



***İN VİTRO* FERTİLİZASYON (IVF) HASTALARININ KÜMÜLÜS
HÜCRELERİNDE OKSİDAN/ANTIOKSİDAN PARAMETRE
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Rabia TURAL

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

10/09/2021

Rabia TURAL

İN VİTRO FERTİLİZASYON (IVF) HASTALARININ KÜMÜLÜS HÜCRELERİNDE OKSİDAN/ANTIOKSİDAN PARAMETRE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Rabia TURAL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül, 2021

ÖZET

Üreme sağlığı sektöründe büyük ilerlemelere rağmen, infertilite en önemli üreme sağlığı sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Başlıca infertilite nedenleri arasında tubal faktör, endometriozis, servikal faktör, pelvik adhezyon, erkek faktör ve açıklanamayan infertilite sayılmaktadır. Bununla birlikte yaş, çevresel faktörler, stres, yaşam tarzı, vücut kitle indeksi (VKİ), hormonal ve patofizyolojik faktörler de infertilite nedenleri arasındadır. Yaş artışıyla birlikte reaktif oksijen türleri (ROT) ve antioksidanlar arasındaki dengenin, ROT lehine bozulması düşük oosit kalitesinin bir nedeni olarak görülmekte ve bu durum *in vitro* fertilizasyon (IVF) ile infertilite tedavisini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, oksidan/antioksidan parametrelerin, oosit sayısının ve kalitesinin belirlenmesi açısından prediktif bir değerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. IVF tedavisi gören düşük yanıt veren, normal yanıt veren ve yüksek yanıt veren hasta gruplarında katalaz (CAT), glutatyon-s-transferaz (GST), arilesteraz (ARE) enzim aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) düzeyleri kümülüs hücrelerinde analiz edilmiştir. Düşük yanıt veren ve normal yanıt veren gruplarına göre yüksek yanıt veren grubunda kümülüs hücresi GST enzim aktivitesi düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Düşük yanıt veren grubuna göre yüksek yanıt veren grubunda kümülüs hücresi MDA düzeyleri anlamlı bir şekilde azalmıştır. Kümülüs hücresi CAT ve ARE enzim aktiviteleri açısından bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yüksek yanıt veren grubunda GST enzim aktivitesindeki anlamlı artış ve MDA düzeylerindeki anlamlı azalma oksidatif stresin oosit sayısı ve kalitesi üzerine etkili olduğunu düşündürmektedir.

Bilim Kodu : 1010

Anahtar Kelimeler : *İn vitro* fertilizasyon, kümülüs hücresi, katalaz, glutatyon-s-transferaz, arilesteraz, malondialdehit

Sayfa Adedi : 98

Danışman : Doç. Dr. Cengiz KARAKAYA

INVESTIGATION OF OXIDANT/ANTIOXIDANT PARAMETER STATUS IN
CUMULUS CELLS OF *IN VITRO* FERTILIZATION (IVF) PATIENTS

(Ph. D. Thesis)

Rabia TURAL

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

September, 2021

ABSTRACT

Despite great advances in the reproductive health sector, infertility continues to be one of the most important reproductive health problems. Tubal factor, endometriosis, cervical factor, pelvic adhesion, male factor and unexplained infertility are among the main causes of infertility. However, age, environmental factors, stress, lifestyle, body mass index (BMI), hormonal and pathophysiological factors are also among the causes of infertility. The deterioration of the balance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidants in favor of ROS with increasing age is seen as a cause of low oocyte quality, and this situation negatively affects infertility treatment with *in vitro* fertilization (IVF). In line with this information, our study aimed to investigate whether oxidant/antioxidant parameters have a predictive value in terms of determining the number and quality of oocyte. Catalase (CAT), glutathione-s-transferase (GST), arylesterase (ARE) enzyme activities and malondialdehyde (MDA) levels were analyzed in cumulus cells in IVF-treated poor responder, normo responder, and high-responder patient groups. Cumulus cell GST enzyme activity levels increased in a statistically significant way in the high responder group compared to the poor responder and normo responder groups. Cumulus cell MDA levels were significantly decreased in the high responder group compared to the poor responder group. Regarding the cumulus cell CAT and ARE enzyme activity, there was no statistically significant difference between the groups. Significant increase in GST enzyme activity and significant decrease in MDA levels in the high responder group suggest that oxidative stress has an effect on oocyte count and quality.

