 5 ile sitoplazmaya geçişi ve olgun bir miRNA/miRNA* dubleks oluşturmak için Dicer içeren bir endonükleaz kompleksi

tarafından pre-miRNA'daki ilmek bölgesinin çıkarılması gösterilmektedir. (Weimin ve diğ. 2016).

MikroRNA'lar doğal ve doğal olmayan yollarla sentezlenir (Ha ve Kim 2014). Doğal miRNAlar, miRNA dizilerini içeren bir saç tokası yapısı ile primer miRNAlarda ki RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. Çekirdek içerisinde mikroprosesör kompleks RNase III Drosha'dan oluşmuştur ve bunun kofaktörü DGCR8 (diGeorge sendromu için kritik bölge 8) saç tokası şeklindeki öncü miRNA'ları (pre-miRNA) üretmek üzere primer miRNA'ların sap-ilmik (fırkete-ilmik) kısmını keser. Exportin-5, sitoplazmada RNase III endonükleaz, Dicer bulunan bölgede pre-miRNA'lara çevrilir (Yi ve diğ. 2003). Bu pre-miRNA'lar üzerine RNA-induced silencing complex (RISC) yüklenmeden önce küçük RNA çiftlerine bölünür. RISC hedef mRNA'lara bağlanır ve bölünmeleri ve/veya inhibisyonları kendilerinin transkripsiyonuyla indüklenir (Bartel 2004). Doğal olmayan miRNA'ların biyogenezisinde mikroprosesöre gerek yoktur. Bu miRNA'lar diğer endonükleazlarla ya da sitoplazmanın Dicer süreci için transportundan önce çekirdekteki kısa fırketelerin direk transkripsiyonuyla üretilirler (Bak. Çizim 1.14). Ancak şu unutulmamalıdır ki; endojenöz küçük interfering RNAlardan (endo-siRNAs) miRNA üretimi farklıdır. Burada uzun çift zincir RNA'dan elde edilir ve multiple siRNA üretmek üzere Dicer tarafından işlenir (Suh ve Blelloch 2011).

1.2.7.5. MikroRNA tespit metotları

Geleneksel in-situ hibridizasyon (ISH), özel miRNA probları kullanılarak ve direk örnekler üzerinde hibridizasyon yapılarak hücre içindeki miRNA'ların görüntülenmesi şeklinde uyarlanmıştır. Bu teknoloji, formalinle fiksasyon parafin gömme (FFPE), dondurupkesme (Exiqon teknolojisi kullanılarak), hücre kültürü (Panomics teknolojisi kullanılarak) ve en son olarak aynı zamanda floresan in situ hibridizasyon probları (FISH) ile çalışılarak geliştirilmiştir.

Mikroarray halen en popüler miRNA tespit metodudur. Floresanla işaretli miRNA örneklerinin cam baskılı problar üzerinde hibridizasyonu, bunların taranması ve dataların işlenmesi süreçlerini içerir. Bu teknik hangi altyapıyı kullanacağınıza göre (örneğin Agilent-daha ekonomiktir, Affymetrix-daha geniş prob alanına sahiptir, Exiqon- küçük miktarda miRNA'ya karşı ne duyarlı olandır) 30 ng-5µg RNA gerektirir. Çünkü bunlar kısa uzunlukta tanınma dizileri içerir, her birinin erime sıcaklıkları farklıdır (T_m). En son olarak bu sorunun üstesinden, T_m standardizasyonuna sahip birbirine kenetli nükleik asit

probları (LNA) kullanılarak gelinmiştir (Castoldi ve diğ. 2006). Bu metot, fazla sayıda miRNA'nın eş zamanlı olarak tespit edilmesini ve aynı zamanda mikroarray'e de uyarlanabilmesini sağlar.

TaqMan-based ve polimeraz zincir reaksiyon dizileri reverse-transkripsiyon basamağı olan real-time qPCR gerektirir. Bu teknik miRNA'ların sonuna bağlanacak 5' ve 3' RNA ara parçalarına bağlanabilecek küçük RNA dizilerine ihtiyaç duyar. 3' ara parçaları matür miRNA'ya bağlanır ya da diğer küçük RNA'lar 3' uçlarında hidroksik grup taşırlar (genellikle Dicer tarafından katalizlenerek enzimatik bölünmeler yoluyla oluşur). Reverse transkripsiyon ardından PCR amplifikasyonunu takip eder. Bu tarz metodların faydalı yanı yeni miRNA'ların keşfedilmesi, dezavantajı ise; araştırma için 1 ve 5 µg RNA gerekmesidir.

En son teknoloji olarak, Nanostring nCounter metodu vardır. Burada sentetik RNA segmentleri özel moleküler barkodlarla oluşturulmuş farklı florokromlarla işaretlenir (Geiss ve diğ. 2008). Her bir prob miRTag olarak adlandırılır ve her bir miRNA için özeldir, bunların 3' ucuna bağlanır. Bu teknolojinin avantajı; amplifikasyon ve reverse transkripsiyona ihtiyaç duymamasıdır çünkü miktar dijital olarak ölçülür ve tek hücre seviyesinde ya da her hücrenin bir RNA kopyasının ölçülmesi mümkün olur.

1.2.7.6. Biyobelirteç olarak miRNA'lar

MikroRNA'nın plazma/serumda bulunmasının potansiyel hormonal ve bu moleküllerin vücudun uzak bölgelerine olan etkisiyle ilgili halen bilinen çok az şey vardır. Serumda bulunan miRNA seviyesi nispeten stabildir ve yüksek sıcaklığa maruz kaldığında, yüksek ya da düşük pH'da veya dondurma-çözdürme sikluslarında bozulmaz (Chen ve diğ. 2008). Son zamanlarda keşfedilen miRNA taşıyıcısı (vasıtası) olarak hareket eden protein-lipoprotein kompleksi (aynı zamanda ekosozom olarak bilinir) belki de bu görüşü açıklayabilir (Valadi ve diğ 2007, Smalheiser 2007). Son çalışmalar, endositoz yoluyla alıcı hücrelere aktarılabilen 20-100nm kadar küçük miRNA içeren veziküllerin seramid-bağımlı salgı aracılığıyla salındıklarını tanımlamıştır (Kosaka ve diğ. 2010). MikroRNA'lar aynı zamanda yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDLs) ile taşınabilir ve alıcı hücreler tarafından nSMase2 içeren yolaklar aracılığıyla özümser (Vickers ve diğ. 2011). Bununla birlikte, başka çalışmalar, plazmanın %90'dan fazlasında ve serumda veziküller tarafından çevrelenmiş miRNA'lar olmadığını göstermiş fakat bunun yerine

özellikle AgoII-miRNA komplekslerinde, protein kompleksinin kofraksiyonu şeklinde bulduklarını göstermiştir (Arroyo ve diğ. 2011).

Serumda bulunan birçok miRNA'lar, hastalıkların durumunun tahmininde ya da kolerasyonunda ve birçok kötü huylu tümörün prognozunda kullanılabilir. Bunlarında ötesinde, proteomik ya da transkriptomic yaklaşımlarıyla karşılaştırılabilirler. Klinik uygulamaya uyarlanmaları daha kolaydır çünkü yalnızca yaklaşık tespit edilebilen 1500 insan miRNA'sı vardır (Cortez ve diğ. 2011). Buna rağmen, miRNA'nın noninvaziv marker olarak kullanılmasının önündeki en önemli engel yayımlanmış datalarda aynı patoloji ve şartlarda farklı sonuçlarla karşılaşılmasıdır. Bunun sebebi, bu alanda ortak bir metodolojinin standardize edilememiş olması olabilir. Eski bilgilere nazaran, Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) kullanırken olabildiğince hemolizizden kaçınmak ya da bunu kontrol altına almak çok önemlidir çünkü bu PCR süresince polimeraz reaksiyonunu bloke eder. Yine eski bilgilere dayanarak, sonuçların tutarlılığı kantitatif PCR mixine farklı organizmalardan elde edilen sentetik miRNA'lar eklenerek geliştirilebilir, *C. elegans*'dan elde edilen "cel-miR-39" gibi (Mitchell ve diğ. 2008).

1.2.7.7. Farmakolojik ajan olarak miRNA'lar

Şu an miRNA'nın farmakolojik ajan olarak kullanılmasının önünde iki büyük engel vardır. Birincisi; bir miRNA çeşitli genleri hemen hedef alabilir. Neyse ki, araştırmalar *in vivo* olarak miRNA'nın stabilitesinin sağlanmasına odaklanmış ve miRNA'ların hedef olarak özel hücre ya da organlara yönelimlerini sağlamışlardır. Örneğin; konjuge miRNA; lipidler (de Antonellis ve diğ. 2013), polimerler (Klimenko ve Shtilman 2013), ya da peptidler (Jarver ve diğ. 2012) gibi molekülleri taşırlar. İkinci olarak ise değiştirilmemiş miRNA, doku kültüründe ve *in vivo* olarak, özel olmayan interferon yanıtı tetikleyebilir.

Birçok ilaç şirketi insan hastalıklarında miRNA'nın tedavi amaçlı kullanmak üzere geliştirilmesine yönelik çalışmalar başlatmışlardır.

Sonuçta, insan üremesinde, doku gelişiminde ve hücre farklılaşması ve çoğalmasında miRNA'nın önemli olduğu bilinmektedir. Bu moleküllerin saptanabilmesi için; RT-PCR, microarray, in sütu hibridizasyon ve Nanostring nCounter gibi birçok ortak yöntem tanımlanmıştır. MikroRNA çeşitli yolaklar üzerindeki parakrin sinyallere aracılık eder ve potansiyel bir biyobelirteç olarak gösterilebilir (Moreno-Moya ve diğ. 2014).

1.2.7.8. Üreme hastalıklarına biyobelirteç olarak miRNA işaretlenmesi

MikroRNA moleküllerinin vücut sıvılarında sabit olarak tanımlanması (tespit edilmesi) bunların makul birer klinik tanı biyobelirteçi olarak kullanılmasının yolunu açar (Chen ve diğ. 2008, Weber ve diğ. 2010). MikroRNA'nın eşsiz özelliği, klinik örneklerde büyük ölçüde bozulmamış şekilde kalması, üreme hastalıklarının moleküler fenotipini belirlemesi ve vücudun fizyopatolojik durumunu monitörize edip ve değerlendirmesidir. miRNA'nın serum/plazmada kalması minimal düzeyde invaziv tanı biyobelirteçi olması açısından umut vaat edicidir böylece daha hassas ve özel testlere ulaşımı sağlayabilir. Biosıvılarda tespit edilen miRNA'lar hücrel ya da ekstraselüler kaynaklı olabilir. Dolaşan ya da ekstraselüler miRNA'lar stabilite gösterirler ve eksozom ya da mikroveziküller gibi çeşitli protein kompleksi veya membranöz partiküller içeren inklüzyonlar tarafından gerçekleştirilen RNase degradasyonundan korunurlar (Chen ve diğ. 2008, Weber ve diğ. 2010). Bu sonuçlar, ekstraselüler miRNA'nın biyolojik fonksiyonlarının sinyal molekülleri ve hormonlara benzerlik gösterdiğini ifade eder.

Ekstraselüler miRNA serum ve foliküler sıvıları da içeren çeşitli biosıvılarda tespit edildiğinden beri (Sang ve diğ. 2013, Gilad ve diğ. 2008) bu küçük düzenleyici RNA'ların ovulasyon sürecinde bilgi verici biyobelirteçler olarak kullanılabilmesinin önü açılmıştır. Klinik kullanım olarak plazma/serum miRNA'larına odaklanılmalıdır.

Birkaç yıl içinde yayımlanan ilk kan-temelli biyobelirteç miRNA çalışması kanser için yapılmıştır (Resnick ve diğ. 2009, Valadi ve diğ. 2007). Bundan sonra, fizyolojik ya da patolojik şartlardaki değişikliklerde örneğin; gebelik, kalp yetmezliği ve sepsis (Chim ve diğ. 2008, Wang ve diğ. 2010) plazma/serum'daki miRNA ekspresyon profillerinde önemli ölçüde değişiklikler bulunmuştur. Ovaryumda yapılan son çalışmada, over kanserinde noninvaziv belirteç olarak plazma/serumda miRNA kullanılmıştır (Zheng ve diğ. 2013).

Over-özel miRNA'ların serumda tespit edilmesi erken tanı ve prognozdan daha fazla verim elde edilmesini sağlayabilir ve tedavinin bireyselleştirilmesi açısından da iyi bir potansiyel oluşturur. Bu yeni yaklaşım, over rezervinin tespit edilmesini, overin endokrin fonksiyonunun belirlenmesini ve embriyonun implantasyon sürecini değerlendiren, gelecek klinik yönetim açısından potansiyel bir devrimdir (Imbar ve Eisenberg 2014).

1.2.7.9. MikroRNA ve ovaryum

Ovaryumda; folikül gelişimi ve seçilimi, atrezi, ovulasyon ve luteolizis endokrin ve parakrin faktörlerle yakından ilişkili, ekspresyonu ve ilişkileri sıkıca düzenlenmiş oldukça fazla gen tarafından kontrol edilir (Ro ve diğ. 2007, Huang ve diğ. 2011). Ovaryumdaki genlerin düzenlenmesinde major gen düzenleyici sınıflardan biri olarak bu miRNA moleküllerinin de dahil edilmeleri önerilmiştir. Ovaryumlardaki miRNA popülasyonunun insan ve diğer türlerde gösterilmesi amacıyla microarray, yüksek verimli kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) teknikleri kullanılabilir (Mishima ve diğ. 2008, Li ve diğ. 2011). Bu çalışmalar, farklı türlerin ovaryumunda overyan fonksiyonlarda önemli olabilecekleri düşünülen çeşitli miRNA'ların ekspresyonunu göstermiştir. Türler dikkate alınmadan; let-7 ailesi, miR-21, miR-99a, miR-125b, miR-126, miR-143, miR-145 ve miR-199b birçok türün ovaryumunda ortak bulunan miRNA popülasyonlarıdır (Hossain ve diğ. 2012). Biyoinformatik tahminleri, taramaları ve gen ontoloji analizleri; ağırlıklı olarak memeli ovaryumlarında hedef genleri eksprese edilen miRNA'ları çeşitli biyolojik süreç ve yolaklarda ya da moleküler bağlantılarda, hücre siklusunun düzenlenmesi, hücre ölümü, hücreden hücreye sinyal iletimi, hücresel büyüme, gelişim ve çoğalma, endokrin sistem hastalıkları, overyan fonksiyonların altında yatan çeşitli yolaklarda da tespit etmiştir (Hossain ve diğ. 2009).

1.2.7.10. Oositte Dicer'in rolü

Overyan fonksiyonlarda miRNA'nın rolünün, öncelikle Dicer yoluyla altı çizilmiştir (Luense ve diğ. 2009). Dicer ve ürünlerinin (miRNA'lar ve siRNA'lar) dişi üreme sistemi ve dişi fertilitesinde bazı posttranskripsiyonel genlerin düzenlenmesinde rolleri olduğu gösterilmiştir (Carletti ve Christenson 2009). Oosit ya da fertilize yumurtalar diğer hücre ya da dokuların 10-15 misli fazla seviyede Dicer transkriptler içerir (Su ve diğ. 2002) ve birkaç memeli hücre ya da dokusunda Dicer ekspresyonunun düzenlenişi belirlenmiştir (Nicholson ve Nicholson 2012). Dicer transkriptinin ekspresyonu, folikülogenezis süresince fare oositi büyürken ve germinal vezikül, metafaz II basamakları boyunca da (Cui ve diğ. 2007, Murchison ve diğ. 2007) sabit kalır (Watanabe ve diğ. 2008). Fertilizasyondan sonra, Dicer mRNA seviyesi yaklaşık yarısına düşer ve 2-hücreli embriyodan blastosist basamağına kadar düşük seviyede kalır (Cui ve diğ. 2007, Murchison ve diğ. 2007). Total miRNA ekspresyonu aynı periyod boyunca 2- hücreli basamakta yarısına düşmeden önce, olgun oosit ve tek hücreli embriyoda en yüksek haldedir (Tang ve diğ. 2007). Farelerde, Dicer'in etkisi ortadan kaldırılması implantasyon

sonrası embriyonik ölümle sonuçlanmıştır (Bernstein ve diğ. 2003). Site-specific recombinase teknolojisi kullanılarak Dicer'in koşullu etkisizleştirilmesi (cK0) sağlandığında ve overyan ağırlıkta ve ovulasyon oranında azalma gösterilmiştir (Hong ve diğ. 2008). Dicer1 cK0 farelerin, overyan fonksiyonlarında multiple defekt sebebiyle infertil oldukları, anormal östrus siklusları, kısa östrus ve daha uzun meteöstrus, paratubal kist ve üst düzey ovulasyon sorunları gösterilmiştir (Nagaraja ve diğ. 2008).

Kemirici oositlerinde overyan spesifik Dicer KOs (knockout) kullanılarak yapılan çalışmalarla; erken folikülogenez ve oosit gelişimine etkisinin olmadığı gösterilmiştir. KO oositler incelendiğinde çiftleşmeden sonra polar cisimciğin atılma kabiliyetinin bozulduğunu göstermiştir. İmmün boyamalarda, çoklu içcik ve kromatin kondensasyon defektleri gösterilmiştir (Murchison ve diğ. 2007, Tang ve diğ. 2007, Mattiske ve diğ. 2009). Bu veriler; mayotik defektlerin germinal vezikülde değilde oositte ooplazmada ortaya çıktığını düşündürmektedir. Dicer ekspresyonunun azaldığını gösteren deneyler; Dicer'in preovulator foliküllerin sayısını etkileyerek gelişimlerini tamamlayıp ovule olabilecek seviyeye gelebilme yeteneklerine etki ederek ovulasyon oranı üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (Imbar ve Eisenberg 2014).

1.2.7.11. Kümüllüs hücrelerinde Dicer'in rolü

Ovaryumdaki diğer somatik dokularda (teka hücreleri, intersitisyum, KL) Dicer ekspresyonu direkt incelenemez. Granüloza hücrelerindeki Dicer seviyesi LH artışından önce ve sonra incelendiğinde değişiklik göstermez (Fiedler ve diğ. 2008). Fonksiyonel delesyon çalışmaları miRNA'nın overyan fonksiyon ve dişi fertilitesinde önemli rolünün olduğuna işaret etmektedir (Otsuka ve diğ. 2008, Hong ve diğ. 2008, Nagaraja ve diğ. 2008, Gonzales ve Behringer 2009, Pastorelli ve diğ. 2009). Yapılan çalışmalar; gelişimin fizyolojik süreci ve overyan KL fonksiyonunun; Dicer1 fonksiyonuna ve özellikle miRNA aracılığıyla düzenlenme mekanizmasına gerek duyduğunu göstermiştir. Granüloza hücrelerinde Dicer ekspresyonunun azalması, wild-type farelere kıyasla, hCG ile stimule edilen ovulasyon oranını düşürürken, atretik folikül ve luteinize folikül içinde kalan oosit sayısında azaldığı gözlenmiştir (Hong ve diğ. 2008, Nagaraja ve diğ. 2008).

1.2.7.12. MikroRNA ve overyan disfonksiyon

Bilinen normal fizyolojik rollerinden başka, miRNA'nın çeşitli hastalıkların oluşumunda rol oynaması şaşırtıcı değildir. MikroRNA'ların kansere (Ma ve diğ. 2007, Lu ve diğ. 2005), kalp hastalıklarına (vam Rooij ve diğ. 2007, Ono ve diğ. 2011), bulaşıcı

hastalıklara (Pfeffer ve diğ. 2005, Singh ve diğ. 2013) neden olan rolleri gösterilmiştir. Polikistik over sendromu (PCOS) üreme çağındaki kadınlarda en sık rastlanan endokrin-metabolik bir hastalıktır (Norman ve diğ. 2007). PCOS; anormal düzeyde steroidogenez sonucunda oluşur ve özellikle ovaryumdaki aşırı androjen sekresyonu sebep olur (Gilling-Smith ve diğ. 1994). Granüloza hücrelerindeki miRNA ekspresyonu; folikülogenez ve overyan steroidogenezini içeren özel genlerin ekspresyonunu direkt olarak düzenleyebilir. MikroRNA'nın ana overyan steroidlerden P ve E2'nin salınımının kontrolüne katılması önemlidir. Birçok biyolojik mekanizma miRNA tarafından düzenlenir fakat PCOS'da miRNA'nın rolüyle ilgili pek az araştırma bulunmaktadır (Sang ve diğ. 2013, Roth ve diğ. 2014). Son olarak yapılan iki çalışmada, PCOS hastalarından elde edilen foliküler sıvının süpernatantında ve mikroveziküllerde ilk kez miRNA'lar tespit edilmiştir (Sang ve diğ. 2013, Roth ve diğ. 2014). Her iki çalışmada da, PCOS hasta grubundaki kadınlar kontrol grubuna kıyasla farklı miRNA'lar eksprese etmişlerdir (Sang ve diğ. 2013, Roth ve diğ. 2014). İlk grupta 7 altkümedeki miRNA'lar (miR-132, -320, -24, 520c, -3p, -193b, -483, -5p, ve -222) PCOS hastalarının folikül sıvısında araştırılmış (Sang ve diğ. 2013). miR-132, ve -320 ekspresyonu dikkat çekici bir biçimde PCOS hasta grubunda yüksek bulunmuştur. miR-132, -320, 520c, -3p ve -222; E2 konsantrasyonunu ve 193b, -483, 24 ise P konsantrasyonunu düzenler. MikroRNA'nın E2 ve P ekspresyonu ve KL sekresyonunu düzenleme mekanizması hala bilinmemektedir. İkinci grupta, 5 tip miRNA tespit edilmiş (hsa-miR-9, -18b, -32, -34c, ve -135a) ve kontrol grubuna kıyasla PCOS grubunda yüksek oranda eksprese edildikleri gösterilmiştir. PCOS grubu kadınlarda, 3 potansiyel miRNA hedef geninin ekspresyonunun dikkat çekici biçimde azaldığı görülmüştür; insülin reseptör substrat 2, sinaptogamin 1, ve interlökin 8. Farelerde insülin reseptör substrat 2 olmadığında; östrus sikluslarında düzensizlikler olduğu, anovulasyon, infertilite ve insülin direnci gösterdikleri kanıtlanmıştır. PCOS hastalarına benzer olarak; interlökin 8 sığır ve insan ovaryumlarının her ikisinde de geç foliküler ve ovulator foliküllerde steroid sentezinde görev alır (Schmidt ve diğ. 2014). Her üçünün de fonksiyonları PCOS fenotipiyle ilişkilidir; karbonhidrat metabolizması, beta-hücre fonksiyonu, hücre-hücre iletişimi ve steroid sentezi.

1.2.7.13. MikroRNA'nın pre-implante embriyo gelişimindeki etkisi

Pre-implante embriyolar dinamik olarak ve evrelerine özel şekilde miRNA sentezlerler (Tang ve diğ. 2007, Yang ve diğ. 2008, Viswanathan ve diğ. 2009). Zigotlara, miRNA ya da inhibitörlerinin enjeksiyonu; hedef genlerinin ekspresyonunu ve embriyo

gelişimlerini etkiler (Li ve diğ. 2012, Pang ve diğ. 2011). Bu veriler, miRNAların preimplante embriyo gelişiminde rol aldıklarını göstermektedir. Knockout farelerde yapılan çalışmalar farklı sonuçlar ortaya çıkartmıştır. Dgcr8 eksik olan fare oositleri normal olgunlukta olup, fenotipik olarak normal embriyolar oluşturmalarına rağmen (Suh ve diğ. 2010) gelişimlerinin embriyonik 6.5 güne gelmeden arrest kaldıkları görülmüştür (Wang ve diğ. 2007). Öte yandan, Dicer bulunmayan oositlerin içcik oluşumu organize olamaz ve bu da zigot ve bölünen embriyo oluşmasını engeller (Tang ve diğ. 2007). Dicer'ı olmayan zigotlar embriyonik 7.5 günde arrest kalırlar (Wang ve diğ. 2007). Dgcr8 özellikle doğal miRNA biyogenezinde gerekliyken, Dicer hem miRNA hem de endo-siRNA üretiminde gereklidir. Bu veriler, erken pre-implantasyon aşamasındaki embriyoların gelişiminde doğal miRNA'ların daha az rolünün olduğunu göstermektedir. Ago2 (Argonaute RISC catalytic component 2) bulunmadığında embriyoların gelişimlerinin 2-hücreli basamakta arrest kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca çalışmalar göstermektedir ki; farelerde oosit gelişimi süresince miRNA aktivitesi baskılanmaktadır (Ma ve diğ. 2010).

Yukarıda bahsedilen gözlemler preimplante embriyo gelişiminde doğal olmayan miRNA'ların rolünü göz ardı etmemektedir. Bu miRNA'lar Dgcr8'i olmayan oositler/embriyolarda korunurlar ancak preimplante embriyo gelişimindeki etkileri bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar, miRNA'ların geç preimplante embriyo gelişim basamağına ve/veya implantasyon basamağına doğru ilerlemeyi arttırdığını göstermiştir (Suh ve diğ. 2010, Ohnishi ve diğ. 2010). Buna ek olarak, seks farklılaşmasında rolü olan miRNA'lara dahil olan miR-518d-5p insan erkek blastosistlerinde dişi blastosistlerine oranla 5.6 kat daha fazla eksprese edilir (Rosenbluth ve diğ. 2013).

1.2.7.14. Blastosist aktivasyonunda MiRNAlar

Blastosist aktivasyonunun çalışılması için farelerde geciktirilmiş implantasyon önemli bir modeldir. Çünkü implantasyonu geciktirilmiş farelere tek östradiol enjeksiyonu yapıldıktan sonra, uyku durumunda ki blastosist progesteron etkisinde ki uterusu aktive olabilir (Paria ve diğ. 1993). Uyku durumunda ki ve aktive olmuş blastosistlerde ki miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında 238 miRNA'dan 45 tanesinin farklı eksprese edildiği görülmüştür. Bu miRNA'lar arasından 9'nun 5'i let-7 (lethal-7) ailesi üyesidir ve aktivasyonun ardından down-regüle olurlar. *In vitro* ve *in vivo* deneyler göstermiştir ki; let-7a, integrin-β3 üzerinden direk aktive olarak aktive olmuş blastosistin implantasyon potansiyelini yönetir (Liu ve diğ. 2012). Östradiol-indüklenen aktivasyonda

let-7a ekspresyonu down-regüle olur ve uyku halindeki blastosisteki Dicer, let-7 hedefi up regüle olur (Cheong ve diğ. 2014).

1.2.7.15. Endometriyumdaki miRNA'lar

Endometriyumun implante embriyolara duyarlılığı genellikle; alıcılık öncesi, alıcı ve inatçı (dayanıklı) fazlar olarak üç kategoriye ayrılabilir (Dey ve diğ. 2004). Kemirgenlerin ve insanların (Chakrabarty ve diğ. 2007, Li ve diğ. 2010). hem alıcılık öncesi ve alıcı endometriyumları arasında hem de uyku ve implantasyonu ertelenmiş fare modellerindeki uterus arasında miRNA'ların farklı ekspresyonları bulunmuştur (Su ve diğ. 2010). İki çalışma gebe uterusundaki miRNA profillerini implantasyon ve implantasyon alanları arasında karşılaştırmıştır (Geng ve diğ. 2014, Hu ve diğ. 2008). Bu çalışmalarda, üç miRNA ailesinin; let-7, miR-30 ve miR-200 ve miR-17-92'nin farklı ekspresyonları gözlenmiştir. miRNA'ların çeşitli hayvan modellerinin endometriyumdaki farklı alıcılıklara sahip olan farklı ekspresyonları, implantasyona dahil olmalarının bir göstergesidir (Weimin ve diğ. 2016).

1.2.7.16. Korpus luteumdaki miRNA'lar

Bugüne kadar, KL'daki miRNA'lar üzerinde birkaç fonksiyonel çalışma yapılmıştır, ancak KL'deki miRNA ekspresyonu hakkında profil oluşturma çalışmalarından daha fazla şey bilinmektedir. Koyun KL'sinde en çok eksprese edilen miRNA'lar; Let-7a, Let-7b, miR-16b, miR-21 ve mir-125b'dir (McBride ve diğ. 2012). Let-7 ailesi ve miR-21, aynı zamanda sığır KL'sinde miR-140, miR-199a-3p ve miR-320 ile birlikte en fazla eksprese edilen miRNA'lar arasındadır (Maalouf ve diğ. 2014). Koyunlarda foliküler luteal geçiş sırasında sekiz miRNA'nın arttığı ve dokuz miRNA'nın azaldığı gösterilmiştir (McBride ve diğ. 2012). Yukarıda belirtilen miRNA'lardan biri, olgun KL'da bol miktarda eksprese edilen miR-21'dir (Maalouf ve diğ. 2014). Östrusun 4. günü ile karşılaştırıldığında 10. günde toplanan korpus luteumlarda daha yüksek miktarlarda miR-21 bulunmuştur. (Maalouf ve diğ.). Bu verilere dayanarak miR-21'in luteinizasyon ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Murin granüloza hücrelerinde miR-21 ekspresyonu, granüloza hücre apoptozisini inhibe eder (Fiedler ve diğ. 2008, Carletti ve diğ. 2010), bu durum hayatta kalma rolünü gösterirken, geç KL ve korpus albicanslarındaki ekspresyonu apoptoz ve regresyonda rol aldığını işaret eder (McBride ve diğ. 2012). Çünkü miRNA fonksiyonu zaman, doku ve türlere özgü olabilir. miR-21'in gerileyen KL'deki rolünün, murin granüloza hücrelerindeki rolünün aksine olup olmadığını belirlemesi ilgi çekici bir durumdur (Montazerian ve diğ. 2018).

1.2.7.17. Folikül sıvısındaki ekstraselüler miRNA'lar

Oosit gelişimi için bir mikroçevre olan foliküler sıvı, hem kan plazması bileşenlerinden hem de granüloza ve teka hücre salgılarından kaynaklanır ve oosit gelişimini etkiler (Fortune 1994). Her ne kadar foliküler sıvı, IVF döngülerinde oosit kalitesinin non-invazif tahminleri için bol miktarda ve kolayca bulunabilen materyaller sağlasa da, şimdiye kadar genel olarak onaylanmış hiçbir moleküler öngörücüsü yoktur (Revelli ve diğ. 2009). Son yıllarda, miRNA'ların folikül sıvısında tespit edilebildiği ve öngörülen bazı genlerin metabolik ve üreme sinyal yollarını hedef alarak fertilitate belirleyicisi olduğu gösterilmiştir (Sang ve diğ. 2013). Foliküler sıvıdaki ekstraselüler miRNA örnekleri, teka hücreleri, kümülüs hücreleri, granüloza hücreleri, over korteksi ve oositler gibi farklı overyan bileşenlerin fonksiyolarının değerlendirilmesinin yolunu açabilir (Santonocito ve diğ. 2014). Hücre dışı veziküllerin, granüloza ve kümülüs hücrelerinde bulunan kapsüllenmiş miRNA'larla aynı olduğu gösterilmiştir (Montazerian ve diğ. 2018). Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, bu veziküllerin hücreler arası iletişimde rolleri olduğu öne sürülen granüloza hücreleri tarafından alınabileceğini ortaya koymuştur (Silveira ve diğ. 2012). Güçlü kanıtlar, düşük over rezervi veya ileri anne yaşı olan kadınlarda, protein bileşimi gibi foliküler sıvı metabolitlerinin kontrol kadınlara kıyasla değiştiğini göstermektedir (Pacella ve diğ. 2012). Bu farklılıklar, çevreleyen hücrelerin gen ve protein seviyelerindeki moleküler özelliklerin farklı olması nedeniyle olabilir (McReynold ve diğ. 2012). İnsanda hsa-miR-21-5p, hsa-miR-134, hsa-miR-190b ve hsa-miR-99b-3p içeren foliküler sıvıdaki dört miRNA'nın da genç ve yaşlı kadınlarda farklı olarak eksprese edildiği gösterilmiştir (Diez-Fraile ve diğ. 2014). Bulgular, ileri anne yaşının foliküler sıvı mikroçevresinin oosit kalitesini değerlendirmek için potansiyel biyobelirteçler olarak foliküler sıvıdaki hücre dışı miRNA'ların kullanılabilceğini doğrulamaktadır. *In vitro* fertilizasyon (IVF) prosedürü oldukça popüler olmakla birlikte, yardımcı üreme teknikleri kullanılarak elde edilen gebelik oranları arzu edilenden daha azdır (Sullivan ve diğ. 2013). Bu nedenle, büyük problemlerden birisi olan oosit ve embriyo kalitesinin doğru şekilde tahmin edilmesi, yardımcı üreme teknikleri sonuçlarını iyileştirmek için oldukça gereklidir. Hem sığır foliküler sıvısı hem de kan plazmasındaki kontrollü over hiperstimülasyonu (KOH) ile değişen miRNA profilinin, dolaşımdaki miRNA'lar ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Montazerian ve diğ. 2018). Bu sonuçlar, sığır foliküler sıvısındaki foliküler sıvı miRNA'larının, over fonksiyonu ile ilişkili genlerin düzenlenmesinde ve çeşitli fizyolojik yollarda yer alan genlerin düzenlenmesinde potansiyel bir role sahip olduğunu göstermektedir (Nofaresti ve diğ. 2015).

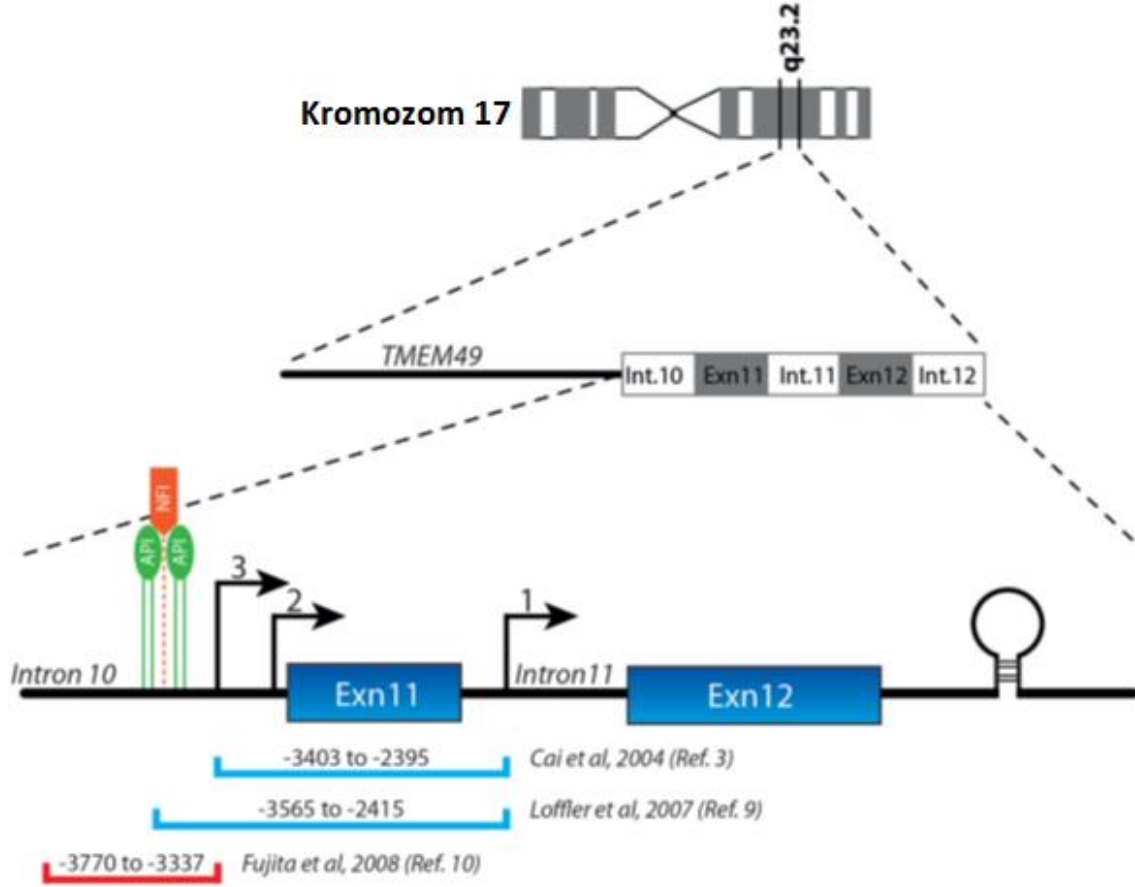
1.2.8. MikroRNA 21 (miR21)

miR21'in, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar da dahil olmak üzere birçok patolojik durumda yükseliş gösterdiği bulunmuştur (Jazbutyte ve Thum 2010). miR21'in upregüle olması için gerekli olan non-transkripsiyonel mekanizma, promotor hiperaktivasyonundan ziyade gen amplifikasyonunu işaret eder (Haverty ve diğ. 2008). Bununla birlikte, mevcut verilerin çoğu, miR21 ekspresyonunun transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenleme ile sürdürüldüğünü göstermektedir (Cai ve diğ. 2004, Davis ve diğ. 2008). Pri-Mir-21'in potansiyel promotor bölgeleri iyi çalışılmıştır. Pri-miR-21'in gerçek boyutu, transkripsiyonel başlangıç bölgesi (TSS) ve pri-miR-21'in minimum promotor bölgesi hala tartışma konusudur (Ribas ve Lupold 2010).