Science Code : 1010
Key Words : *In vitro* fertilization, cumulus cell, catalase, glutathione-s transferase, arylesterase, malondialdehyde
Page Number : 98
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Cengiz KARAKAYA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her türlü bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışmanı hocam Doç. Dr. Cengiz KARAKAYA'ya, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU'ya, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Neslihan BUKAN'a, çalışmayı birlikte yürüttüğümüz Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet ERDEM'e ve Prof. Dr. Recep Onur KARABACAK'a eğitimimde emeği geçen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı'ndaki değerli hocalarımla her birine, çalışmamız sırasında her türlü yardımda bulunan Uzm. Biyolog Zeynep AYKOL'a, tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma, bu süreçte her zaman yanımda olan aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite.....	3
2.1.1. Başlıca infertilite nedenleri.....	4
2.1.2. Yardımcı üreme teknikleri.....	6
2.2. Ovaryumlar, Oogenez ve Folikülogenez.....	9
2.2.1. Ovaryumların anatomisi ve görevleri.....	9
2.2.2. Oogenez.....	10
2.2.3. Folikülogenez	11
2.2.4. Ovulasyon.....	15
2.2.5. Oosit, kümülüs hücreleri ve folikül sıvısı.....	16
2.2.6. Kümülüs hücrelerinin genişlemesi	20
2.2.7. Oosit gelişiminde vaskülaritenin rolü.....	21
2.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller	21
2.3.1. Reaktif oksijen türleri kaynakları	23
2.3.2. Reaktif oksijen türlerinin hücredeki etkileri.....	24
2.4. Antioksidanlar	28

Sayfa

2.4.1. Katalaz	29
2.4.2. Glutasyon-s-transferazlar	31
2.4.3. Arilesteraz.....	33
2.5. Malondialdehit	35
2.6. Oksidatif Stres	37
2.6.1. Oksidatif stres ve yardımcı üreme teknikleri.....	37
2.6.2. Oksidatif stres, oosit ve kümülüs hücreleri	38
2.6.3. Oksidatif stres ve kadın üreme sistemine etkisi	39
2.6.4. Oksidatif stres ve üreme hastalıkları	41
2.6.5. Oksidatif stres ve doğurganlığı etkileyen diğer faktörler	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1. Hasta Seçimi.....	51
3.2. Örnek Toplanması	51
3.3. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Laboratuvar Malzemeleri.....	52
3.4. Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemeler	53
3.5. Biyokimyasal Analizler.....	53
3.5.1. Katalaz enzim aktivite tayini	53
3.5.2. Glutasyon-s-transferaz enzim aktivite tayini	53
3.5.3. Arilesteraz enzim aktivite tayini.....	54
3.5.4. Malondialdehit tayini.....	54
3.6. İstatistiksel Analiz	55
4. BULGULAR	57
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ	75
KAYNAKLAR	77

Sayfa

EKLER.....	95
Ek-1. Gazi üniversitesi klinik araştırmalar etik kurulu değerlendirme formu	96
ÖZGEÇMİŞ.....	98



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Grupların yaş ve VKİ düzeyleri.....	57
Çizelge 4.2. Grupların CAT, GST, ARE enzim aktivitesi ve MDA konsantrasyon düzeyleri.....	58



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Folikülogenez	15
Şekil 2.2. Antral folikülün şematik gösterimi	19
Şekil 2.3. Oksidatif denge	25
Şekil 4.1. Grupların CAT enzim aktivite düzeyleri ($p=0,175$)	59
Şekil 4.2. Grupların GST enzim aktivite düzeyleri.....	60
Şekil 4.3. Grupların ARE enzim aktivite düzeyleri	61
Şekil 4.4. Grupların MDA konsantrasyon düzeyleri	62
Şekil 4.5. Grupların yaş-CAT enzim aktivite ilişkisi dağılım/nokta (scatter/dot) grafiği ...	64
Şekil 4.6. Grupların yaş-GST enzim aktivite ilişkisi dağılım/nokta (scatter/dot) grafiği	65
Şekil 4.7. Grupların yaş-ARE enzim aktivite ilişkisi dağılım/nokta (scatter/dot) grafiği ...	66
Şekil 4.8. Grupların yaş-MDA konsantrasyonu ilişkisi dağılım/nokta (scatter/dot) grafiği	67

RESİMLERİN LİSTESİ**Resim****Sayfa**

Resim 2.1. Oosit ve kümülüs hücreleri	17
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
cm	Santimetre
Cu	Bakır
Fe	Demir
IU	İnternasyonal ünite
kg	Kilogram
L	Litre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar	Açıklamalar
ΔA	Delta Absorbans
¹ O ₂	Singlet Oksijen
4-HNE	4-Hidroksinonenal
8-OHdG	8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
8-oksoG	7,8-Dihidro-8-Oksoguanozin
ADAMTS-1	Trombospondin Tip 1 Motifli Bir Disintegrin-Benzeri ve Metalloproteinaz
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri

Kısaltmalar	Açıklamalar
AMH	Anti-Müllerian Hormonu
APO A1	Apolipoprotein A1
APO J	Apolipoprotein J
ARE	Arilesteraz
ATP	Adenozin Trifosfat
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BMI	Body Mass Index
BMP-15	Kemik Morfogenetik Protein-15
BMP4	Kemik Morfogenetik Protein 4
BMP-7	Kemik Morfogenetik Protein-7
CaCl₂.2H₂O	Kalsiyum Klorid Dihidrat
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	Katalaz
CDNB	1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
DAG	Diaçilgliserol
DK	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNPG	S-2,4-Dinitrofenilglutasyon
E2	Östradiol
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ETZ	Elektron Transport Zinciri
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GDF-9	Büyüme Farklılaşma Faktörü-9
Gn	Gonadotropin
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GR	Glutasyon Redüktaz
GS⁻	Tiyolat Anyonu
GSH	İndirgenmiş (Redükte) Glutasyon