Çeşitli biyolojik işlemlerde sık yer alması nedeniyle, miR21'e olan ilgi son yıllarda özellikle kanser ve kardiyovasküler hastalıklarda çarpıcı bir şekilde artmıştır. MiR21'in kanser ve kardiyovasküler hastalıklarda önemini vurgulayan çok sayıda derleme mevcuttur (Jazbutyte ve Thum 2010, Ribas ve Lupold 2010, Selcuklu ve diğ. 2009).

1.2.8.1. miR21 ekspresyonunun düzenlenmesi

Cullen ve diğ. (2004) ilk kez miR21 düzenleyici bölgeyi, pri-miR-21'in yukarıdaki -3,403 ila -2,395 arasında bir haritalama yaparak tanımladı (Cai ve diğ. 2004). Üç yıl sonra Loffler ve diğ. (2007) çok benzer bir şekilde, IL6 / Stat3 ile indüklenebilen -3,565 ila -2,415 arasındaki bölge haritalamasını tarif etmişlerdir (Loffler ve diğ. 2007). Daha sıkı kriterler kullanan daha sonraki bir çalışmada, Fujita ve (2008); miR21 firketesinin yukarı yönünde -3,770 ila -3,337 bölgelerinde haritalanan aktivasyon proteini 1(AP-1), Ets/PU.1, C/EBP α , NFI, SRF, p53 ve STAT3'ü içeren bağlanma bölgeleri olan, çeşitli artırıcı elementleri de içeren yeni bir promotor tanımladı. İlginç bir şekilde, Fujita ve diğ. (2008) tarifi, 2004'te ilk tarif edilen (Cai ve diğ. 2004) promotorla minimal örtüşmeye sahiptir ve bu nedenle, bu iki promotor bölgenin birbirlerinden bağımsız işlev gördükleri düşünülebilir (Bak. Çizim 1.15).



Çizim 1.15. pri-miR-21'in genomik lokasyonu (Kumarswamy ve diğ. 2011).

Ozsolak ve diğ. (2008) miR21'in farklı promotor bölgelerinin transkripsiyonel aktivitelerini karşılaştırmışlar ve Fujita ve diğ. (2008)'nin tarif ettikleri promotor bölgenin diğerleriyle kıyaslandığında daha güçlü olduğunu ve ilk tanımlanan promotorun (Cai ve diğ. 2004) özel hücre hattıyla uyarılabildiğini bulmuşlardır (Ozsolak ve diğ. 2008). Daha yakın zamanda, Mudduluru ve diğ. (2011) miR-21 geninde bir başka düzenleyici bölge ve iki transkripsiyonel başlangıç bölgesi tanımladılar (Mudduluru ve diğ. 2011). miR21 transkripsiyonunun pozitif regülatörlerine ek olarak, birkaç transkripsiyon baskılayıcısı da tanımlanmıştır. Örneğin, miR21 transkripsiyonu; NFI, C/ EBP α tarafından baskılanmıştır (Fujita ve diğ. 2008). Bu faktörlerin, forbol miristik asit (PMA) ile muameleden sonra promotor bölgesinden ayrılması, promotor aktivitesinin artmasına neden olur. Ek olarak, Gfi1 (Velu ve diğ. 2009) ve östrojen reseptörünün (Wickramasinghe ve diğ. 2009), miR21 promotor aktivitesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir. Standart terminolojiye göre, daha az miktarda bulunan miRNA bir yıldız (*) işaretiyle belirtilmiştir. Bu asimetri, Dicer işleminin ardından karşıt sarmalın asimetrik bozulmasının sonucudur. Daha az kararlı uç olan 5'nün bozulmamış kalması için daha iyi bir şansa sahiptir (Khvorova ve diğ. 2003,

Schwarz ve diğ. 2003). MiR21 için en yakın komşu yöntemiyle 5'-uç firkete stabilitesinin analizi, miR21'in 5'-ucunun miR-21*' den biraz daha az stabil olduğunu ortaya koymuştur (Coutinho ve diğ. 2007). Ancak, 72-nt-long pre- miR-21 stemloop'un Dicer aracılı bölünmesinin, 22 nt miRNA-miRNA dupleksine bölünmesinden sonra, miR-21* bozulur ve miR-21 olgun bir miRNA olur.

Transkripsiyonel düzenlemeye ek olarak, miR-21 ekspresyonu post-transkripsiyon seviyede de düzenlenir. Davis ve diğ. TGF β ve BMP4'ün (TGF β süper ailesinin bir üyesi), pre-miR-21 ekspresyonunu upregüle ettiğini, işlemde 30 dakika sonra 4 kat arttırdığını gösterirken, pri-miR-21 ifadesi değişmez. Ayrıca, miR21 regülasyonunun, RNA polimeraz II'nin a-amanitin ve bir lusiferaz tarafından inhibe edilmesinden etkilenmediğini gösterdiler. Daha sonraki deneylerde, yüksek miR21 seviyelerinin, pri-miR-21'in Smad proteinlerinin aracılık ettiği Drosha işlemindeki artıştan kaynaklandığını gösterdiler. İlginçtir ki, aynı zamanda TGF β süper ailesinin bir üyesi olan BMP6'nın miR21 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Meme kanseri dokularında BMP6 ve miR21 arasında ters bir korelasyon gözlenmiştir (Du ve diğ. 2009). Lüsiferaz raportör analizlerinde, BMP6'nın E2-box ve AP1 bağlama bölgeleri yoluyla miR21 promotör aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. BMPR1a sinyali astrositlerde miR21 ekspresyonunu negatif olarak düzenlenmiştir, çünkü miR-21 seviyelerindeki azalmaya pri-miR21 seviyelerindeki değişiklikler eşlik etmiştir (Sanhi ve diğ. 2010). Bu çalışmaların sonuçları BMP'lerin miR21'i karmaşık mekanizmalar yoluyla hem pozitif hem de negatif olarak düzenlediğini göstermektedir.

1.2.8.2. miR-21'in gelişimdeki rolü

Döllenmeden sonra, embriyolar, transkripsiyon ihtiyaçları için kendi transkripsiyon mekanizmaları işlevsel olana kadar maternal olarak türetilmiş mRNA'lara ihtiyaç duyar. Embriyonik genom aktivasyonu başlatıldığında, maternal mRNA bozulur ve erken gelişim evrelerinde ifade edilen miRNA'ların bu bozulmada önemli bir rol oynadığı düşünülür (Schier 2007). Zebra balığı gibi omurgalı gelişim modellerini kullanan çalışmalarda, miR-21 ekspresyonu, gelişimin çok erken aşamalarında tespit edildi. Chen ve diğ. (Chen ve diğ. 2005) miR-21'in erken gelişim evrelerinde (12 saat) tespit edilebildiğini ve zebra balığı embriyosunun gelişmesinde doku orijininin bağımsız olarak, tüm miRNA'ların% 40'ına kadar fibroblastlarda oluştuğunu göstermiştir. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (Ramanchandra ve diğ. 2008) içeren başka bir çalışmada, miR-21'i düzenleyen transkripsiyon faktörlerinden biri olan miR-21 (Loffler ve diğ. 2007) ve Stat3'ün

ekspresyon seviyelerinin embriyonik gen aktivasyonu sırasında önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. MiR-21'in, henüz tanımlanamayan bir mekanizma tarafından anne tarafından kalıtılan miRNA'ların parçalanmasında önemli bir rol oynadığını öne sürmüşlerdir.

Nöronal baskılayıcı REST (RE1 sessiz transkripsiyon faktörü), fare embriyonik kök (ES) hücrelerinde yüksek seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (Ballas ve diğ. 2005). MiRNA ekspresyonu, Rest'in, Oct4, Nanog ve Sox2 gibi kritik kendini yenileme düzenleyicilerinin ifadesine müdahale eden miR-21'i içeren bu miRNA'ları bastırıldığını ortaya koydu. Daha sonraki analizlerde, miR-21'in pre-miR-21 tarafından aşırı ekspresyonunun, fare ES hücrelerinin kendi kendini yenileme kapasitesini %60 oranında belirgin bir şekilde azalttığı bulunmuştur. Kendi kendini yenileyici belirteçler olan Oct4, Nanog, Sox2 ve c-myc'nin ekspresyon seviyelerinin önceden miR-21 ile tedavi edilen hücrelerde azaldığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, Rest tarafından bastırılan miR-21'in, en azından kısmen fare ES hücrelerinin yenilenmesini düzenlediğini göstermiştir (Regalla ve diğ. 2011).

1.2.9. MikroRNA 27 (miR-27)

MikroRNA-27; miR-27a ve miR-27b'den oluşan, tümör gelişiminde hayati rol oynayan bir miRNA ailesidir. Farklı kromozomlardan kopyalanırlar ve 3' ucundaki nükleotitleri farklıdır. Giderek artan çalışmalar doğrultusunda, miR-27a'nın polimorfizmler, proliferasyon, apoptoz, göç ve anjiyogenez dahil tümör biyolojisinde hayati bir rol oynadığını doğrulanmıştır. Son çalışmalarda, miR-27a'nın karaciğer kanseri ve prostat kanseri gibi çeşitli kanserlerde önemli ölçüde düzenlenmesinin bozulduğu ve bir onkogen olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, mide kanseri, mesane kanseri, özofagus skuamöz hücrelerinde tümör baskılayıcı olarakta işlev görebildiği bilinmektedir (Xingwang ve diğ. 2019).

“miR-27a, POI olan kadınların plazmasında anlamlı şekilde up regüle olur ve buda miR-27a'nın POI gelişimindeki düzenleyici rolünü gösterir (Yang ve diğ. 2012, Dang ve diğ. 2015). miR-23a-27a-24-2 kümesinin; hücre döngüsü, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, hematopoez ve kardiyak hipertrofi gibi normal ve patolojik süreçlerde kritik rol oynadığı bilinmektedir (Chhanra ve diğ. 2010, Huang ve diğ. 2008). Hem miR-23a hem de miR-27a, (FasL)-Fas yolu ile doğrudan Fas ligandı in vitro olarak aktive eder ve SMAD5'i hedefleyerek granüloza hücrelerinin apoptozisine aracılık eder (Nie ve diğ. 2015). Bu

bilgilere ek olarak Kim ve diğ. (2013) miR-27a mimik dizisinin granüloza hücrelerine transfekte edilmesinin fare folikülerinde oosit olgunlaşma oranını azalttığı göstermişlerdir (Kim ve diğ. 2013). Granüloza hücreleri tarafından üretilen insülin büyüme faktörü bağlayıcı protein 2 (IGFBP-2), foliküler gelişim sırasında intra foliküler over insülin büyüme faktörünün (IGF) biyoyararlanımını düzenler (Armstrong ve diğ. 2001). IGFBP-2 ekspresyonundaki değişim miRNA-27a transfeksiyonunun bir sonucudur ancak, bu yolağın nasıl düzenlendiği henüz bilinmemektedir. Önceki çalışmalar, IGFBP-2 ekspresyonunun, gonadotropinle uyarılan sıçan granüloza hücrelerinde (Spicer 2004). arttığını, dolayısıyla aday hedef olarak IGF'nin bağlanmamış fraksiyonunun olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, miR-23a ve miR-27a folikülogenez için kritiktir. Granüloza hücrelerinin apoptozuna ve oosit olgunlaşmasına aracılık etmek, foliküler gelişim sırasında büyüme faktörlerini düzenlemek gibi görevleriyle POI gelişiminde rol oynarlar (Ying ve diğ. 2017)”.
X

1.2.10. MikroRNA 144 (miR-144)

MiR-144, birçok hastalık ile ilişkili olduğu ve metastaz üzerinde etkisi olduğu tespit edilen önemli bir mirRNA'dır (Keller ve diğ. 2014). Örneğin, MiR-144, hepatosellüler karsinomada (HCC) bir tümör baskılayıcı olarak tanınmış ve ZFX'i (Zinc finger X-kromozomal protein geni) hedef alarak HCC hücre proliferasyonunu, istilasını ve göçünü önleyebilir (Bao ve diğ. 2017). Son yapılan çalışmalar, miR-144'ün aşırı ekspresyonunun epitelial mezenkimal geçişi baskılayabileceğini göstermiştir (Pan ve diğ. 2015). Sun ve diğ. miR-144'ün papiller tiroid kanserinde (PTC) tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü ortaya koymuştur (Sun ve diğ. 2017). Bununla birlikte, meme kanserinde miR-144'ün ayrıntılı moleküler mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (Yuanqin ve diğ. 2018).

Önceki çalışmalar, miRNA'ların POF hastaları ve normal bireylerin plazmasında farklı şekilde eksprese edildiğini ve POF'un patogeneğinde, erken tanı ve terapötik etkinliğinin değerlendirilmesinde önemli rol oynadıklarını göstermiştir (Guo ve diğ. 2017). MiRNA'lar arasında, miRNA-144'ün POF hastalarının plazmasında down regüle olduğu bilinmektedir (Yang ve diğ. 2012, Yujie 2015). MikroRNA'ların, POF'un altında yatan mekanizmasındaki rolü açıklığa kavuşturulmaya devam etse de, miRNA-144-5p'nin POF hayvan modellerinin dokularında, normal over dokularındakine kıyasla down regüle olduğu bilinmektedir (Yang ve diğ. 2019).

1.2.11. MikroRNA 146 (miR-146)

MikroRNA polimorfizmleri, hücrel fonksiyonların miRNA-aracılı düzenlenmesine, miRNA hedef genine ve miRNA sentezine potansiyel olarak müdahale edebilen polimorfizmler olarak tanımlanabilir (Mishra ve Humeniuk 2013). MiR-146a, kromozom 5 (5q34) üzerinde bulunur ve immün cevabın ve inflamasyonun kuvvetle düzenlenmesi için bilinen iyi korunmuş miRNA'lardan biridir (Nelson ve diğ. 2008). miR-146a'nın; kanser, diyabet ve bazı otoimmün hastalıklar gibi çeşitli hastalıklara etkisi olan ana değişkenlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, mevcut bulgularda etnik farklılıkların etkileri ile ilişkili olabilecek çalışmalar vardır. G/C polimorfizmi (rs2910164), pre-miR-146a sekansı içinde yer almaktadır ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, birkaç kanser, hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve over disfonksiyonları gibi çeşitli bozukluklarla ilişkisi araştırılmıştır (Cho ve diğ. 2016, Imbar ve Eisenberg 2014).

POI'li kadınlarda yapılan bir çalışmada, miR-146aC alelinin miR-196a2C aleli ile ve miR-146aG alelinin miR-196a2T aleli ile birleştiğinde POF riskinin azaldığını gösterilmiştir (Rah ve diğ. 2013). Bununla birlikte, miR-146aC aleli ile miR-196a2T aleli kombinasyonu ve miR-146aG aleli ile miR-196a2C aleli kombinasyonunun POF riskini arttırdığı gösterilmiştir (Rah ve diğ. 2013). MiR-146a ekspresyonunun, POI'li idiyopatik hastalardan elde edilen plazma ve granüloza hücrelerinde up regüle düzenlendiği bulunmuştur (Yang ve diğ. 2012, Chen ve diğ. 2015) MiR-146a, sıgır oositlerinde oosit olgunlaşması sürecinde ve preimplante embriyo gelişimi sırasında eksprese edilir ve miR-146a'nın varsayılan hedef genlerinden biri, kaspaz8 yolu ile folikülogenez sırasında oosit apoptozunu düzenleyen Fas'tır (de los Santos ve diğ. 2000, Suzuki ve diğ. 2010). Ek olarak, miR-146a folikülogenez ve atrezinin tümör nekroz faktörü (TNF) 'ye bağlı olarak düzenlenmesinde de rol oynar (Hussein 2005). Ayrıca, miR-146a granüloza hücrelerinde interlökin-1 reseptör ile ilişkili kinaz (IRAK1) ve tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) ile apoptozu indükler (Hussein 2005). Granüloza hücrelerinin apoptozisi POI'de çok önemlidir. Apoptozda miRNA'ların düzenleyici mekanizmalarının anlaşılması, POI'nin patogenezini göstermenin önünü açmaktadır. MiR-196a, embriyogenez sırasında yenidoğan over homeobox geninin (NOBOX) ekspresyonunu inhibe eder (Tripurani ve diğ. 2011). NOBOX genindeki mutasyonlar POF ile ilişkilendirilmiştir (Qin ve diğ. 2007), miR-196a'nın NOBOX'ı düzenleyerek POF riskini artırabileceğini düşünülmektedir. Bununla birlikte, NOBOX'in overde miR-196a tarafından düzenlenip düzenlenmediği henüz bilinmemektedir. Hedef genler muhtemelen miR-146a ve miR-196a'dan etkilenir;

daha sonra, anormal bir folikülogenez meydana gelir. Ancak, gelecek çalışmalar altta yatan mekanizmaları daha iyi açıklayacaktır (Ying ve diğ. 2017).

1.2.12. MikroRNA 190 (miR-190)

miR-190, 15q22.2 kromozomu üzerinde talin2 (TLN2) geninin intron bölgesinde bulunur. Yapılan araştırmalar, miR-190 ekspresyonunun agresif nöroblastomlarda azaldığını ve aşırı ekspresyonunun, tümör büyümesini baskıladığı ve hızlı büyüyen tümörlerde uyku hali süresinin uzamasına yol açtığını göstermiştir (Almog ve diğ. 2013). miR-190, hepatoselüler karsinoma hücrelerinin göç, invazyon ve anjiyogenez yeteneklerini epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) fenotipinin inhibisyonu ile baskılar (Hao ve diğ. 2014). Aksine, mide kanseri dokularında miR-190 ekspresyonu yükselir ve mide kanserinin ilerlemesine katkıda bulunur (Jia ve diğ. 2016), bu durum miR-190'ın, tümör gelişiminin farklı aşamalarında ve farklı tümör ortamlarında farklı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Yue ve diğ. 2019).

Bütün bunlarla birlikte, yüksek miR-190'ın PHLPP down regülasyonundan sorumlu olduğunu ve bunun sonucunda uzun süreli veya güçlü Akt aktivasyonuna neden olduğunu belirtti (Beezhold ve diğ. 2011). PI3K/Akt sinyali, primordiyal folikül aktivasyonuna (Scharer ve diğ. 2009) etki edebilir ve primordiyal folikül yenilenemezse, tükenen primordiyal folikül havuzu erken menopoza yol açar (Arnold ve diğ. 2005). Yapılan bazı araştırmalarda MiR-190'ın, POF dokularında yüksek oranda eksprese edildiği ve miR-190 ile CCL2'nin ekspresyonu arasında ki ters ilişkinin over adenokarsinomunda rol oynadığı gösterilmiştir (Arnold ve diğ. 2005, Kuang ve diğ. 2014). Bütün bu veriler birlikte ele alındığında, overde hormon uyarımındaki işlev bozukluğu ile ilişkili olan miR-27b ve miR-190'ın anormal ekspresyonunun POF başlangıcına katkıda bulunabileceğini belirtmek mümkündür (Kuang ve diğ. 2014).