Kısaltmalar	Açıklamalar
GSSG	Glutatyon Disülfit (Oksitlenmiş Glutatyon)
GST	Glutatyon-S-Transferaz
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropini
HCl	Hidroklorik Asit
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
hMG	İnsan Menopozal Gonadotropin
HNO₂	Nitroz Asid
HO[•]₂	Hidroperoksil Radikali
HOBr	Hipobromöz Asit
HOCl	Hipoklorik Asit
IL-1	İnterlökin-1
IUI	İntra-Uterin İnseminasyon
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
KH₂PO₄	Monopotasyum Fosfat
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LH	Lüteinleştirici Hormon
LIF	Lösemi İnhibe Edici Faktör
LOO[•]	Lipid Peroksi Radikali
LOOH	Lipid Hidroperoksit
M	Molar
MDA	Malondialdehid
mtDNA	Mitokondriyal Deoksiribonükleik Asit
mTORC	Rapamisin Kompleksinin Memeli Hedefi
N₂O₃	Dinitrojen Trioksit
N₂O₄	Dinitrojen Tetraoksit
Na₂HPO₄. 2H₂O	Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat
NaCl	Sodyum Klorür
NADPH	İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotidfosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NK	Natural Killer

Kısaltmalar	Açıklamalar
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO⁻	Nitroksil Anyonu
NO⁺	Nitrozil Katyonu
NO[•]	Nitrik Oksit (Azot Monoksit)
NO₂	Azot Dioksit
NO₂⁺	Nitronyum (Nitril) Katyonu
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O₂	Oksijen Molekülü
O₂⁻	Süperoksit Radikali
O₃	Ozon
OH[•]	Hidroksil Radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
ONOOH	Peroksinitroz Asit
OPU	Oosit Toplama İşlemi
ORT	Ortalama
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PDGF	Trombosit Türevi Büyüme Faktörü
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PKOS	Polikistik Over Sendromu
PON	Paraoksonaz
PON1	Paraoksonaz1
R-CHO	Aldehitler
RNA	Ribonükleik Asit
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
RO[•]	Alkoksi Radikali
ROO[•]	Peroksil Radikali
ROOH	Organik Peroksitler
ROS	Reactive Oxygen Species
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SCF	Kök Hücre Faktörü
SHBG	Steroid Hormon Bağlayıcı Globulin
SOD	Süperoksit Dismutaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
SOD1	Süperoksid Dismutaz1
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
STD. SS.	Standart Sapma
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
TEP	1,1,3,3-Tetraetoksi Propan
TGF-α	Transforme Edici Büyüme Faktörü- α
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TSH	Tiroid Uyarıcı Hormon
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VKİ	Vücut Kitle İndeksi

1. GİRİŞ

İnfertilite, bir yıl düzenli korunmasız cinsel ilişkiden sonra doğal olarak gebe kalamama olarak tanımlanmaktadır [1]. Başlıca infertilite nedenleri arasında tubal faktör, endometriozis, servikal faktör, pelvik adhezyon, erkek faktör, açıklanamayan infertilite ve tek gen defekti sayılmaktadır [2]. İnfertil çiftlerin sağlıklı bir bebek sahibi olabilmesi için yardımcı üreme tekniklerinden faydalanılmaktadır. Yardımcı üreme teknikleri arasında en yaygın kullanılan yöntem olan IVF, infertil bireylerin çocuk sahibi olma şanslarını artırmaktadır. IVF'nin temel prensibi, laboratuvar ortamında bir tüp içerisinde oosit ve spermin bir araya getirilmesiyle fertilizasyonun kendiliğinden gerçekleşmesinin sağlanmasıdır. Embriyoların transfer edildiği dönem ve transfer edilen embriyo sayısı ve kalitesi IVF başarı oranlarını etkileyen faktörlerdendir [2,3].

Kümülüs hücreleri ve oosit birlikte, foliküler sıvı ile temas halinde antral folikülün içinde yer alan kümülüs-oosit kompleksini oluşturmaktadırlar. Folikül sıvısı, plazmadan kaynaklanan ve bir kümülüs-oosit kompleksi metaboliti kaynağı olan, küçük sinyal moleküllerini, proteinleri, ROT'u ve antioksidanları içeren plazma benzeri bir sıvıdır [4]. Kümülüs hücreleri oositin büyüme ve olgunlaşma süreçlerinde oositi oksidatif stres hasarından korumakta ve oositin metabolize edemediği substratlarla baş etme gibi önemli roller oynamaktadır [5, 6]. Fizyolojik süreçler sırasında sağlıklı foliküllerde üretilmekte olan ROT, oosit olgunlaşması için önemlidir. Temel rollerine rağmen, aşırı ROT üretimi foliküle zarar verebilmekte ve oosit olgunlaşmasını etkileyebilmektedir [4].