2. AMAÇ

Bu çalışmanın amacı; azalmış over rezervi bulunan erkek dışı faktöre bağlı infertil kadınların overyan folikül sıvılarında miRNA değişkenliklerini göstererek ekspresyonu gözlenen miRNA'ların kadın infertilitesinde noninvaziv belirteç olarak kullanılmasının önünü açmaktır.

Ovaryumda; folikül gelişimi ve seçilimi, atrezi, ovulasyon ve luteolizis endokrin ve parakrin faktörlerle yakından ilişkili, ekspresyonu ve ilişkileri sıkıca düzenlenmiş oldukça fazla gen tarafından kontrol edilir. Ovaryumdaki genlerin düzenlenmesinde major gen düzenleyici sınıflardan biri olarak bu miRNA moleküllerinin de dahil edilmeleri önerilmiştir. Çalışmalar farklı türlerin ovaryumunda overyan fonksiyonlarda önemli olabilecekleri düşünülen çeşitli miRNA'ların ekspresyonunu göstermiştir. Türler dikkate alınmadan; let-7 ailesi, miR-21, miR-99a, miR-125b, miR-126, miR-143, miR-145 ve miR-199b birçok türün ovaryumunda ortak bulunan miRNA popülasyonlarıdır.

Biyoinformatik taramalar ve gen ontoloji analizleri; ağırlıklı olarak memeli ovaryumlarında hedef genleri eksprese edilen miRNA'ları çeşitli biyolojik süreç ve yollarda ya da moleküler bağlantılarda tespit etmiştir. Hücre siklusunun düzenlenmesi, hücre ölümü, hücreden hücreye sinyal iletimi, hücresel büyüme, gelişim ve çoğalma, endokrin sistem hastalıkları ve overyan fonksiyonların altında yatan çeşitli yollarda da miRNA'lar tespit edilmiştir.

MikroRNA'ların kansere, kalp hastalıklarına ve bulaşıcı hastalıklara neden olan rolleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Granüloza hücrelerindeki miRNA ekspresyonu; folikülogenez ve overyan steroidogenezi içeren özel genlerin ekspresyonunu direkt olarak düzenleyebilir. miRNA'nın ana overyan steroidlerden progesteron ve östradiolün salınımının kontrolüne katılması kritik noktadır. Birçok biyolojik mekanizma miRNA tarafından düzenlenir fakat infertilite nedenlerinden birisi olan azalmış over rezervinde miRNA'nın rolüyle ilgili araştırma bulunmamaktadır. Üreme metabolizması ile miRNA arasındaki ilişkinin kurulması ve hangi miRNA tiplerinin bu süreçte rol oynadığının gösterilmesi bu tarz üreme hastalıklarının tedavisinde miRNA'ların yardımcı belirteç olarak kullanılabilmelerini sağlayacaktır.

miRNA moleküllerinin vücut sıvılarında sabit olarak tespit edilmesi bunların makul birer klinik tanı belirteci olarak kullanılmasının yolunu açar. miRNA'nın eşsiz özelliği,

klirik örneklerde büyük ölçüde bozulmamış şekilde kalması, üreme hastalıklarının moleküler fenotipini vurgulaması ve vücudun fizyopatolojik durumunu monitörize ederek değerlendirmesidir. MikroRNA'nın folikül sıvısında bulunması, minimal düzeyde invaziv belirteç olması açısından umut vaat edicidir. Böylece daha hassas ve özel testlere ulaşımı sağlayabilir.

Overyan-özel miRNA'ların serumda tespit edilmesi erken tanı ve prognozdan daha fazla verim elde edilmesini sağlayabilir ve tedavinin bireyselleştirilmesi açısından da iyi bir potansiyel oluşturur. Bu yeni yaklaşım, over rezervinin tespit edilmesini, overyan endokrin fonksiyonun belirlenmesini ve embriyo implantasyon sürecini değerlendiren gelecek klinik yönetim açısından çok önemli bir nitelik taşımaktadır. Özgün miRNA'ların tespit edilmesi dişi üreme dokusunda tanımlanması başarılı üremeye olanak sağlayacak olan gen regülasyonu mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlar.

miRNA ekspresyonuna geniş açıdan bakıldığında, steroidogenez, ovulasyon, korpus luteum gelişimi ve fonksiyonu gibi temel overyan özellikler üzerindeki etkileri yapılan çalışmalarla ortaya çıkartılmıştır. RNA'nın ovulasyondaki rolüyle ilgili yapılacak daha ileri çalışmalar, ovulasyon indüksiyonu ve üreme teknolojileri (ART) için potansiyel bir kullanıma yol açabilir.

Bu çalışma ile ulaşılmak istenen hedef; azalmış over rezervi ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz beş miRNA (hsa-mir-21, hsa-mir-190, mir-146, mir-27 ve mir-144)'nın AOR olan ve olmayan kontrol grubu kadın hastalardan alınan folikül sıvılarından izole ettikten sonra bu miRNA'ların AOR ile ne kadar ilişkili olduklarını saptamaktır. Dünyada çevresel faktörler, yaşam şartları ve bebek sahibi olmanın ertelenmesi ile ilişkili olarak yaşa bağlı ve yaştan bağımsız olarak ortaya çıkan azalmış over rezervi pek çok kadını etkilemektedir ve infertilite nedeni olarak ortaya çıkmaktadır. Bu konuyla ilgili elde edilen verilerin azalmış over rezervi bulunan hastalara gen terapisi veya benzeri yöntemlerle tedavinin önünü açabileceğini düşünüyoruz.

3. YÖNTEM

Bu çalışma için Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 14.07.2015 tarihli KOU KAEK 2015/216 kod numarası ile etik kurul onayı alınmıştır.

Tez çalışmamıza, 2016-2017 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezine başvuran, azalmış over rezervi bulunan 64 primer infertil kadın ve kontrol grubu olarak da normal over rezervine sahip 10 hasta dahil edilmiştir. Hastalar IVF tedavisine alınarak ICSI işlemine tabi tutulmuştur.

3.1 Situmulasyon Protokolü

Hastalara Antagonist protokol uygulandı. Gonadotropinlerle tedaviye E2 seviyesi <50 pg/ml olduğunda ve transvajinal muayenede ovaryan kist saptanmadığı durumlarda başlandı. Antagonist tedavide, gonadotropinlerin uygulanmasına siklusun 3. ya da 4. günü serum progesteron seviyesinin <1 ng/ml, endometriyum kalınlığının <5mm ince olduğu ve transvajinal ultrasonda ovaryan kist yokluğundan emin olduğu takdirde başlandı. Antagonist tedaviye gonadotropin uygulanmasından 5gün sonra başlandı. Azalmış over rezervi olan hastalara her gün 225-375 ünite (IU) gonadotropin tedavisi uygulandı.

Hastalar en az bir folikülü >18mm ulaştığında gerekli E2 yanıtı alınarak hCG (250 ug; Ovitrelle, Merck Serono) uygulamasına geçildi. hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra oositler toplandı.

Foliküler sıvı transvajinal ultrason eşliğinde aspirasyonla elde edildi ve oosit kümülüs kompleksi sıvı örnek içinde tespit edildi. Oositlerin folikül sıvısından toplanmasının hemen ardından foliküler sıvı görünür veya minimal kan kontaminasyonu olmaksızın aseptik olarak toplandı ve işleme tabi tutuldu. Foliküler sıvı örnekleri, foliküler hücre artıkları ve kandan arındırmak için 2800 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek, süpernatant hemen temiz polipropilen tüpü içine transfer edildi ve daha ileri analizler için -80°C'de saklandı. Yoğun kan kontaminasyonlu numuneler daha ileri analizlerde çalışma dışında bırakıldı.

3.2 Folikül Sıvısından miRNA İzolasyonu:

Elde edilmiş olan folikül sıvılarından miRNA izolasyonu için Roche High Pure miRNA Isolation Kit (ROCHE, Mannheim, Germany) kullanıldı. miRNA izolasyon detayları aşağıdaki gibidir:

Hazırlık aşamasında yıkama tamponuna 40 ml saf etanol eklenmiştir. Bağlayıcı tampon 4'e 1 oranında nükleaz içermeyen su ile seyreltilmiştir.

1. Pipetaj yaparak 150 µl folikül sıvısı alındı.
2. Üzerine 312 µl bağlayıcı tampon + 200 µl bağlayıcı gen arttırıcı eklendi.
3. Toplam volüm pipetaj yapılarak, 700 µl yüksek oranda saf filtreli tüpe eklendi. 13.000xg'de 60sn. santrifüj edildi.
4. Toplanan sıvı atılarak filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu eklendi.
5. 13.000g'de 30sn santrifüj edildi.
6. Toplanan sıvı atılarak 300 µl yıkama tamponu eklendi.
7. 13.000g'de 30sn santrifüj edildi.
8. Toplanan sıvı atılarak filtreli tüp boş 13.000g'de 1 dk santrifüj edildi.
9. Filtre 1,5 µl'lik tüpe aktarıldı.
10. Filtrenin üzerine 15 µl elution tampon eklendi.
11. 1 dk inkübe edildikten sonra 13.000g'de 1 dk santrifüj edildi.
12. Toplanan RNA filtreye tekrar aktarıldı, 1dk beklenildikten sonra 13.000g'de 1dk santrifüj edildi.

3.3. MikroRNA'ların Miktar ve Sıfık Analizleri

RNA'nın miktarı NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) cihazında RNA-40 opsiyonu kullanılarak yapıldı. Bu işlemde öncelikle cihazın pedalına 2uL nükleaz içermeyen su konulup ve cihaza ait yazılım programındaki "Blank" butonuna basılarak kör ölçümü yapıldı. Ardından pedal bir kağıt havlu ile temizlenerek pedal üzerine 2uL RNA pipetlenerek cihazın yazılım programında "Measure" butonuna basılarak RNA'nın kantitesi ölçüldü. Saf bir RNA için 260/280 oranının 2,0; 260/230 oranının ise 2,0-2,2 olmasına dikkat edildi.

3.4. cDNA Sentezi:

İzole edilen örneklerin nanodropta kantite değerlerine bakıldıktan sonra çalışmaya uygun olan miRNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi için Thermo Fisher Scientific Taqman MikroRNA Reverse Transcription Kit (AppliedBiosystems) (North America) kullanıldı. cDNA sentezi detayları aşağıdaki gibidir:

1. MikroRNA örnekleri 5 µl'sinde 2ng olacak şekilde dilüe edildi.

2. Reaksiyon başına 0,15 µl dNTP mix (100 Mm), 1µl Multi Scribe Reverse Transcriptase, 1,5 µl 10x RT Buffer, 0,19 µl RNase Inhibitor ve 4,16 µ nükleaz içermeyen su olacak şekilde master mix hazırlandı.
3. 7 µl hazırlanan master mix' ten 0,2 ml hacimli PCR tüplerine dağıtıldı.
4. 3 µl istenilen gen bölgesine ait primer dağıtıldı. Housekeeping gen için RT primerHsa-miR-16-5p, hedef genler için ise primerHsa-miR-21, primerHsa-miR-190, primerHsa-miR-146, primerHsa-miR-27 ve primerHsa-miR-144 kullanıldı. Primerler Applied Biosystems Taqman MikroRNA Assays (USA) Kit'inden temin edildi.
5. 5µl'sinde 2 ng olacak şekilde dilüe edilen miRNAdilüsyon örneklerinden 5µl' şer tüplere dağıtıldı.
6. Total volüm 15 µl olan örnekler Termal Cyclers'da inkübe edildi. Termal Cycluser protokolü aşağıdaki gibidir (Bak. Çizelge 3.1);

Çizelge 3.1. Termal Döngüler

16 °C	30 dk
42 °C	30 dk
85 °C	5 dk
4 °C	sonsuz

3.5. Real Time PCR:

Bu aşamada elde edilen cDNA örneklerinin Taqman Assay prob ile işaretlemeleri yapıldı. Real time PCR için Roche Light Cyclers 480 II kantitatif Gerçek Zamanlı PCR cihazı kullanıldı. Kullanılan 20x problemler (Applied Biosystems Taqman MikroRNA Assays (USA) Kit) TM Hsa-miR-16, TM Hsa-miR-21 TM Hsa-miR-190, TM Hsa-miR-146, TM Hsa-miR-27 ve TM Hsa-miR-144. RT-PCR aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. 96 reaksiyonluk Roche Light Cyclers 480 II cihazına uygun plate kuyucuklarında,
 - Applied Biosystems Taqman Universal Master Mix II, with UNG (USA) master mix'ten örnek başına 10 µl,
 - Taqman Assay20x problemlerden örnek başına 1 µl(TM Hsa-miR-16, TM Hsa-miR-21, TM Hsa-miR-190, TM Hsa-miR-146, TM Hsa-miR-27 ve TM Hsa-miR-144)
 - cDNA'lardan örnek başına 1,33 µl

• nükleaz içermeyen sudan örnek başına 7,67 µl olacak şekilde uygun plate düzenine göre total volüm 20 µl olarak hazırlandı.

2. Örneklerin Roche Light Cycler 480 II cihazında Second PCR çalışmaları yapıldı. Deney döngüleri aşağıdaki gibidir (Çizelge 3.2);

Çizelge 3.2. Deney Döngüleri

	Sıcaklık (°C)	Edinim Modu	Tutma Süresi	Sıcaklık Artış Oranı(°C)	Döngü	Analiz Modu
UNG (Urasil-DNA Glikozilaz)	50°C	Yok	2 dk	4.4	1	Yok
BAĞLANMA	95°C	Yok	10 dk	4.4	1	Yok
ÇOĞALMA	95°C	Yok	15 sn	4.4	40	Miktar
	60°C	Tek	1 dk	2.2		
SOĞUMA	40°C	Yok	30 sn	2.2	1	Yok

3.6 Analiz

3.6.1. Sonuçların Okunması

Çalışmada, crossing point (CP) değerleri elde edilerek hesaplamalar yapıldı.

3.6.2. Sonuçların REST ile değerlendirilmesi

Sonuçlar, elde edilen CP değerlerinin REST (Relative Expression Software Tool, v.2. 2002) programına girilmesiyle elde edildi. Hsa-miR-16 housekeeping (referans) gen olarak, Hsa-miR-21 geninin RT-PCR ile ekspresyonunun gözlenmesi nedeniyle, hedef gen olarak programa girildi. Programda sağlıklı kontrol gruplarına ait CP değerleri “control” kısmına yazılırken, hasta gruplarına ait CP değerleri de “samples” kısmına yazıldı. Program $2^{(-\text{delta delta Ct})}$ formülüne göre hesaplama yaparak miR-21'in hasta gruplarında kaç kat azaldığı /arttığı belirtildi.

3.7 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı kullanıldı. Normal dağılıma uygunluk testi için Kolmogorov-Smirnov Testi uygulandı. Normal dağılım gösteren nümerik değişkenler ortalama \pm standart sapma,

normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler medyan (25. - 75. persentil), kategorik değişkenler frekans (%) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için Mann Whitney U testi, kategorik değişkenler için Yates kıkare testi kullanılarak test edildi. İki yönlü hipotezlerin testinde $p < 0.05$ istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edildi. Yapılan analizlere göre hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri (Çizelge 3.3) ve biyokimyasal gebelik oranları (Bak. Çizelge 3.4) elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri

	Grup	Medyan (25.-75 persentil)	<i>p</i>
Yaş (yıl)	Hasta	37.00 (32.00 -39.25)	<0.001
	Kontrol	29.00 (27.00-30.25)	
Toplanan Oosit Sayısı	Hasta	3.00 (1.00-5.00)	<0.001
	Kontrol	9 (6.25-11.25)	
Döllenme Oranı	Hasta	66.00 (0.00-100.00)	0.658
	Kontrol	60.50 (37.00-92.50)	
FSH (IU/L)	Hasta	12.30 (8.76-16.85)	0.005
	Kontrol	7.18 (5.95-9.32)	
LH (IU/L)	Hasta	5.07 (3.95-6.87)	0.590
	Kontrol	3.09 (2.18-2.18)	
hCG günü Progesteron(ng/ml)	Hasta	0.70 (0.48-1.14)	0.489
	Kontrol	0.61 (0.43-0.67)	
E2 (pg/ml)	Hasta	37.00 (31.00-56.50)	0.339
	Kontrol	39.00 (39.00-46.25)	
AMH (ng/ml)	Hasta	0.48 (0.08-1.01)	<0.001
	Kontrol	4.69 (2.50-6.89)	
hCG günü E2 (pg/ml)	Hasta	460.00 (214.50-792.75)	<0.001
	Kontrol	1236.00 (912.00-1660.00)	
ET günü Endometriyum Kalınlığı (mm)	Hasta	9.45 (0.00-11.00)	0.050
	Kontrol	11.20 (6.82-11.85)	

Çizelge 3.4. Kontrol ve Hasta grupları arasında biyokimyasal gebelik oranlarının karşılaştırılması

	Grup	Oran	<i>p</i>*
Gebelik	Hasta	%11.3	0.137
	Kontrol	%30.0	

* Gruplar arası istatistik Chi-Square Testine göre yapıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.8 Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar

3.8.1. Kimyasal Malzemeler

TaqMan MICRO RNA Reverse Transcription Kit 200 RXN (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

TaqMan MikroRNA Assay, S hsa-miR-21-5p, 000397 (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

TaqMan MikroRNA Assay, S hsa-miR-190b, 002263 (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

TaqMan MikroRNA Assay, S hsa-miR-146a-3p, 002163 (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

TaqMan MikroRNA Assay, S hsa-miR-27a-5p, 002445 (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

TaqMan MikroRNA Assay, S hsa-miR-144-5p, 002148 (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

TaqMan MikroRNA Assay, S RNU6B, 001093 (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

TaqMAN Universal Master Mix II, with UNG, 5 ml (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Ultrapure™ DNase/RNase-free Distile Su, 500 ml (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

High Pure miRNA İzolasyon Kit, 50 rxn (ROCHE)

High Pure RNA İzolasyon Kit, 50 rxn (ROCHE)

3.8.2. Cihazlar

Laminar Flow (ScanLaf)

Ultrason(Medison 3D Volume)

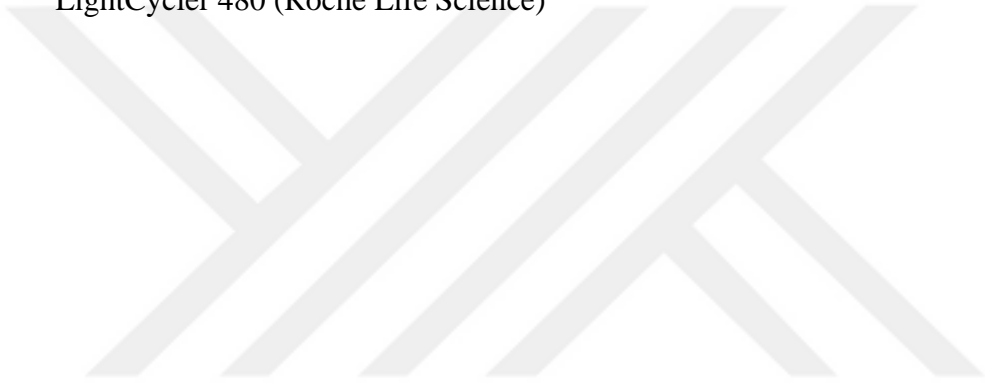
Santrijüj(Kubota, 2420)

Soğutmalı mikrosantrifüj (Sigma 1-15 PK)

NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)

Thermal Cycler (Bio Rad T100)

LightCycler 480 (Roche Life Science)



4. BULGULAR

4.1. RT-PCR Bulguları

Yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda sağlıklı kontrol grubu ve AOR hasta grubu arasında Hsa-miR-21 ve housekeeping gen olan Hsa-miR-16-5p'nin CP değerleri saptandı. Bu gruplara ait CP değerleri çizelgelerde (Bak. Çizelge 4.1) ve (Bak. Çizelge 4.2) gösterildi.