Yardımcı üreme tekniklerindeki büyük ilerlemelere rağmen, zayıf oosit kalitesi kadınlarda infertilite için bir sorun olmaya devam etmektedir. Oksidatif stresin ve antioksidanların oosit kalitesine etkisi ve kadın üreme işleviyle ilgili rolü son zamanlardaki araştırmalarda ilgi konusu olmuştur [7]. Kümülüs hücrelerinin oksidatif stres artışına neden olan koşullardan nasıl etkilendiğini ve bu durumun oosit kalitesine etkisini anlamanın infertilite yönetimi sırasında klinik kararları etkileyebileceği belirtilmektedir [8].

CAT, GST ve ARE enzimleri, organizmalarda oksidatif strese karşı savunmada etkili enzimatik antioksidanlar arasında yer almaktadır [9-11]. CAT, hücreleri hidrojen peroksit (H_2O_2)'in toksik etkilerinden koruyan bir enzimdir [9]. GST, indirgenmiş glutatyon (GSH)'un çok çeşitli substratlara konjugasyonunu katalize eden ve genellikle

detoksifikasyona neden olan bir enzim ailesidir [12]. Paraoksonaz (PON) enzimi, hem PON hem de ARE aktivitesine sahip olan bir ester hidrolazdır [13]. ARE aktivitesine sahip olan paraoksonaz1 (PON1)'in hem düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'i, hem de yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)'i oksidasyondan koruyarak oksidatif stresi azaltmada rol oynadığı ve embriyo gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir [14-16].

Lipid radikali, doymamış yağ asitlerinin allil grubundan bir hidrojenin çıkmasıyla oluşan ve organizmada en çok görülen ROT'dur [17]. ROT fazla miktarda olduğunda membrandaki lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak geçirgenliğin bozulmasına, dolayısıyla hücre içi iyon dengesizliğine neden olmaktadır [18]. MDA gibi tiyobarbütirik asid (TBA) reaktifleri lipid peroksitlerin en çok bilinen aldehit formu olup, araşidonik asidin oksijenasyonu ya da poliansature yağ asitlerinin enzimatik olmayan oksidatif yıkımı sonucu ortaya çıkmaktadır [19].

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, IVF tedavisi gören düşük yanıt veren, normal yanıt veren ve yüksek yanıt veren hastaların kümülüs hücrelerinde CAT, GST, ARE enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri analiz edilmiştir. Bu parametrelerin oosit sayısının ve kalitesinin belirlenmesi açısından prediktif bir değerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

Üreme canlıların türlerini yok olmaktan korudukları bir süreçtir. Erkeğin spermeleri önce kadının rahmine gelmekte, oradan fallop tüpüne girmekte ve sonrasında oosit ile birleşmektedir. Böylece döllenme gerçekleşmektedir. Bu şekilde oluşan zigot, mitoz yoluyla çoğalmaktadır [20].

İnfertilite, 1 yıl düzenli korunmasız cinsel ilişkiden sonra doğal olarak gebe kalamama olarak tanımlanmaktadır [21]. Primer infertilite, çocuk sahibi olmak isteyen, en az 12 ay birlikte olan ve doğum kontrol hapı kullanmayan kadınlar için canlı doğumun olmaması durumudur. Sekonder infertilite ise çocuk sahibi olmak isteyen, son canlı doğumdan sonra en az 12 ay birlikteliği olan ve doğum kontrol hapı kullanmayan kadınlar için canlı doğumun olmamasıdır [22].

Belirli bir dönemden sonra bir çocuğa sahip olamayan yani tipik bir çiftten daha az doğurgan olan çiftlerin bazen subfertil olduğu belirtilmektedir [22]. Çoğu zaman, infertilite, her 7 çiftten 1'inin gebe kalmak için uzman yardımına ihtiyaç duyduğu bir dereceye kadar subfertilitedir [21]. Her iki terim de, belirli bir süre sonra gebe kalamama olarak tanımlandığı için infertilite ve subfertilite terimleri çakışmaktadır [22]. Subfertilite primer veya sekonder olabilmektedir. Primer subfertilite, daha önce gebeliği olmayan bir çift için bir gecikmedir ve sekonder subfertilite, düşük ve ektopik gebelik gibi başarılı olmasa da, daha önce gebe kalmış bir çift için bir gecikmedir [21].

İnfertilite dünya çapında yaygın bir sorundur [22]. İnfertilite genellikle bir kadın sorunu olarak düşünülmektedir, ancak vakaların üçte biri düşük sperm sayısı gibi erkek problemlerinden kaynaklanmaktadır [20]. Çocuk sahibi olamama erkek infertilitesi, kadın infertilitesi veya kombine infertiliteye bağlı olarak oluşabilmektedir. İnfertilite vakalarının %20-30'u erkek infertilitesinden, %20-35'i kadın infertilitesinden ve %25-40'ı her iki kesimdeki problemlerden kaynaklanmaktadır. %10-20 olguda neden bilinmemektedir [22].

Kadın doğurganlığı 30 yaşından sonra azalmakta, 50 yaşından sonra ise nadiren görülmektedir [22].

2.1.1. Başlıca infertilite nedenleri

İnfertilite sebepleri hem erkek hem de kadınlarda bulunan eşit derecedeki sorunlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. İnfertil çiftlerin çoğunda başlıca üç ana neden; ovulasyon disfonksiyonu, tubal-peritoneal hastalık veya erkek faktörüdür [21].

Kadın infertilitesi

Kadın infertilitesinin en yaygın nedeni, genellikle seyrek veya yoksun adet dönemleri ile kendini gösteren ovulasyon problemleridir. Fallop tüplerindeki ya da uterustaki yapısal problemlere bağlı olarak oosit nakli veya implantasyonunda sorun yaşanmakta ve infertilite gelişmektedir [20,22].

Ovulasyon problemi endokrin bozukluklara, fiziksel bozukluklara ve ovaryum bozukluklarına, endometriozis gibi nedenlere bağlı olabilmektedir. Hipotalamus ve hipofiz bezinin fonksiyon bozukluklarına bağlı hiperprolaktinemi ovulasyonu önleyebilmektedir. Ayrıca, adrenal bezler ve tiroid bezleri gibi diğer endokrin bezlerin fonksiyonlarına bağlı olarak da ovulasyon gecikebilmektedir [21,22].

Pelvik inflamatuvar hastalık, gonore, peritonit, önceki tubal cerrahi ve fimbrial adezyonların ortaya çıkması tubal tıkanıklığa neden olabilmekte ve sonuç olarak oosit serbest bırakılamamaktadır. Karın ameliyatlarından sonra skar dokusunun varlığı, ovaryumların, fallop tüplerinin ve uterusun hareketini değiştirerek infertiliteye neden olabilmektedir. Servikal mukustaki travma, cerrahi, enfeksiyon, anti-sperm antikorları da gebeliği geciktirebilmektedir [21].

Endometriozis, endometriyal dokunun ovaryumlar, fallop tüpleri, vajina veya pelvise yerleşerek büyüdüğü bir durumu ifade etmekte ve infertiliteye neden olabilmektedir [23]. Bu implantlar, her adet döngüsünde büyümekte ve kabarcıklara ve skarlara dönüşen sıvı dolu kistler oluşturmaktadırlar. Bu skarlar daha sonra oositin geçişini engellemektedirler [21,22].

Korpus luteum progesteron üretmediğinde uterus astarı kalınlaşamamakta ve buna bağlı olarak döllenmiş oosit uterusu implante olamamakta, böylece infertilite görülebilmektedir. Konjenital anomali ve fibroidler de defektif implantasyona neden olabilmektedir [21].

Oositlerin ovaryum içinde sadece kısmen geliştiği ve fazla miktarda erkek hormonu salgılandığı polikistik over sendromu (PKOS) gibi oositlerin kendi malformasyonları gebe kalmayı zorlaştırabilmektedir [20,22]. PKOS infertiliteye ve pankreas tarafından büyük miktarlarda insülin üretilmesine neden olabilmektedir [20,21].

Önceden ektopik gebelik veya birden fazla düşük yapmak gibi jinekolojik problemler infertilite nedenleri arasındadır [20].

Kadınların gebe kalma şansını etkileyebilecek diğer faktörler arasında aşırı kilolu veya düşük kilolu olmak, aşırı egzersiz, sigara, stres, epilepsi, diyabet, Chlamydia, Mycoplasma genitalium enfeksiyonu, yaşın ilerlemesi, psikoseksüel problemlerin varlığı gibi durumlar yer almaktadır [20-23].

Erkek infertilitesi

Erkek infertilitesinin ana nedeni düşük semen kalitesidir. Düşük sperm sayısı veya kalitesi, sperm taşıyan tüplerle ilgili problemler, ereksiyon ve ejakülasyon problemleri başlıca erkek infertilitesi nedenleridir [20]. Bunların yanında, ilaçlar, radyasyon veya enfeksiyonlar, testis malformasyonu, inmemiş testis gibi testis bozuklukları, orşit veya kanal sisteminin tıkanması da infertilite nedenlerindendir [24]. Primer siliyer diskinezi, immotil sperm ile ilişkili infertiliteye neden olabilmektedir [25]. Seminal veziküllerin tıkanması veya seminal kanalların olmaması spermilerin hareketliliğini etkileyebilmekte ve böylece infertiliteye yol açabilmektedir [21].

Diyabet ve hipertiroidizm gibi endokrin bozukluklara bağlı, azospermi veya oositi dölleyemeyen hatalı spermilerin oluşumu, adenovirüs infertiliteye yol açabilmekte ya da anti-sperm antikorlarına bağlı immün infertilite oluşabilmektedir [21,22].

İlaç tedavisi, radyoterapi veya cerrahi tedavi görmüş olmak, aşırı kilolu olma, genetik nedenler, tutkallara, uçucu organik çözücülere veya silikonlara, kimyasal tozlara ve pestisitlere maruz kalma veya radyasyonla teması gerektiren işte çalışma gibi yaşam tarzı faktörleri infertilite nedenleri arasındadır [20,22].