Elde edilen CP değerleri REST (RelativeExpression Software Tool, v.2. 2002) programına girilmiştir. Hsa-miR-16 housekeeping (referans) gen olarak, Hsa-miR-21 geni ise hedef gen olarak programa girildi.

Buna göre; Hsa-miR-21 geninin ekspresyonunun AOR hasta grubunda (n=62), sağlıklı kontrol grubu (n=10) hastalarına göre 3.96 kat azaldığı saptandı.

Hsa-miR-27, Hsa-miR-144, Hsa-miR-146 ve Hsa-miR-190 genlerinin ekspresyonlarına sağlıklı kontrol grubu ve AOR hasta grubunda rastlanmadı. Bu miRNA'ların folikül sıvısına ya hiç geçmediği ya da geçen miktarın RT-PCR ile saptanamayacak kadar az olduğu düşünülebilir.

4.2. Klinik ve Laboratuvar Bulguları

AOR ve kontrol grubu hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri karşılaştırıldığında; yaş ve FSH değerleri AOR hasta grubunda kontrol grubuna oranla daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). hCG günü E2 değeri, AMH ve toplanan oosit sayısı değerleri ise kontrol grubunda AOR hasta grubuna oranla daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Döllenme oranları, LH ve hCG günü progesteron değerleri AOR hasta grubunda kontrol grubu hastalarına oranla daha yüksek bulunup istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p<0.05$). E2 ve embriyo transferi günü endometriyum kalınlıkları kontrol grubu hastalarında AOR hasta grubuna göre daha yüksek bulunup istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p<0.05$).

AOR hasta grubu ve kontrol grubu hastaları arasında gebelik oranları karşılaştırıldığında kontrol grubu hastalarda gebelik oranları daha yüksek bulunup istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p<0.05$).

Çizelge 4.1. Yapılan RT-PCR sonucu elde edilen AOR grubu (n=62) CP değerleri saptandı ve REST (RelativeExpression Software Tool, v.2. 2002) programına girildi.

AOR Grubu (n=62)	miR-16-5p (Referans Geni CP Değerleri)	miR-21 (Hedef Geni CP Değerleri)
1	30,120	28,720
2	28,070	29,960
3	26,710	27,900
4	30,770	32,010
5	29,070	35,000
6	32,100	35,000
7	31,310	35,000
8	29,590	35,000
9	31,200	35,000
10	30,000	31,030
11	29,570	31,730
12	29,590	29,140
13	30,930	31,160
14	27,290	29,390
15	35,000	35,000
16	32,780	32,720
17	28,210	31,600
18	30,770	30,300
19	30,080	31,940
20	30,460	30,760
21	31,740	32,390
22	31,960	31,200

23	30,800	29,910
24	30,990	30,670
25	31,680	32,240
26	32,600	32,290
27	29,520	30,080
28	32,960	33,890
29	31,240	30,950
30	32,660	32,380
31	33,220	32,700
32	31,850	31,280
33	32,470	31,990
34	31,300	31,010
35	30,150	30,890
36	34,340	35,000
37	32,200	31,810
38	32,420	30,930
39	31,980	31,110
40	28,760	29,690
41	33,470	31,950
42	32,810	32,760
43	30,780	30,180
44	31,440	31,090
45	35,000	32,780
46	32,490	31,310
47	30,830	30,960
48	31,090	30,580

49	32,020	31,940
50	31,450	31,100
51	33,350	32,270
52	32,200	31,140
53	31,800	32,120
54	31,470	31,080
55	32,290	32,300
56	32,190	31,560
57	31,860	31,720
58	31,610	32,610
59	27,740	28,370
60	35,000	35,000
61	31,540	32,140
62	30,520	29,620

Çizelge 4.2. Yapılan RT-PCR sonucu elde edilen kontrol grubu (n=10) CP değerleri saptandı ve REST (RelativeExpression Software Tool, v.2. 2002) programına girildi.

Kontrol Grubu (n=10)	miR-16-5p (Referans Geni CP Değerleri)	miR-21 (Hedef Geni CP Değerleri)
1	33,440	32,280
2	34,730	33,360
3	32,570	31,020
4	32,610	31,080
5	33,080	32,090
6	31,610	30,560
7	37,470	34,220
8	33,670	30,400
9	35,060	33,550
10	32,500	31,820

5. TARTIŞMA

Oosit matürasyonu ve ovülasyon; gelişen folikül içinde birçok hücre tipinin fenotipik dönüşümünün gerçekleştiği, yüksek oranda sıralı ve sıkı düzenlenmiş bir süreçtir. Bu sürecin doğru bir şekilde anlaşılması KOH ve IVF ile infertilite tedavisinin başarısı için oldukça önemlidir. KOH'un amacı; iyi kalitede döllenebilecek yetenekte çok sayıda oosit elde ederek, optimal erken embriyo gelişimini ve embriyo transferini sağlamaktır (Arslan ve diğ. 2005).

KOH'a verilen over yanıtı her hasta grubuna özel ve zayıftan güçlü yanıt kadar değişen geniş bir aralıktadır (Gerasimova ve diğ. 2010). Zayıf overyan yanıtlarda tipik olarak düşük sayıda oosit elde edilir (Ferraretti ve diğ. 2011). KOH'a zayıf cevap diye adlandırılan moleküler mekanizmaların büyük bir bölümü hala bilinmemektedir. Oositin olgunlaşma sürecinde çeşitli germline-özel transkripsiyonel değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir (Elley ve Richards 2002, Pangas ve Rajkovic 2006) ve gen ekspresyonundaki transkripsiyon sonrası değişikliklerin oosit gelişimini kolaylaştırdığı mekanizmalar daha yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Böyle bir süreç, mikro ribonükleik asit (miRNA) ekspresyonundaki değişiklikler yoluyla ve gonadal seçici miRNA'lar, overyan gelişim ve doğurganlıkta önemli roller oynayabilir. MikroRNA'lar, granüloza hücrelerinde apoptozis, farklılaşma ve çoğalma olaylarında önemli araçlar olarak görülmektedir. (Karakaya ve diğ. 2015).

Çalışmalarda genel olarak, qPCR tabanlı yöntemler ve mikroarray dahil miRNA'ların ölçülmesi için iki ana miRNA profillemeye yöntemi kullanılmıştır. Biyobelirteç olarak kullanılan miRNA'ların klinik uygulamalarının bazı temel sorunlardan muzdarip olduğunu belirtmek gerekir. qPCR tabanlı çalışmalarda tasarlanan primerlerin uygun spesifikliğinin olmaması, sonuçların doğruluğunu etkileyebilir. Diğer taraftan, mikroarray tekniklerinde, birçok başlangıç malzemesine ihtiyaç vardır ve birçok farklı miRNA'yı tespit etmek için hibridizasyon koşullarının optimizasyonu zor olabilir. Bu nedenle, söz konusu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için yeni teknolojilerin kullanılması gerekmektedir. Ancak, çalışmalar arasındaki farklılıklar; tasarımlar, kohort boyutları, örnekleme teknikleri, analiz yöntemlerigibi bazı temel sınırlamalar, çalışmalar arasında az bir fikir birliğine yol açabilir. Klinikte miRNA'ların modern teknolojiler kullanılarak kullanılması amacıyla standart bir protokol oluşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Montazerian ve diğ. 2018).

miR-21, apoptozisi kontrol mekanizmasıyla, hücre proliferasyonunu etkileyerek posttranskripsiyonel gen regülasyonu ile onkojenik hücre hattına etki eder. miR21, bu özelliği ile tanımlanan iyi karakterize edilmiş bir miRNA'dır (Bueno ve diğ. 2018, Chan ve diğ. 2005, Dilhoff ve diğ. 2008, Yang ve diğ. 2009). miR-21 geni RNA polimeraz II yoluyla transkript edilir ve transmembran 49 geninin intronik bölgesinde yer alır (TMEM49; aynı zamanda VMP21 ile refere edilir) (Cai ve diğ. 2004, Fujita ve diğ. 2008, Lagos-Quintana ve diğ. 2002). Olgun miR-21 dizilimi ilk olarak insan HeLa hücrelerinde tespit edilmiştir (Nagaraja ve diğ. 2008) ve o zamandan beri domuz da dahil olmak üzere diğer birçok türün transkriptinde mevcut olduğu düşünülmüş ve doğrulanmıştır. miR-21'in kanser hücrelerindeki anti-apoptotik özelliklerinin programlanmış hücre ölümü 4 genini (PDCD4, daha önceden neoplastik transformasyon inhibitörü olarak refere edilmiştir) baskılama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir (Assangani ve diğ. 2007, Frankel ve diğ., Lu ve diğ. 2008, Qi ve diğ. 2009). Buna göre; miR-21 ve PDCD4 her ikisi birden oositte bulunuyorsa; miR-21, germinal vezikül kırıcı ve MII fazına ilerleyici miRNA fonksiyonları için gerekli protein olarak PDCD4 protein artışına neden olur (Wright ve diğ. 2016).

Karakaya ve diğ. (2015), çalışmalarında zayıf over yanıtı olan infertil kadınların kümülüs hücrelerinde değişen miRNA ekspresyonlarının seviyelerini tespit etmek istemiş ve 88 miRNA'nın downregüle olduğu ve 16 miRNA'nın upregüle olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle yüksek oranda LH dalgalanması tarafından düzenlenen miR-21 ekspresyonunun zayıf cevap veren hastalarda yükseldiğini bulmuşlardır. miR-21'in aktif formunun (miR-21- 5p), özellikle zayıf yanıt veren kadınların kümülüs hücrelerinde yükseldiğini ve bu artışın zayıf yanıt verenlerde gözlenen düşük serum E2 seviyeleri ile gerçekleşmesinin olası olmadığını bildirmişlerdir. Biz ise çalışmamızda bu çalışmanın aksine, azalmış over rezervi olan hastaların folikül sıvılarında, kontrol grubu hastalarına oranla miR-21 ekspresyonunun 3,96 kat daha az eksprese edildiğini tespit ettik. Çalışmalar arasındaki farklılıkların kullanılan hücre tiplerinin farklılıklarından kaynaklı olabileceğini düşünüyoruz.

MikroRNA-21, bu çalışmaların özellikle ilginç bir hedefidir, çünkü yüksek oranda hCG ve LH dalgalanması tarafından düzenlenir ve germ hücrelerde bir antiapoptotik faktör olarak işlev görebilir (Carletti ve diğ. 2010). Mir-21, Mir21 geni tarafından kodlanır; tanımlanan ilk memeli miRNA'larından birisidir ve olgun sekansı evrim boyunca kuvvetli bir şekilde korunmuştur. İnsan miRNA-21 geni, TMEM 49 kodlama geninin (ayrıca

vakuol membran proteini olarak da bilinir) içinde 17q23.2 kromozomu dizisi üzerinde bulunur (Karakaya ve diğ. 2015).

Karakaya ve diğ. (2015) çalışmalarında, miR-21-5p'nin zayıf yanıt veren hastaların kümülüs hücrelerinde yükselirken, miR-21-3p'nin aslında önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Bu yüzden miR-21-5p ekspresyonundaki artışın, zayıf yanıt veren bu hastalarda, pre-mir-21 seviyesiyle düzenlenmediğini düşünmüşlerdir. Ek olarak, hem miR-21-5p hem miR-21-3p'nin, daha yüksek E2 dozlarına cevap olarak bir granüloza hücre hattında arttığını tespit etmişlerdir (ekspresyon düşük E2 konsantrasyonlarından etkilenmediyse). Bizim çalışmamızdan farklı olarak zayıf cevap veren bu kadınlarda değişen miR-21 ekspresyonunun, serum E2 seviyelerinin azalmasının bir sonucu olmadığını düşünmüşlerdir. miR-21 ekspresyonuna E2'nin etkisi ile ilgili bulguları olan; MCF-7 hücrelerinin östrojen reseptörleriyle aktivasyonunu sağlayan miR-21 ekspresyonunu E2'nin baskıladığını gösteren Wickramasinghe ve diğ. verileri ile farklıdır ancak bizim çalışmamız Wickramasinghe ve diğ. çalışması ile uyumludur (Mickoleit ve diğ. 2011).). Bu farklılıklar E2'nin hücre tipine özel etkileri ile açıklanabilir. Yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler aynı fakat hücre tipleri (granüloza, göğüs kanser hücreleri ve folikül sıvısı) farklıdır. Belki de E2'nin miR-21 üzerinde hem agonist hem de antagonist etkileri olabilir ve bu etkiler östrojen bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla da gerçekleşebilir. (Wright ve diğ. 2016).

Najil ve diğ. (2017), çalışmalarında, hiperandrojenik ve normoandrojenik polikistik over sendromu (PCOS) hastalarında kontrol grubu hastalarına oranla granüloza hücrelerinde miR-93 ve miR-21 seviyelerinde yükselme gözlemişlerdir. Bunun aksine, folikül sıvılarında yaptıkları çalışmalarında, hiperandrojenik PCOS hastalarında kontrol grubu hastalarına göre miR-93 ve miR-21 seviyelerinde azalma tespit etmişlerdir. Buna göre, farklı PCOS alt gruplarının moleküler sinyallerinin farklı olabileceğinin yanı sıra aynı hasta gruplarında dahi çalışmalarda kullanılan farklı materyallerinde miRNA seviyelerinde değişkenlik gösterebileceğini doğrulamışlardır.

MikroRNA microarray analizleri ve derin sekanslama yöntemleri kullanılarak domuz oositlerinin invitro matürasyonu süresince miRNA-21'in miRNA'lar arasında upregüle olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Yang ve diğ. 2012). Farelerde luteinleştirici hormonun granüloza hücrelerinde miR-21 ekspresyonunu arttırabileceği ve in vivo miR-21 inhibisyonunun ovulasyon oranlarını negatif etkilediği gösterilmiştir (Carletti ve diğ. 2010). Bu verilerle uyumlu olarak bizde çalışmamızda E2 seviyesinin

düşük olduğu AOR hasta grubumuzda miR-21'in downregüle olması sonucunda az sayıda oosit elde edilmesini etkilediğini düşünmekteyiz. (Wright ve diğ. 2016).

Wright ve diğ. (2016) çalışmalarında, domuzların olgunlaşan kümülüs oosit kompleksinde miR-21 artışının, oositteki PDCD4 ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu ve miR-21 fonksiyonlarının baskılanmasının oosit maturasyonunu ve sonrasında embriyonik gelişimi tehlikeye atacağını belirtmişlerdir. Oosit büyümesi ve gelişimi, antral folikül gelişiminden önce başlar ve miR-21 ekspresyonunun aktivasyonunun ne zaman gerçekleştiği veya bu gözlem için hangi mekanizmanın öncelikle sorumlu olduğu henüz belirsizdir (Wright ve diğ. 2016). Bizde çalışmamızda, düşük E2 seviyesi sonucunda miR-21 ekspresyonunun AOR hasta grubunda azalması ile az sayıda oosit gelişiminin ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda AOR hasta grubu ve kontrol grubu arasında yaş, toplanan oosit sayıları ve AMH seviyeleri arasında istatistiksel olarak da anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Zhang ve diğ. (2017) insan folikül sıvısında miRNA dizilimi yoluyla birkaç farklı eksprese edilen miRNA bulmuşlardır. Foliküler sıvıda yüksek miR-15a-5p seviyesinin, oositler, granüloza hücreleri proliferasyonu ve apoptoz ile ilişkili olduğunu savunmuşlardır. Zayıf over yanıtı (POR) olan hastaları; zayıf over yanıtı olan genç, yaşlı hastalar ve kontrol grubu hastaları olarak üç gruba ayırmış ve topladıkları folikül sıvılarında yaklaşık 1258 miRNA tespit etmişlerdir. Bu hasta grubu da, AOR hasta grubuna benzer olarak IVF sırasında over stimülasyonuna düşük yanıt verir, düşük kaliteli embriyolar üretir ve yüksek oranda iptal ile sonuçlanabilirler. Çalışmalarında hem POR- genç hem de POR-yaşlı gruplarına, POR olmayan gruba göre anlamlı şekilde daha fazla, yaklaşık olarak 3-4 IVF siklusu uygulamışlardır. AMH düzeyleri bizim çalışmamızla da uyumlu olarak her iki POR grubunda da anlamlı derecede düşüktür. AMH, over yanıtını tahmin etmek için en iyi duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir (Ferraretti ve diğ. 2011). POR hastalarında bu anlamlı derecede düşük AMH seviyeleri, bizim hasta grubumuzda olduğu gibi azalmış over rezervini göstermektedir. Ayrıca, toplanan oositlerin sayısı POR gruplarında bizim çalışmamızda ki AOR hasta grubuyla uyumlu olarak anlamlı derecede düşük seyretmiştir. Çünkü POR hastaları maksimum stimülasyona maruz kalsalar bile folikül sayılarının az olması beklenen bir grup hastadır. Bu sonucu iyileştirmek için; yüksek dozlarda gonadotropinler (Karande ve diğ 1990), klomifensitrat ve insan menopozal gonadotropin (Saadat ve diğ. 2003), insan gonadotropin hormon antagonisti ve büyüme hormonunun ortak uygulandığı (Akman ve diğ. 2001); minimal stimülasyon (Weghofer ve diğ. 2004), vb. birçok strateji denenmiştir. Bununla birlikte, uygulamaların

sonuçları tartışmalıdır ve gebelik oranlarındaki iyileşme, POR'un altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında çok az şey bildiğimiz için sınırlı olmuştur (Zhang ve diğ. 2017).

Foliküler sıvı, oositler ve çevresindeki granüloza hücreleri için yaşamı sürdüren bir mikroçevre sağlar. Oositlerin olgunlaşması ve kalitesi için hayati olan miRNA'lar, proteinler, lipitler ve vitaminler dahil olmak üzere çok çeşitli moleküller içerir (Hanrieder ve diğ. 2008, Revelli ve diğ. 2009). MikroRNA'ların varlığının, hücreden yoksun insan foliküler sıvısından gelen süpernatant, mikroveziküller veya eksozomlarda bulunduğu bildirilmiştir (Sang ve diğ. 2013). Mikroveziküller ve eksozomlar, proteinleri, RNA ve /veya miRNA moleküllerini hedef hücrelere transfer ederek hücre iletişimde önemli bir rol oynamaktadır (Valadi ve diğ. 2007, Yuan ve diğ. 2009). MikroRNA'ları ve proteinleri içeren bu veziküller, etraftaki granüloza hücreleri tarafından alınır (da Silveira ve diğ. 2012).

MikroRNA ekspresyonundaki değişikliklerin tümör oluşumunda ve gelişiminde rol oynadığı bulunmuştur (Ganepola ve diğ. 2014, Guo ve diğ. 2014, Song ve diğ. 2015, Huan ve diğ. 2016, Long ve diğ. 2016). Bizimde çalışmamızda AOR hasta grubunda anlamlı olarak daha az eksprese edildiğini gördüğümüz miR-21'in, MFC-7 göğüs kanser hücrelerinde ekspresyonunun varlığı tespit edilmiştir (Zhang ve diğ. 2017).

MikroRNA aracılı gen regülasyonu, üreme somatik dokularının ve kadın fertilitésinin normal gelişimi ve fonksiyonu için kritiktir (Hong ve diğ. 2008). MikroRNA'ların oosit olgunlaşması sırasında transkripsiyonu hızlandırdığı, oositin mayotik olgunlaşması ve daha sonra ovulasyon için gerekli oldukları gösterilmiştir (Murchison ve diğ. 2007). Yapılan çalışmalarda miRNA biyogenezi için temel bir faktör olan Dicer'in çıkarıldığı dişi fareler kısır hale gelmiştir (Murchison ve diğ. 2007). Bütün bu verilere göre; POR hastalarının kümülüs hücrelerinde değişen miRNA ekspresyonu, özellikle de bir anti-apoptotik faktör olan miR-21-5p ekspresyonunun yükselmesi ile ilişkilidir (Ma ve diğ. 2011, Karakaya ve diğ. 2015). Bu literatürler ile farklı olarak biz çalışmamızda AOR hastalarından toplanan folikül sıvılarında miR-21 ekspresyonunun azaldığını tespit ettik. Bu çalışmalar arasındaki farklılıkların hem kullanılan hücre tiplerinin farklılıklarından hem de kullanılan IVF protokollerin deki farklılıklardan kaynaklı olması mümkün olabilir (Zhang ve diğ. 2017).

Dang ve diğ. (2015) tarafından yürütülen bir çalışmada, prematür over yetmezliği (POF) olan 140 kadın yaş ve vücut kitle indeksi (BKİ) bilgileri olan 140 kontrol grubu kadınla eşleştirilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir. Bu deney boyunca, farklı şekilde

eksprese edilen 51 miRNA tanımlanmıştır. Özellikle miR-22-3p ekspresyonunun, POF grubu hastalarda serum FSH oranı ile negatif ilişkili olarak önemli ölçüde downregüle edildiğini göstermişlerdir (Montazerian ve diğ. 2018). Biz ise çalışmamızda AOR grubu hastalardan toplanan folikül sıvılarında Hsa-miR-27, Hsa-miR-144, Hsa-miR-146, Hsa-miR-190 ve Hsa-miR-21 ekspresyonlarını tespit etmeyi hedefleyip sadece miR-21 ekspresyonunu saptadık. MiR-21 dışında kalan miRNA ekspresyonlarını kontrol ve AOR hasta gruplarının her ikisinde de tespit edemedik. Bu durum bize, bu miRNA'ların folikül sıvısına ya hiç geçmediğini ya da geçen miktarın RT-PCR ile saptanamayacak kadar az olduğu düşündürmüştür.

Kuang ve diğ. (2014) çalışmalarında ovotoksik bir kimyasal olan 4-vinilsikloheksen difoksit (VCD) ile bir grup sıçanı prematür over yetmezliğine sokup kontrol grubu normal over dokusuna sahip sıçanlardan elde ettikleri dokularla karşılaştırdıklarında altı adet miRNA varlığını tespit etmişlerdir. miR-29 ve miR-144'ün downregüle edildiğini, miR-27, miR-190, miR-151 ve miR-672'nin normal over ile karşılaştırıldığında POF sıçan over dokularında upregüle edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, upregüle edilmiş miR-27 ve miR-190 ekspresyonunun her ikisi de hormon uyarısına cevap ile ilişkili olan sırasıyla PAPPa ve CCL2'nin ekspresyonunu negatif yönde kontrol edebildiklerini belirtmişlerdir. Biz ise çalışmamızda, miR-27 ve miR-190 ekspresyonunu her iki çalışma grubunun folikül sıvılarında da tespit etmedik. Spesifik olarak, miR-29 ve miR-144'ün downregüle ekspresyonunun, prostaglandin biyosentezinde yer alan PLA2G4A ekspresyonunu düzenleyebildiği öngörülmektedir.

Iwaya ve diğ. (2012) miR-144'ün düşük ekspresyonunun, foliküler tiroid karsinom dokularındaki mTOR sinyal yolunu aktive ettiğini (Iwaya ve diğ. 2012), mTOR sinyal yolunun upregülasyonunun, VCD tedavisinden sonra over yaşlanması ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Sobinoff ve diğ. 2010). Bu veriler ile miR-29 ve miR-144 ekspresyonunun her ikisinin de downregüle olmasının prematür over yetmezliğine neden olabileceğini gösterdiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca, yine çalışmalarında, PAPPa ve CCL2 ekspresyonunun downregüle edildiğini ve bu durumun over hormon uyarılarına verilen yanıtı bozabileceğini gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarının sonuçları, yüksek seviyelerde miR-27 ekspresyonunun PAPPa ekspresyonunu baskılayabileceğini göstermiştir. Daha önceki çalışmalarda, meme kanseri dokularında miR-27'nin aşırı ekspresyonu gösterilmiştir (Tsuchiya ve diğ. 2006). Ayrıca, miR-27'nin aşırı ekspresyonu, kardiyak hipertrofi ve disfonksiyonu indüklemek için yeterlidir (Wang ve diğ. 2012). Ek

olarak, birkaç yayın yüksek miR-190'ın PHLPP downregüle olmasından sorumlu olduğunu ve bunun sonucunda uzun süreli veya kuvvetlendirilmiş bir Akt aktivasyonuna neden olduğunu belirtmiştir (Beezhold ve diğ. 2011). PI3K / Akt sinyali, primordiyal folikül aktivasyonunu (Scharer ve diğ. 2009) teşvik edebilir ve primordiyal foliküller yenilenemezse, tükenen primordiyal folikül havuzu erken menopoza yol açabilir (McGee ve Hsueh 2000). Çalışmalarında, miR-190'ın POF olan over dokularında açıkça eksprese edildiği ve miR-190 ile CCL2 ekspresyonu arasında ki ters ilişkinin over adenokarsinom riskinde rol oynadığını göstermişlerdir (Arnold ve diğ. 2005). Bu veriler ele alındığında, overlerde hormon uyarıcısının işlev bozukluğu ile ilişkili miR-27 ve miR-190'ın anormal ekspresyonunun POF başlangıcına katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Kuang ve diğ. 2014). Bizim çalışmamızla arasında ki farklılıklar daha önce de bahsedildiği gibi kullanılan materyallerin (over dokusu, folikül sıvısı gibi) farklılıklarından kaynaklı olabilir.

POR hastalardan elde edilen plazma ve granüloza hücrelerinde MiR-146'nın ekspresyonunun upregüle olduğu bulunmuştur (Yang ve diğ. 2012, Chen ve diğ. 2015). MiR-146, sığır oosit olgunlaşması ve preimplante embriyo gelişimi sırasında oositte eksprese edilir ve miR-146'nın varsayılan hedef genlerinden birisi, kaspaz8 yolu ile folikülogenez sırasında oosit apoptozunu düzenleyen Fas'tır (de los Santos ve diğ. 2000, Suzuki ve diğ. 2010). Ek olarak, miR-146; folikülogenez ve atrezinin tümör nekroz faktörü (TNF) 'ye bağlı olarak düzenlenmesinde de rol oynar (Hussein 2005). Granüloza hücrelerinin apoptozisi POR hastalarında çok önemlidir. Apoptozda miRNA'ların düzenleyici mekanizmalarının anlaşılması, POR'un patogenezini göstermenin önünü açmaktadır. MiR-196, embriyogenez sırasında yenidoğan over homeobox geninin (NOBOX) ekspresyonunu inhibe eder (Tripurani ve diğ. 2011). NOBOX genindeki mutasyonlar POF ile ilişkilendirilmiştir (Qin ve diğ. 2007), miR-196a'nın NOBOX'ı düzenleyerek POF riskini artırabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, NOBOX'ın overlerde miR-196 tarafından düzenlenip düzenlenmediği açıklayan bir çalışma yoktur. Hedef genler muhtemelen miR-146 ve miR-196'dan etkilenir ve sonrasında anormal folikülogenez meydana gelir. Biz çalışmamızda her iki grubun folikül sıvılarında da miR-146 ekspresyonunu tespit edemedik.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

- Çalışmamızda, azalmış over rezervi olan hastaların folikül sıvılarında kontrol grubuna göre miR-21 ekspresyonunun belirgin olarak azaldığını belirledik.
- Çalışmamızda; miR-27, miR-144, miR-146 ve miR-190'ı folikül sıvısında tespit edemedik.
- Farklı fizyolojik olaylar ve hastalıkların patogenezi, epigenetik mekanizmaların moleküler düzeyde anlaşılması ve alternatif uygulamalar için miRNA biyogenez yolağı potansiyel hedef olarak gözükmektedir. Bütün bu bahsedilen veriler ve yoğun çalışmalar, bilimsel bilginin pratik uygulamaya geçme potansiyelinin olduğunu ve bunun miRNA-temelli diyagnostik ve terapötik araç olarak klinikte geliştirilmesine olanak sağlayabileceğini göstermiştir. Teknolojinin gelişmeye devam etmesiyle, miRNA profilinin elde edilmesi daha kolay, hızlı ve ucuz olacaktır.
- Biyoinformatik analizler tümör oluşumunda, endositoz ve apoptozisde miRNA'ların yer aldığını göstermiştir. Buradan yola çıkarak POF ya da AOR hastalarında tespit edilebilecek miRNA'lar bu hastalıkların tespit edilmesinde ayırt edici bir belirteç olarak kullanılabilir. Ancak bu tip hastalıkların patolojisindeki yerlerinin tam olarak anlaşılması için daha fazla sayıda ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.
- İmplantasyon bozukluklarında erken tanı için marker olarak kullanılabilmesi açısından miRNA'nın tespit edilmesinin büyük önemi vardır. MikroRNA'ların günlük klinik pratikte embriyonik ve endometriyal sağlık için değerlendirilip ve dolayısıyla IVF sonrası transfer başına gebelik oranlarındaki artışı sağlayacak gerçek bir yaklaşıma dönüşmeden önce büyük klinik çalışmalarda teyit edilmesi gerekir.
- Dişi üreme sisteminin moleküler mekanizmasının anlaşılması, üreme verimliliğini arttırmak için yöntemler geliştirilmesine yardımcı olarak memeli üreme mekanizmasının daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- “American Society For Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama, Intracytoplasmic sperm injection (icsi) for non-male factor infertility: a committee opinion”. *Fertil Steril*. 2012; 98: 1395–9.
- Abbott DH, Tarantal AF, Dumesic DA. Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. *American Journal of Primatology*. 2009; 71: 776-84.
- Abd El Naby WS, Hagos TH, Hossain MM ve diğ. Expression analysis of regulatory MikroRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. *Zygote*. 2013; 21: 31-51.
- Abd El Naby WS, Hagos TH, Hossain MM ve diğ. Expression analysis of regulatory MikroRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. *Zygote*. 2013; 21: 31-51.
- Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev*. 2009; 30(5): 438-64.
- Adhikari D, Zheng W, Shen Y ve diğ. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet*. 2010; 19(3): 397-410.
- Akman MA, Erden HF, Tosun SB ve diğ. Comparison of agonistic flare-up-protocol and antagonistic multiple dose protocol in ovarian stimulation of poor responders: results of a prospective randomized trial. *Human Reproduction*. 2001; 16: 868-70, (doi:10.1093/humrep/16.5.868).
- Aktaş H. Derin teratozoosperminin ICSI’de gebelik sonuçları üzerindeki etkisi. Uzmanlık Tezi. Süleymaniye Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2007.
- Almog N, Briggs C, Beheshti A ve diğ. Transcriptional changes induced by the tumor dormancy-associated MikroRNA-190. *Transcription*. 2013; 4: 177-91.
- Altnae S, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ ve diğ. MikroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod Sci*. 2013; 20: 308-17.
- Ambros V. The functions of animal MikroRNAs. *Nature*. 2004; 431: 350-5.
- Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. Cilt. Ankara Güneş Kitap Evi, Ankara, 2001.
- Armstrong DG, McEvoy TG, Baxter G ve diğ. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod*. 2001; 64: 1624-32.
- Arnold JM, Huggard PR, Cummings M ve diğ. Reduced expression of chemokine (C-C motif) ligand-2 (CCL2) in ovarian adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2005; 92: 2024-31.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM ve diğ. Argonaute2 complexes carry a population of circulating MikroRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 5003-8.
- Arslan M, Bocca S, Mirkin S ve diğ. Controlled ovarian hyperstimulation protocols for in vitro fertilization: two decades of experience after the birth of Elizabeth Carr. *Fertil Steril*. 2005; 84: 555-69.
- Assou S, Al-edani T, Haouzi D ve diğ. MikroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulusoocyte complex. *Hum Reprod*. 2013; 28: 3038-49.

- Ballas N, Grunseich C, Lu DD ve diğ. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*. 2005; 121: 645-57.
- Bao H, Li X, Li H ve diğ. MikroRNA-144 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation, invasion and migration by targeting ZFX. *J Biosci*. 2017; 42(1): 103-11.
- Barın H, Yıldırım B, Karakaya F ve diğ. Hiperprolaktineminin infertilitedeki yeri ve hiperprolaktinematik hipogonadizm sendromları. *The Eurasian Journal of Medicine, Formerly Atatürk Üniversitesi Tıp Dergisi*. <http://www.eajm.org/sayilar/65/buyuk/14.pdf> (Ulaşım: 23 Ocak, 2015).
- Bartel DP. MikroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281-97.
- Beezhold K, Liu J, Kan H ve diğ. miR-190-mediated downregulation of PHLPP contributes to arsenic-induced Akt activation and carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 2011; 123: 411-20.
- Beksaç M S, Demir N, Tuncer S ve diğ. Jinekoloji; Üreme Endokrinolojisi & İnfertilite Ve Jinekolojik Onkoloji. Nobel Kitabevi, Ankara, 2006.
- Berek JS. Berek & Novak Jinekoloji (14. Baskı). Çev. Ed. Ahmet Erk, Fazlı Demirtürk, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2011.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA ve diğ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003; 35: 215-7.
- Besson A, Hwang HC, Cicero S ve diğ. Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev*. 2007; 21(14): 1731-46.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human MikroRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004; 10: 1957-66.
- Carletti MZ, Christenson LK. MikroRNA in the ovary and female reproductive tract. *J Anim Sci*. 2009; 87: 29-38.
- Carletti MZ, Filder SD, Christenson LK. MikroRNA 21 bloks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells. *Biol Reprod*. 2010; 83: 286-95.
- Castoldi M, Schmidt S, Benes V ve diğ. A sensitive array for MikroRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA*. 2006; 12: 913-20.
- Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T ve diğ. MikroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 15144-9.
- Chen PY, Manninga H, Slanchev K ve diğ. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes Dev*. 2005; 19: 1288-93.
- Chen X, Ba Y, Ma L ve diğ. Characterization of micro-RNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other. *Cell Res*. 2008; 18: 997-1006.
- Chen X, Xie M, Liu D ve diğ. Downregulation of MikroRNA146a inhibits ovarian granulosa cell apoptosis by simultaneously targeting interleukin1 receptorassociated kinase and tumor necrosis factor receptorassociated factor 6. *Mol Med Rep*. 2015; 12: 5155-62.
- Cheong AW, Pang RT, Liu WM ve diğ. MikroRNA Let-7a and dicer are important in the activation and implantation of delayed implanting mouse embryos. *Hum Reprod*. 2014; 29: 750-62.
- Chhabra R, Dubey R, Saini N. Cooperative and individualistic functions of the MikroRNAs in the miR-23a ~ 27a ~ 24-2 cluster and its implication in human diseases. *Mol Cancer*. 2010; 9: 232.
- Chim SS, Shing TK, Hung EC ve diğ. Detection and characterization of placental MikroRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008; 54: 482-90.

Cho SH, Chung KW, Kim JO ve diğ. Association of miR-146aC>G, miR-149C>T, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with risk of recurrent implantation failure in Korean women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016; 202: 14-9.

Cohen J, Chabbert-Buffet N, Darai E. Diminished ovarian reserve, premature ovarian failure, poor ovarian responder—a plea for universal definitions, *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32: 1709-12.

Cooper AR, Baker VL, Sterling EW ve diğ. The time is now for a new approach to primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2012; 95: 1890-7.

Cooper GS, Baird DD, Hulka BS ve diğ. Follicle-stimulating hormone concentrations in relation to active and passive smoking. *Obstet Gynecol.* 1995; 85: 407-11.

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J ve diğ. MikroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011; 8: 467-77.

Coutinho LL, Matukumalli LK, Sonstegard TS ve diğ. Discovery and profiling of bovine MikroRNAs from immune-related and embryonic tissues. *Physiol Genomics.* 2007; 29: 35-43.