2.1.2. Yardımcı üreme teknikleri

İnfertilite tedavisi, infertilitenin nedenine, infertil bireylerin yaşına, ne kadar süredir infertil olduklarına bağlı olarak uygulanmaktadır. Tedaviler, ilaç veya cerrahi yoluyla ya da gelişmiş üreme teknikleriyle yapılmaktadır. Bu ilaçlar tedavi amacına göre ovaryum folikülünü, ovulasyonu uyarmak için kullanılabilmektedir [20].

Yardımcı üreme teknikleri, gebeliğe yardımcı olmak için yapılabilecek bir dizi farklı tedaviyi tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Modern tıbbi teknoloji yoluyla infertilite problemlerini çözmede bir dereceye kadar etkili olmaktadır. İntra-uterin inseminasyon (IUI), IVF, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu, *in vitro* maturasyon ve vitrifikasyon dahil olmak üzere yardımcı üreme teknikleri olarak kabul edilen çeşitli tedaviler vardır [20,22].

IUI, yardımcı üreme tekniklerinin en basit biçimlerinden biridir. Açıklanamayan infertilitesi olan çiftler, minimal erkek faktörü infertilitesi ve servikal mukus problemi olan kadınlar için kullanılmaktadır. IUI; spermin toplanmasını, laboratuvar ortamında hazırlanmasını ve sonrasında ovulasyon zamanına yakın kadının rahmine yerleştirilmesini içermektedir. Başarı oranı, diğer yardımcı üreme tekniklerine kıyasla genellikle daha düşüktür [20].

IVF prosedürü, oosit ve sperminin laboratuvar ortamında birleştirilmesiyle gerçekleştirilmektedir [2,20].

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu tekniği, önceki IVF döngüleri sırasında düşük semen kalitesi, düşük sperm sayısı veya başarısız döllenme girişimleri sergilenen durumlarda kullanılmaktadır. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda döllenme vücut dışında gerçekleşmektedir. Bu işlem sırasında öncelikle oosit hücreleri toplanmakta ve laboratuvar ortamına aktarılmaktadır. Birkaç saat içinde, tek ve sağlıklı bir sperm, ince bir iğne ile olgun bir oosit hücrelerine enjekte edilmektedir. Döllenen embriyo daha sonra rahme aktarılmaktadır [20,22].

In vitro maturasyon'da, uyarıcı hormonların kullanılmadığı doğal bir döngü sırasında bir kadının ovaryumlarından olgunlaşmamış oositler toplanmakta ve 1-2 gün boyunca laboratuvar ortamında inkübatöre yerleştirilerek olgunlaştırılmaktadır. Yeterli olgunluğa

ulaşan oositlere döllenme için intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yapılmaktadır. Embriyolar k lt rlenmekte ve sonrasında kadının rahmine aktarılmaktadır [20].

Embriyo dondurma-  zd rme

Embriyo dondurma-  zd rme işlemiyle transfer edilmeyen embriyolar saklanmakta ve bu embriyoların mevcut olduğu bilindiği için çoğul gebeliklerin önüne geçilebilmektedir. Bu durum kümülatif bir gebelik oranı oluşturmakta ve hastaların IVF döngüsü başına gebe kalma şansını arttırmaktadır [2]. Olumlu etkilerinin yanı sıra, dondurma/  zd rme döngülerinden elde edilen sonuçlar genellikle taze bir döngünün yaklaşık yarısı kadar başarı oranına sahiptir [26].

Embriyo dondurma yaklaşık 3 saat süren bir işlemdir. Embriyonun ortam sıcaklığı önce yavaş yavaş -36  C'ye düşürülmekte ve daha sonra -196  C'de sıvı azot içine daldırılmakta ve uzun süre depolanabilmektedir. Embriyo   zd rme işlemi yaklaşık 2 saat sürmektedir ve dondurma işleminin tersidir. Embriyolar oda sıcaklığına getirilmekte ve bir inkübatörde 37  C sıcaklıkta kültür ortamına transfer edilmeleri sağlanmaktadır [2].

In vitro fertilizasyon

IVF,  ocuk sahibi olmakta zorlanan çiftlere yardımcı olmak için günümüzde mevcut olan en başarılı yardımcı üreme tekniklerinden biridir [2]. IVF, oositin tıbbi koşullar altında, vücut dışında laboratuvar ortamında sperm tarafından d llendiği bir süreçtir. Döllenmiş oosit 2-6 gün boyunca k lt rlenmekte ve daha sonra uterusu aktarılmaktadır [2,3]. IVF en sık kullanılan yardımcı üreme tekniğidir [22]. Kadın yaşının 35'ten küçük olduğu vakaların yaklaşık %50'sinde başarılı olmaktadır [27].