Cui XS, Shen XH, Kim NH. Dicer1 expression in preimplantation mouse embryos: involvement of Oct3/4 transcription at the blastocyst stage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 352: 231-6.

Çelik S. Ovaryum Kriyoprezervasyonu ve Transplantasyonu Sonrasında Folikül Kaybı Mekanizmalarında Rol Alan Baskılayıcı Moleküllerin Araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, 2016.

da Silveira JC, Veeramachaneni DN, Winger QA ve diğ. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction.* 2012; 86: 71, (doi:10.1095/biolreprod.111.093252).

Dang Y, Zhao S, Qin Y ve diğ. MikroRNA-22-3p is downregulated in the plasma of Han Chinese patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2015; 103: 802-7.

Davis BN, Hilyard AC, Lagna G ve diğ. SMAD proteins control DROSHA-mediated MikroRNA maturation. *Nature.* 2008; 454: 56-61.

de Antonellis P, Liguori L, Falanga A ve diğ. MikroRNA 199b-5p delivery through stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) in tumorigenic cell lines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2013; 386: 287-302.

de los Santos JM, Anderson DJ, Racowsky C ve diğ. Presence of Fas-Fas ligand system and bcl-2 gene products in cells and fluids from gonadotropin-stimulated human ovaries. *Biol Reprod.* 2000; 63: 1811-6.

De Vos M, Devroey P, Fauser BCJM. Primary ovarian insufficiency. *Lancet Lond Engl.* 2010; 376(9744): 911-21.

Demiroğlu A, Güven S, Timur G. İnfertilitede tubo-peritoneal faktör. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2006; 13(3): 199- 202.

Dey SK, Lim H, Das SK ve diğ. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004; 25: 341-73.

Diez-Fraile A, Lammens T, Tilleman K ve diğ. Age-associated differential MikroRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization. *Hum Fertil.* 2014; 17(2): 90-8.

Du J, Yang S, An D ve diğ. BMP-6 inhibits MikroRNA-21 expression in breast cancer through repressing deltaEF1 and AP-1. *Cell Res.* 2009; 19: 487-96.

- Durdağ DG, Berker B. Over rezervinin değerlendirilmesi, Derleme, Türkiye Klinikleri. *J Gynecol Obst.* 2008; 18(4): 254-65.
- Durmazoğlu G. İnfertilite ve Tedavisinin Kadınların Çalışma Hayatına Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015.
- Ebrahimi SO, Reisi S, Barjui SP. Increased risk of polycystic ovary syndrome (PCOS) associated with CC genotype of miR-146a gene variation. *Gynecol Endocrinol.* 2018; 34(9): 793-7.
- El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L ve diğ. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem.* 2004; 50: 564-73.
- Erkoçak A. Özel Histoloji. Ankara. Ankara Üniversitesi Tıp Fak. Basım Evi, Ankara, 1982.
- Espey LL, Richards JS. Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. *Biol Reprod.* 2002; 67: 1662-70.
- Estella C, Herrer I, Moreno HM ve diğ. miRNA signature and Dicer requirement during human endometrial stromal decidualization in vitro. *PLoS ONE.* 2012; 7: 41080.
- Donadeu FX, Schauer SN, Sontakke SD. Involvement of miRNAs in ovarian follicular and luteal development, *Journal of Endocrinology.* (2012); 215: 323-34, (Doi: 10.1530/JOE-12-0252 0022–0795/12/0215–323).
- Fantl V, Stamp G, Andrews A ve diğ. Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev.* 1995; 9(19): 2364-72.
- Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC ve diğ. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011; 26: 1616-24.
- Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM ve diğ. ESHRE consensus on the definition of "poor response" to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011; 26(7): 1616-24.
- Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X ve diğ. Hormonal regulation of MikroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol Reprod.* 2018; 79: 1030-37.
- Fortune J. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 1994; 50(2): 225-32.
- Fujita S, Ito T, Mizutani T ve diğ. miR-21 gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol.* 2008; 378: 492-504.
- Ganepola GA, Rutledge JR, Suman P ve diğ. Novel blood-based MikroRNA biomarker panel for early diagnosis of pancreatic cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology.* 2014; 6: 22-33, (doi:10.4251/wjgo.v6.i1.22).
- Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology.* Elsevier Health Sciences, Amsterdam, 2007.
- Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B ve diğ. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.* 2008; 26: 317-25.
- Geng Y, He J, Ding Y ve diğ. The differential expression of MikroRNAs between implantation sites and interimplantation sites in early pregnancy in mice and their potential functions. *Reprod Sci.* 2014; 21: 1296-1306.
- Gerasimova T, Thanasoula MN, Zattas D ve diğ. Identification and in vitro characterization of follicle stimulating hormone (FSH) receptor variants associated with abnormal ovarian response to FSH. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 529-36.

Gilabert-Estelles J, Braza-Boils A, Ramon LA ve diğ. Role of MikroRNAs in gynecological pathology. *Curr Med Chem.* 2012; 19: 2406-13.

Gilad S, Meiri E, Yogev Y ve diğ. Serum MikroRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One.* 2008; 3: 3148.

Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW ve diğ. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79: 1158-65.

Glasser S. Amsterdam: Excerpta Medica:398-437.

Gonzalez G, Behringer RR. Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. *Mol Reprod Dev.* 2009; 76: 678-88.

Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update.* 2005; 11(4): 391-410.

Gougeon A. Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. *Endocr Rev.* 1996; 17: 121-55.

Gövsa F. Sistematik Anatomi. Güven Kitapevi, İzmir, 2003.

Guo S, Xu X, Tang Y ve diğ. miR-15a inhibits cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma by down-regulating Bmi-1 expression. *Cancer Letters.* 2014; 344: 40-6, (doi:10.1016/j.canlet.2013.10.009).

Guo Y, Sun J, Lai D. Role of MikroRNAs in premature ovarian İnsufficiency. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2017; 15: 38, (Doi: 10.1186/s12958-017-0256-3).

Guo Y, Sun J, Lai D. Role of MikroRNAs in premature ovarian insufficiency. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017; 15: 38.

Gürgen SG. Kemoterapi uygulamasının sıçan ovaryum follikülleri üzerine etkisi ve çeşitli antioksidanların koruyucu rollerinin yapısal ve immünohistokimyasal düzeyde belirlenmesi. Doktora tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, 2009.

Ha M, Kim VN. Regulation of MikroRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15: 509-24.

Haixue K. Profiling of differentially expressed MikroRNAs in premature ovarian failure in an animal model. *Gynecol Endocrinol.* 2014; 30: 57-61.

Hanrieder J, Nyakas A, Naessen T ve diğ. Proteomic analysis of human follicular fluid using an alternative bottom-up approach. *Journal of Proteome Research* 2008; 7: 4439, (doi:10.1021/pr070277z).

Hao Y, Yang J, Yin S ve diğ. The synergistic regulation of VEGF-mediated angiogenesis through miR-190 and target genes. *RNA.* 2014; 20: 1328-36.

Hassa H. Endometriosis- infertilite ilişkisi ve tedavi sınırları. *Tjod Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi.* 2004; 8: 182-87.

Haverty PM, Fridlyand J, Li L ve diğ. High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008; 47: 530-42.

Henderson SA, Edwards RG. Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature.* 1968; 218(5136): 22-8.

Herbrandson C Learning the Reproductive System [Online]. <http://academic.kellog.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201McKinley/REproductive%20%20System.htm> (Erişim: 12 Ekim 2011)

Hong X, Luense LJ, McGinnis LK ve diğ. Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology*. 2008; 149: 6207-12.

Hossain MM, Ghanem N, Hoelker M ve diğ. Identification and characterization of miRNAs expressed in the bovine ovary. *BMC Genomics*. 2009; 10: 443.

Hossain MM, Sohel MM, Schellander K ve diğ. Characterization and importance of MikroRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res*. 2012; 349: 679-90.

Hu SJ, Ren G, Liu JL ve diğ. MikroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation. *J Biol Chem*. 2008; 283: 23473-84.

Huan L, Bao C, Chen D ve diğ. MikroRNA-127-5p targets the biliverdin reductase B/nuclear factor-kappaB pathway to suppress cell growth in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Science*. 2016; 107: 258-66, (doi:10.1111/cas.12869).

Huang J, Ju Z, Li Q ve diğ. Solexa sequencing of novel and differentially expressed MikroRNAs in testicular and ovarian tissues in Holstein cattle. *Int J Biol Sci*. 2011; 7: 1016-26.

Huang S, He X, Ding J ve diğ. Upregulation of miR-23a approximately 27a approximately 24 decreases transforming growth factor-beta-induced tumor-suppressive activities in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2008; 123: 972-8.

Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*. 2005; 11: 162-77.

Imbar T, Eisenberg I. Regulatory role of MikroRNAs in ovarian function. *Fertility and Sterility*. 2014; 101(6): 1524-30.

Iwaya T, Yokobori T, Nishida N ve diğ. Downregulation of miR-144 is associated with colorectal cancer progression via activation of mTOR signaling pathway. *Carcinogenesis*. 2012; 33: 2391-7.

Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM ve diğ. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*. 1992; 359(6393): 295-300.

Jarver P, Coursindel T, Andaloussi SE ve diğ. Peptide-mediated cell and in vivo delivery of antisense oligonucleotides and siRNA. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012; 1: 27.

Jazbutyte V, Thum T. MikroRNA-21: From cancer to cardiovascular disease. *Curr Drug Targets*. 2010; 11: 926-35.

Jia WZ, Yu T, An Q ve diğ. MikroRNA-190 regulates FOXP2 genes in human gastric cancer. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 3643-51.

Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji, Text and Atlas. Dişı Üreme Sistemi (11. Baskı). Çev. Ed.Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu, Prof. Dr. Yener Aytekin, Nobel Kitapevleri, İstanbul, 2009.

Karakaya C, Güzeloğlu-Kayışlı Ö, Uyar A ve diğ. Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered MikroRNA expression in cumulus cells. *Fertility and Sterility*. 2015; 103(6): 1469-76.

Karande VC, Jones GS, Veeck LL ve diğ. High-dose follicle-stimulating hormone stimulation at the onset of the menstrual cycle does not improve the in vitro fertilization outcome in low-responder patients. *Fertility and Sterility*. 1990; 53: 486-9, (doi:10.1016/S0015- 0282(16)53345-7).

Kavlak O, Saruhan A. İnfertil kadınlarda yalnızlık düzeyi ve bunu etkileyen faktörlerin incelenmesi. *Ege Tıp Dergisi*. 2002; 41 (4): 229-32.

- Kayıkçı AM, Çam KH, Akman Y ve diğ. Erkek infertilitesini değerlendirmede semen analizinin özellikleri ve rolü. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002; 4 (3): 35-38.
- Keller A, Leidinger P, Vogel B ve diğ. miRNAs can be generally associated with human pathologies as exemplified for miR-144. *BMC Med*. 2014; 12: 224, (Doi: 10.1186/s12916-014-0224-0).
- Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene*. 2008; 27(41): 5477-85.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003; 115: 209-16.
- Kılınç AR. Çukurova Üniversitesine başvuran infertil çiftlerde in vitro fertilizasyon endikasyonları. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı, 2007.
- Kızılkaya Beji N. İnfertilite hemşireliği. İnfertilite Hemşireliği Derneği, İstanbul, 2009.
- Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology. Follicle Development and Menstrual cycle. Mosby, Amsterdam, 2006.
- Kim YJ, Ku SY, Kim YY ve diğ. MikroRNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence during in vitro maturation of mouse follicles. *Hum Reprod*. 2013; 28: 3050-61.
- Kim YR, Hong SH. Associations of MikroRNA polymorphisms (miR-146a, miR-196a2, and miR-499) with the risk of hypertension in the Korean population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2016; 20: 420-6.
- Klimenko OV, Shtilman MI. Transfection of Kasumi-1 cells with a new type of polymer carriers loaded with miR-155 and antago-miR-155. *Cancer Gene Ther*. 2013; 20: 237-41.
- Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y ve diğ. Secretory mechanisms and intercellular transfer of MikroRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010; 285: 17442-52.
- Kuang H, Han D, Xie J ve diğ. Profiling of differentially expressed MikroRNAs in premature ovarian failure in an animal model. *Gynecol Endocrinol*. 2014; 30(1): 57-61.
- Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and Disease. *RNA Biology*. 2011; 8: 706-13.
- La Marca A, Sighinolfi G, Radi D ve diğ. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*. 2010; 16(2): 113-30.
- Lange UC, Saütou M, Western PS ve diğ. The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol*. 2003; 3: 1.
- Larsen WJ. Human Embryology (3. Baskı). Churchill Livingstone, Philadelphia, Pennsylvania, 2001.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75: 843-54.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW ve diğ. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004; 117: 69-81.
- Li M, Liu Y, Wang T ve diğ. Repertoire of porcine MikroRNAs in adult ovary and testis by deep sequencing. *Int J Biol Sci*. 2011; 7: 1045-55.
- Liu WM, Pang RT, Cheong AW ve diğ. Involvement of MikroRNA lethal-7a in the regulation of embryo implantation in mice. *PLoS One*. 2012; 7: 37039.

- Liu WM, Pang RT, Chiu PC ve diğ. Sperm-borne MikroRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 490-4.
- Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G ve diğ. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of MikroRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*. 2007; 110: 1330-3.
- Long J, Jiang C, Liu B ve diğ. MikroRNA-15a-5p suppresses cancer proliferation and division in human hepatocellular carcinoma by targeting BDNF. *Tumor Biology*. 2016; 37: 5821-28, (doi:10.1007/s13277-015-4427-6).
- Lu J, Getz G, Miska EA ve diğ. MikroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435: 834-8.
- Luense LJ, Carletti MZ, Christenson LK. Role of Dicer in female fertility. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20: 265-72.
- Ma J, Flemr M, Stein P ve diğ. MikroRNA activity is suppressed in mouse oocytes. *Curr Biol*. 2010; 20: 265-70.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by MikroRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007; 449: 682-8.
- Ma N, Wang X, Qiao Y ve diğ. Coexpression of an intronic MikroRNA and its host gene reveals a potential role for miR-483-5p as an IGF2 partner. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011; 333: 96-101, (doi:10.1016/j.mce.2010.11.027).
- Maalouf SW, Liu WS, Pate JL. MikroRNA in ovarian function. *Cell Tissue Res*. 2016; 363: 7-18, (Doi: 10.1007/s00441-015-2307-4).
- Maalouf SW, Liu W-S, Albert I ve diğ. Regulating life or death: potential role of MikroRNA in rescue of the corpus luteum. *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 398: 78-88.
- Mattiske DM, Han L, Mann JR. Meiotic maturation failure induced by DICER1 deficiency is derived from primary oocyte ooplasm. *Reproduction*. 2009; 137: 625-32.
- McBride D, Carré W, Sontakke SD ve diğ. Identification of miRNAs associated with the follicular-luteal transition in the ruminant ovary. *Reproduction*. 2012; 144: 221-33.
- McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst MikroRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril*. 2010; 93: 2374-82.
- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000; 21: 200-14.
- McKAY DG, Hertig AT, Adams EC ve diğ. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec*. 1953; 117(2): 201-19.
- McReynolds S, Dzieciatkowska M, McCallie BR ve diğ. Impact of maternal aging on the molecular signature of human cumulus cells. *Fertil Steril*. 2012; 98(6): 1574-80.
- Merchant-Larios H, Centeno B. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. *Prog Clin Biol Res*. 1981, 59: 383-92.
- Mishima T, Takizawa T, Luo SS ve diğ. MikroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary. *Reproduction* 2008;136:811–22.
- Mishra PJ, Humeniuk R. MikroRNA polymorphisms. 2013.

- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM ve diğ. Circulating MikroRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 10513-8.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM ve diğ. Circulating MikroRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 10513-8.
- Montazerian M, Yasari F, Aghaalikhani N. Ovarian extracellular MikroRNAs as the potential non-invasive biomarkers: An update. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 106: 1633-40.
- Moody ve diğ. Fertility assessment and treatment for people with fertility problems. RCOG clinical guidelines NICE, 2004.
- Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi (8. Bakı). Çev. Ed. Hakkı Dalçık, Mehmet Yıldırım, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2009.
- Moreno-Moya JM, Vilella F, Simon C. Simon, M.D., Ph.D., MikroRNA: key gene expression regulators. *Fertility and Sterility*. 2014; 101(6): 1516-23.
- Mudduluru G, George-William JN, Muppala S ve diğ. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Biosci Rep*. 2011; 31: 185-97.
- Murchison EP, Stein P, Xuan Z ve diğ. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev*. 2007; 21: 682-93.
- Murchison EP, Stein P, Xuan Z ve diğ. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes and Development*. 2007; 21: 682-93, (doi:10.1101/gad.1521307).
- Nagaraja AK, Andreu-Vieyra C, Franco HL ve diğ. Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol Endocrinol*. 2008; 22: 2336-52.
- Nahirney PC, Ovale WK. Netter Temel Histoloji. Çev. Ed. Sevda Müftüoğlu, Figen Kaymaz, Pergin Atilla, Günes Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009.
- Najil M, Aleyasin A, Nekoonam S ve diğ. Differential Expression of miR- 93 and miR-21 in Granulosa Cells and Follicular Fluid of Polycystic Ovary Syndrome Associating with Different Phenotypes. *SClenTIFIC Reports*. 2017; 7: 14671, (Doi:10.1038/s41598-017-13250-1).
- Nelson PT, Wang WX, Rajeev BW. MikroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol*. 2008; 18: 130-8.
- Nicholson RH, Nicholson AW. Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm Genome*. 2002; 13: 67-73.
- Nie M, Yu S, Peng S ve diğ. miR-23a and miR-27a promote human granulosa cell apoptosis by targeting SMAD5. *Biol Reprod*. 2015; 93: 98.
- Noferesti SS, Sohel MMH, Hoelker M ve diğ. Controlled ovarian hyperstimulation induced changes in the expression of circulatory miRNA in bovine follicular fluid and blood plasma. *J Ovarian Res*. 2015; 8(1): 81.
- Norman RJ, Dewailly D, Legro RS ve diğ. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2007; 370: 685-97.
- Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*. 2009; 137(3): 571-84.
- Ohnishi Y, Totoki Y, Toyoda A ve diğ. Small RNA class transition from siRNA/piRNA to miRNA during pre-implantation mouse development. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38: 5141-51.
- Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci*. 2008, 1127: 1-9.

- Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod.* 2010; 25(12): 2944-54.
- Ono K, Kuwabara Y, Han J. MikroRNAs and cardiovascular diseases. *FEBS J.* 2011; 278: 1619-33.
- Otsuka M, Zheng M, Hayashi M ve diğ. Impaired MikroRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest.* 2008; 118: 1944-54.
- Ozsolak F, Poling LL, Wang Z ve diğ. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 2008; 22: 3172-83.
- Pacella L, Zander-Fox DL, Armstrong DT ve diğ. Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment. *Fertil Steril.* 2012; 98(4): 986-94.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM ve diğ. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science.* 1995; 269(5224): 682-5.
- Pan HL, Wen ZS, Huang YC ve diğ. Down-regulation of MikroRNA-144 in air pollution-related lung cancer. *Sci Rep.* 2015; 5: 14331, (Doi:10.1038/srep14331).
- Pang RT, Liu WM, Leung CO ve diğ. miR-135A regulates preimplantation embryo development through down-regulation of E3 Ubiquitin Ligase Seven In Absentia Homolog 1A (SIAH1A) expression. *PLoS One.* 2011; 6: 27878.
- Pangas SA, Rajkovic A. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Hum Reprod Update.* 2006; 12: 65-76.
- Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive Mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 10159-62.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F ve diğ. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000; 408: 86-9.
- Pastorelli LM, Wells S, Fray M ve diğ. Genetic analyses reveal a requirement for Dicer1 in the mouse urogenital tract. *Mamm Genome.* 2009; 20: 140-51.
- Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M ve diğ. Identification of MikroRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods.* 2005; 2: 269-76.
- Pollard T, Earnshaw W, Lippincott-Schwartz J ve diğ. Cell biology (2. Baskı). Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2008.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertility and Sterility.* 2015; 103(3): 9-17.
- Qin Y, Choi Y, Zhao H ve diğ. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 576-81.
- Rah H, Jeon YJ, Shim SH ve diğ. Association of miR-146aC > G, miR-196a2T > C, and miR-499A > G polymorphisms with risk of premature ovarian failure in Korean women. *Reprod Sci.* 2013; 20: 60-8.
- Rajareddy S, Reddy P, Du C ve diğ. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol.* 2007; 21(9): 2189-202.
- Ramachandra RK, Salem M, Gahr S ve diğ. Cloning and characterization of MikroRNAs from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Their expression during early embryonic development. *BMC Dev Biol.* 2008; 8: 41.

- Revelli A, Delle Piane L, Casano S ve diğ. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7(1): 40.
- Ribas J, Lupold SE. The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer. *Cell Cycle*. 2010; 9: 923-9.
- Ro S, Song R, Park C ve diğ. Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary. *RNA*. 2007; 13: 2366-80.
- Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AE ve diğ. MikroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil Steril*. 2013; 99: 855-61.
- Ross HS, Histology: A Text and Atlas. Female Reproductive System (4. baskı). PA: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003.
- Roth LW, McCallie B, Alvero R ve diğ. Altered MikroRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31: 355-62.
- Saadat P, Slater CC, Jain JK ve diğ. Treatment-associated serum FSH levels in very poor responders to ovarian stimulation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2003; 20: 395-9, (doi:10.1023/A:1026280508821).
- Sadler TW. Medikal Embriyoloji. Langman's Medical Embryology (9. Baskı). Çev. Başaklar Can, Palme Yayıncılık, Ankara, 2005.
- Sahni V, Mukhopadhyay A, Tysseling V ve diğ. BMPR1a and BMPR1b signaling exert opposing effects on gliosis after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2010; 30: 1839-55.
- Saitou M, Barton SC, Surani MA, A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*. 2002; 418(6895): 293-300.
- Sang Q, Yao Z, Wang H ve diğ. Identification of MikroRNAs in human follicular fluid: characterization of MikroRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J. Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(7): 3068-79.
- Santonocito M, Vento M, Guglielmino MR ve diğ. Molecular characterization of exosomes and their MikroRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal MikroRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril*. 2014; 102(6): 1751-61.
- Scharer CD, McCabe CD, Ali-Seyed M ve diğ. Genome-wide promoter analysis of the SOX4 transcriptional network in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2009; 69: 709-17.
- Schier AF. The maternal-zygotic transition: Death and birth of RNAs. *Science*. 2007; 316: 406-7.
- Schmidt J, Weijdegard B, Mikkelsen AL ve diğ. Differential expression of inflammation-related genes in the ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women. *Mol Hum Reprod*. 2014; 20: 49-58.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T ve diğ. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003; 115: 199-208.
- Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans*. 2009; 37: 918-25.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999; 13(12): 1501-12.
- Sicari BM, Troxell R, Salim F ve diğ. c-myc and skp2 coordinate p27 degradation, vascular smooth muscle proliferation, and neointima formation induced by the parathyroid hormone-related protein. *Endocrinology*. 2012; 153(2): 861-72.

Sicinski P, Donaher JL, Parker SB ve diğ. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell*. 1995; 82(4): 621-30.

Sicinski P, Donaher JL, Parker SB ve diğ. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*. 1996; 384(6608): 470-4.

Singh PK, Singh AV, Chauhan DS. Current understanding on MikroRNAs and its regulation in response to Mycobacterial infections. *J Biomed Sci*. 2013; 20: 14.

Smalheiser NR. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol Direct*. 2007; 2: 35.

Sobinoff AP, Pye V, Nixon B ve diğ. Adding insult to injury: effects of xenobiotic-induced preantral ovotoxicity on ovarian development and oocyte fusibility. *Toxicol Sci*. 2010; 118: 653-66.

Song T, Zhang X, Yang G ve diğ. Decrement of miR-199a- 5p contributes to the tumorigenesis of bladder urothelial carcinoma by regulating MLK3/NF-kappaB pathway. *American Journal of Translational Research*. 2015; 7: 2786-94.

Speroff L, Fritz AM. Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite (7. Baskı). Çev. Ed. Serdar Günalp, Ahmet Erk, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2007.

Spicer LJ. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol Reprod*. 2004; 70: 1223-30.

Su AI, Cooke MP, Ching KA ve diğ. Largescale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 4465-70.

Su RW, Lei W, Liu JL ve diğ. The integrative analysis of MikroRNA and mRNA expression in mouse uterus under delayed implantation and activation. *PLoS One*. 2010; 5: 15513.

Suh N, Baehner L, Moltzahn F ve diğ. MikroRNA function is globally suppressed in Mouse oocytes and early embryos. *Curr Biol*. 2010; 20: 271-7.

Suh N, Belloch R. Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development*. 2011; 138: 1653-61.

Sullivan EA, Zegers-Hochschild F, Mansour R ve diğ. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2004. *Hum Reprod*. 2013; 25(5): 1375-90.

Sun J, Shi R, Zhao S ve diğ. E2F8, a direct target of miR-144, promotes papillary thyroid cancer progression via regulating cell cycle. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017; 36(1): 40, (Doi:10.1186/s13046-017-0504-6).

Sung JH, Kim SH, Yang WI ve diğ. miRNA polymorphisms (miR146a, miR149, miR196a2 and miR499) are associated with the risk of coronary artery disease. *Mol Med Rep*. 2016; 14: 2328-42.

Suzuki Y, Kim HW, Ashraf M ve diğ. Diazoxide potentiates mesenchymal stem cell survival via NF-kappaB-dependent miR-146a expression by targeting Fas. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299: 1077-82.

Tang F, Kaneda M, O'Carroll D ve diğ. Maternal MikroRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev*. 2007; 21: 644-8.

Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Antıp A.Ş. yayınları, Ankara, 2002.

Tripurani SK, Lee KB, Wee G ve diğ. MikroRNA-196a regulates bovine newborn ovary homeobox gene (NOBOX) expression during early embryogenesis. *BMC Dev Biol*. 2011; 11: 25.

Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S ve diğ. MikroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.* 2006; 66: 9090-8.

Uğur AS. İnfertilite tedavisi alan kadınlarda üreme problemlerinin fiziksel, duygusal, sosyal ve ilişkisel yaşam alanlarına etkisi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Bilim Üniversitesi, 2014.

Ulusoy S. Adneksiyal kitlelerin malign-benign ayrımında malignansi riski endeksi (Rmı)'Nin prospektif araştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Araştırma ve Eğitim Hastanesi, 2005.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A ve diğ. Exosome-mediated transfer of mRNAs and MikroRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology.* 2007; 9: 654-9, (doi:10.1038/ncb1596).

van Rooij E, Sutherland LB, Qi X ve diğ. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a MikroRNA. *Science.* 2007; 316: 575-9.

Velu CS, Baktula AM, Grimes HL. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood.* 2009; 113: 4720-8.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM ve diğ. Micro-RNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by highdensity lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011; 13: 423-33.

Viswanathan SR, Mermel CH, Lu J ve diğ. MikroRNA expression during trophoctoderm specification. *PLoS One.* 2009; 4: 6143.

Wang J, Song Y, Zhang Y ve diğ. Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice. *Cell Res.* 2012; 22: 516-27.

Wang JF, Yu ML, Yu G ve diğ. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 394: 184-8.

Wang WT, Zhao YN, Han BW ve diğ. Circulating MikroRNAs identified in a genome-wide serum MikroRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98: 281-9.

Wang Y, Medvid R, Melton C ve diğ. DGCR8 is essential for MikroRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet.* 2007; 39: 380-5.

Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A ve diğ. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature.* 2008; 453: 539-43.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S ve diğ. The MikroRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010; 56: 1733-41.

Weghofer A, Margreiter M, Bassim S ve diğ. Minimal stimulation using recombinant follicle-stimulating hormone and a gonadotropin-releasing hormone antagonist in women of advanced age. *Fertility and Sterility.* 2004; 81: 1002-6, (doi:10.1016/j.fertnstert.2003.09.050).

Weimin Liu, Ziru Niu, Qian Li ve diğ. MikroRNA and Embryo Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2016; 75: 263-71.

Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science.* 1991; 254(5035): 1138-46.

Welt CK, Taylor AE, Fox J ve diğ. Follicular arrest in polycystic ovary syndrome is associated with deficient inhibin A and B biosynthesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005; 90: 5582-7.

Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM ve diğ. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 2584-95.

- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993; 75: 855-62.
- Williams BO, Schmitt EM, Remington L ve diğ. Extensive contribution of Rb-deficient cells to adult chimeric mice with limited histopathological consequences. *EMBO J*. 1994; 13(18): 4251-9.
- Wright EC, Hale BJ, Yang CX ve diğ. MikroRNA-21 and PDCD4 expression during in vitro oocyte maturation in pigs. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2016; 14: 21, (Doi: 10.1186/s12958-016-0152-2).
- Xia HF, Jin XH, Cao ZF ve diğ. MikroRNA expression and regulation in the uterus during embryo implantation in rat. *FEBS J*. 2014; 281: 1872-91.
- Xingwang Li, Min Xu, Li Ding ve diğ. MiR-27a: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target in Tumors. *Journal of Cancer*. 2019; 10(12): 2836-48.
- Yang CX, Du ZQ, Wright EC ve diğ. Small RNA profile of the cumulus oocyte complex and early embryos in the pig. *Biol Reprod*. 2012; 87(5): 117.
- Yang M, Lin L, Sha C. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-144-5p improves rat ovarian function after chemotherapy-induced ovarian failure by targeting PTEN. *Laboratory Investigation*. 2019, (Doi: [10.1038/s41374-019-0321-y](https://doi.org/10.1038/s41374-019-0321-y)).
- Yang Q, Lu J, Wang S ve diğ. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating MikroRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clin Chim Acta* .2011; 412: 2167-73.
- Yang X, Zhou Y, Peng S ve diğ. Differentially expressed plasma MikroRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis. *Reproduction*. 2012; 144: 235-44.
- Yang Y, Bai W, Zhang L ve diğ. Determination of MikroRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Dev Dyn*. 2008; 237: 2315-27.
- Yi R, Qin Y, Macara IG ve diğ. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-MikroRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003; 17: 3011-6.
- Yin Y, Cai J, Meng F ve diğ. MiR-144 suppresses proliferation, invasion, and migration of breast cancer cells through inhibiting CEP55. *Cancer Biology & Therapy*. 2018; 19(4): 306-15, (Doi: 10.1080/15384047.2017.1416934).
- Ying Y, Qi X, Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(14): 7858-62.
- Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol*. 2001; 232(2): 484-92.
- Yu Y, Yin W, Yu ZH ve diğ. miR-190 enhances endocrine therapy sensitivity by regulating SOX9 expression in breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019; 38: 22, (Doi: [10.1186/s13046-019-1039-9](https://doi.org/10.1186/s13046-019-1039-9)).
- Yuan A, Farber EL, Rapoport AL ve diğ. Transfer of MikroRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS ONE*. 2009; 4: 4722, (doi:10.1371/journal.pone.0004722).
- Yujie D. MikroRNA-22-3p is down-regulated in the plasma of Han Chinese patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2015; 103: 802-7.

Zhang B, Pan X, Cobb GP ve diğ. MikroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007; 302: 1-12.

Zhang K, Zhong W, Li WP ve diğ. miR-15a-5p levels correlate with poor ovarian response in human follicular fluid. *Society for Reproduction and Fertility.* 2017; 154(4): 483-96, (Doi: 10.1530/REP-17-0157 ISSN 1470–1626).

Zhao Z, Zhao Q, Warrick J ve diğ. Circulating MikroRNA miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy. *Clin Chem.* 2012; 58: 896-905.

Zheng H, Liu JY, Song FJ ve diğ. Advances in circulating MikroRNAs as diagnostic and prognostic markers for ovarian cancer. *Cancer Biol Med.* 2013; 10: 123-30.

Zhu L, Li J, Xing N ve diğ. American ginseng regulates gene expression to protect against premature ovarian failure in rats. *BioMed Res Int.* 2015; 2015: 767124.



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı :Gözde KAYA

Doğum Yeri ve Tar : Ankara/ 23.08.1986

Uyruğu :T.C.

Medeni Durumu :Evli

Çalıştığı Kurum : Anadolu Sağlık Merkezi Tüp Bebek Ünitesi

İletişim Adresi ve Telefonu: Johns Hopkins Anadolu Sağlık Merkezi Tüp Bebek Ünitesi
Gebze/ KOCAELİ - 02626785241

Eğitimi

2012-2019	Doktora	Kocaeli Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serdar FİLİZ
2009-2012	Yüksek Lisans	Kocaeli Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serdar FİLİZ
2004-2008	Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi –Fen Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü
2003-2004	İngilizce Hazırlık	Karadeniz Teknik Üniversitesi

Yabancı Dili : İngilizce

Unvanları : Uzman Biyolog /Embriyolog (2013-halen)

Mesleki Deneyimi

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler	1
1.Sequential Transfer of Day 2/3 Embriyos versus Cleavage Stage Double Embryo Transfer: The Impact on Clinical Pregnancy Rates, Gozde Kaya , Begum Alyuruk, Ozge Senem Yucel Cicek, Sule Yildirim Kopuk, Ahmet Yigit Çakiroglu, Emek Doger, Serdar Filiz, Asian Pacific Journal of Reproduction. (29.12.19-Kabul edildi).	
Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar	9
1.Agmatinin Travmatik Beyin Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi, Hale Z Toklu, Mehmet Erşahin, Yusufhan Yazır, Salih Gümrü, Gözde Yazıcıoğlu , Feyza Arıcıoğlu, Türk Nöroloji Dergisi 2010;16 (Ek 1): 129-245	
2.Sağlık Bilimlerinde Yaşam Boyu Eğitim ve Öğrenim, Melda Yardımoğlu, Gözde Yazıcıoğlu , Elif Gelenli, III.International Congress of Educational Research, PP:346, 4-7 May 2011	
3.Male İnfertility Correlation with Numerical Chromosome Abnormality, Ö. Budak, G. Yazıcıoğlu , S.Kurnaz, B. Doğruoğlu, P. Coştur Filiz, B. Vural, S. Filiz, Ovarian Club III November 14-16, 2013	
4.The Effect of Sequential Embriyo Transfer Comparing with Double Embriyo Transfer in Patients with Repeted Implantation Failure and/or ≥ 35 Age, G. Yazıcıoğlu , Ö. Budak, Y. Cakiroglu, E. Doger, S. Ozdemir Ozkan, P. Coştur Filiz, B. Vural, S. Filiz, Ovarian Club III November 14-16, 2013	
5.Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients, Özcan Budak, Gözde Yazıcıoğlu , Sema Kurnaz, Ahmet Yiğit Çakiroğlu, Emek Doğer, Serdar Filiz, PP-043,10th Biennial Conference of Alpha, Scientists in Reproductive Medicine 9th-11th May 2014	
6.The association between male age and fertilization/pregnancies rate in severely oligoasthenozoospermic patients, Gozde Yazıcıoğlu , Özcan Budak, Ahmet Yiğit Cakiroglu, Emek Doğer, Sebiha Özdemir Özkan, Serdar Filiz, PP-050, 10th Biennial	

Conference of Alpha, Scientists in Reproductive Medicine 9th-11th May 2014

7. Azalmış Over Rezervi Hastalarında Kadın Yaşının ICSI Sikluslarında Gebelik Oranları Üzerine Etkisi, **Kaya G.**, Alyürük B., Çakıroğlu Y., Doğer E., Özdemir Özkan S., Filiz S., 5. Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Derneği Kongresi, 28-31 Ekim 2015

8. The impact of embryo transfer catheter retraction rate on fertility outcomes in intracytoplasmic sperm injection cycles: a randomized controlled trial, B. Devranoglu, Ö. Özdamar, **G. Kaya**, E. Doğer, S. Selçuk, M. Küçükbaş, Y. Çakıroğlu, T. Kutlu, Abstracts of the 32nd Annual Meeting of ESHRE, Helsinki, Finland, 3 July – 6 July, 2016

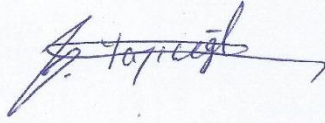
9. Vücut Kitle İndekslerine Göre Gruplandırılan Kadın IVF Hasta Gruplarında Granüloza Hücrelerinde Adiponektin ve Tümör Nekroz Faktör- Alfa (TNF α) İmmünreaktivitesinin İncelenmesi ve Gebelik Durumu İle İlişkisinin Araştırılması, Elif Gelenli Dolanbay, Melda Yardımoğlu Yılmaz, Birol Vural, Murat Kasap, **Gözde Yazıcıoğlu Kaya**, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 10-13 Mayıs 2018

Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

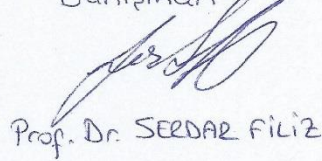
- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen şekilde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun şekilde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Romen rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde yazıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde yazıldı.
- Ana metin satır aralığı 1,5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar alfabetik sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.
- Lisansüstü eğitim sırasında yapmış olduğu yayınlar ve bildiriler eklendi.
- Teze ait intihal raporu eklendi.

Tez Yazarı



GÖZDE KAYA

Danışman



Prof. Dr. SERDAR FİLİZ