 nl  İskoç cerrah John Hunter, 1770'lerde belgelenen ilk suni d llemeyi gerçekleştirmiştir [20]. Chang 1959'da hayvan modeliyle ilk kez bir IVF denemesi yapmıştır. Oldham Genel Hastanesi'nde bir jinekolog olan Dr. Patrick Steptoe ve Cambridge  niversitesi'nde bir fizyolog olan Dr. Robert Geoffrey Edwards, 1966'dan sonra gebelik için alternatif çözüm bulma konusunda aktif olarak çalışmışlar ve bununla birlikte, Dr. Robert Geoffrey Edwards ve arkadaşlarının başarılı insan oosit döllenmesini yayınlaması 7 yıl s rm ştir. İnsanlarda yardımcı üreme teknikleri ile tasarlanan ilk gebelik Avustralya'da başarılmasına rağmen bu

gebelik düşükle sonuçlanmıştır. Dr. Patrick Steptoe ve Dr. Robert Geoffrey Edwards ektopik bir gebelik sonrası *in vitro* döllenmiş insan oositlerinden bir yavru üretmeyi başarmışlardır. İlk IVF bebeği, İngiltere'nin Oldham Genel Hastanesi'nde, 25 Temmuz 1978 günü 23:47'de sezeryan ile doğan Louise Brown'dır. Doğumda 2,608 kg ağırlığındadır [2,3]. Tedaviyi geliştiren fizyolog Dr. Robert Geoffrey Edwards, 2010 yılında Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür [3].

Bugün IVF, dünya çapında milyonlarca doğumu ve Amerika'da ve Avrupa'da her yıl tüm doğumların %1-3'ünü oluşturmaktadır. Bununla birlikte, embriyoların morbidite ile ilişkili tek gen mutasyonlarının genetik olarak test edilebilmesinde de IVF kullanılmaktadır [27].

Preimplantasyon genetik teşhisi, yaygın olarak polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılmaktadır [28,29]. 3. gün embriyosunda genellikle 8 hücre bulunmakta ve bu hücrelerden biri çıkarılarak spesifik kusur için analiz edilmektedir [2]. Diğer bir test türü, preimplantasyon genetik taramadır. Preimplantasyon genetik tarama embriyo anöploidi riski yüksek olan hastalar için prognostik değer taşımaktadır [27].

Tüp bebek tedavisinin ilk yıllarında, en az birinin hayatta kalacağı ve çoğu zaman çoklu doğumlara yol açacağı beklentisiyle birkaç embriyo implante edilmiştir. 2004 yılında 35 yaşından küçük kadınların %32,7'si ikiz, %4,9'u üçüz doğum yaparken, 2014 yılında IVF uygulanan 35 yaşından küçük kadınların %11,8'i ikiz, %0,4'ü üçüz doğum yapmıştır [27].

İn vitro fertilizasyon uygulaması

Ovaryumlar oosit üretimi için uyarılmaktadır. Ovaryumların çoklu foliküllerinin tek bir döngüde gelişimini uyarmak için bir ilaç rejiminin (gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), insan koryonik gonadotropini (hCG)) uygulanmasına, ovaryum hiperstimülasyonu denmektedir ve bu uygulama süper ovulasyon ile sonuçlanmaktadır. Tedavi döngüleri genellikle adet 3. gününde başlamaktadır [2,3,20]. Foliküller olgunlaşıp ovulasyona hazır olduktan sonra, hCG enjeksiyonu uygulanmaktadır [2,20]. Ovulasyon, tek bir hCG enjeksiyonundan 38-40 saat sonra meydana gelmektedir [3]. Laparoskopi ve ultrason yöntemleri kullanılarak oositler toplanmaktadır [2,20]. Oosit gelişimi ultrason kullanılarak, hormon seviyeleri ise idrar veya kan testi örnekleri incelenerek takip edilmektedir [3,20].

Gebelik şansını arttırmak için kaliteli oositler seçilmektedir. Oositler laboratuvarda çevrelerindeki hücreden ayrılmakta ve spermier de yıkanarak döllenmeye hazır hale getirilmektedirler [2].

Spermier ve oositler kültür ortamında birlikte karıştırılarak yaklaşık 18 saat boyunca 75 000:1 oranında birlikte inkübe edilmektedir [2,20]. Oosit, döllenme ve hücre bölünmesinin gerçekleştiğini doğrulamak için izlenmektedir [3]. Çoğu durumda, oosit aşlamadan birkaç saat sonra döllenmekte ve döllenmiş oosit 2 pronuclei göstermektedir [2,20]. Oosit başarılı döllenme sonrası embriyo olarak kabul edilmektedir [3]. Düşük döllenme olasılığında, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yapılabilmektedir [20].

Embriyolar alındıktan 3 gün sonra 6-8 hücre aşamasına ulaşana kadar kültürlenmektedir. Blastosist aşamasında transfer edilen embriyolarda gebelik oranları daha yüksektir [2].

Embriyolar genellikle alındıktan 3-5 gün sonra kateter yardımıyla kadının rahmine yerleştirilmektedir [3,20]. Transferde kullanılan embriyoların sayısı anne yaşına, embriyoların kalitesine ve önceki döngülerin sonuçlarına bağlı olarak değişmektedir [2]. İmplantasyon başarısı ve gebelik oluşumu için kan testleri ve potansiyel ultrasonlar takip edilmektedir [2,3]. Kullanılmayan embriyolar dondurularak saklanabilmektedir [20].

IVF'de çoklu embriyo transferine bağlı olarak görülebilen çoklu doğumlar; gebelik kaybına, çeşitli komplikasyonlara, prematürite ve yenidoğan morbiditesine neden olabilmektedir [3].

Anne yaşı, infertilite veya alt doğurganlık süresi, bazal folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyesi ve oosit sayısı IVF'de canlı doğum oranları ile başarılı gebelik oranlarını etkileyen faktörlerdir [3].

2.2. Ovaryumlar, Oogenez ve Folikülogenez

2.2.1. Ovaryumların anatomisi ve görevleri

Dişi gonadları olan ovaryumlar, karın alt sol ve sağ kadrnlarında bulunmaktadır. İntraperitoneal endokrin organlardır. Üremede ve hormon üretiminde etkin rol oynamaktadırlar. Normal ovaryumlar 3,5 cm uzunluğunda, 2,0 cm genişliğinde ve 1,0 cm kalınlığındadır; hacimleri menopoza doğru azalmaktadır [30].

Ovaryumlar ara mezodermiden köken almaktadırlar. Hem ovaryum arterinden hem de uterin arterden beslenmektedirler [31,32]. Lenflerinin çoğunu L2 seviyesinde ortaya çıkan paraaortik lenf düğümlerine boşaltmaktadırlar. Ovaryumların iki sempatik innervasyon kaynağı vardır; biri ovaryum pleksusundan geçerken, diğeri ovaryum ligamentinde taşınmaktadır. Pelvik splanknik sinirlerden kaynaklanan pelvik pleksustan, parasempatik innervasyonu kaynaklanmaktadır [30].

Yetişkin ovaryumları korteks, medulla ve hilum olmak üzere üç bölgeye ayrılmaktadır. Korteksi oluşturan yapılar, yüzey epitelyumu (germinal epitel), tunika albuginea, ovaryum folikülleri (primordial, primer, sekonder, küçük, orta, büyük graafian folikülü) ve korpora lutea'dır [33]. Germinal epitel ovaryumları kaplayan tek katlı kübik epitel yapısındadır [34]. Bu katmanın altında, kolajenden yapılmış ve tunika albuginea adı verilen bağ dokusu vardır [30,35]. Medulla büyük kan damarlarını ve sinirleri içermektedir. Hilum büyük spiral arterler ve hilum veya ovaryum leydig hücrelerini içermektedir [33].

Ovaryumun ilk işlevi ergenlikte hormon üretimidir. GnRH seviyelerindeki artışa yanıt olarak ovaryumlardan östrojen, progesterone, testosteron ve inhibin salgılanmaktadır. Hipotalamustan salgılanan GnRH, ön hipofizdeki hücreleri etkileyerek FSH ve lüteinleştirici hormon (LH) sentezini uyarmaktadır [30]. FSH, granüloza hücrelerine etki ederek folikül büyümesini ve olgunlaşmasını; LH, teka hücrelerine etki ederek androjenlerin ve öncülerinin üretimini sağlamaktadır. Daha sonra androjenlerden östradiol sentezlenebilmektedir [30,35]. Ergenlikte östrojendeki artış sekonder cinsiyet özelliklerinin gelişmesine yol açmaktadır [36].

Ovaryumların ikinci işlevi, oositleri barındırmaktır. Ovaryumlar, uterusda gelişmeye başlayan ve ergenliğe kadar gelişimi duraklatılan oositleri barındırmaktadırlar. Oositler olgunlaşmakta ve LH dalgalanmasına yanıt olarak serbest bırakılmaktadır [30].

2.2.2. Oogenez

Kadınlarda gametogenez, oogenez olarak adlandırılmaktadır [37]. Gametler, intrauterin 3. haftanın sonunda yolk kesesi duvarının allantoise yakın olan kısmında görülen primordial germ hücrelerinden gelişmektedir. 3. haftanın sonu, 4. haftanın başlarında primordial germ

hücreleri ilkel gonadlara ulaşmakta ve oogoniumlara farklılaşmaktadır. Oogoniumlar mitozla çoğalarak sayılarını arttırmaktadır. Primer oositler, intrauterin 4. aydan sonra oogoniumlardan oluşmaya başlamakta ve intrauterin 7. aydan sonra hiç oögonia kalmamaktadır [34,37]. Primer oositler follikül hücrelerince sarılmakta ve oluşan yapıya artık primordial follikül denmektedir [34]. Bu foliküllerdeki primer oositler puberteye kadar I. mayoz bölünmenin profaz safhasında beklemektedir [38,39]. Ovaryumdaki primordial folikül popülasyonu, kadın üreme yaşamı boyunca folikül ve oosit geliştirmek için bir rezervuar görevi görmektedir [39]. Ovaryumlarda bulunan primer oosit sayısı, doğumda dışı bir bebekte 1-2 milyondan, ergenlikte yaklaşık 400 000'e, menopozun sonunda ise sıfıra düşmektedir [37-39].

Puberteyle birlikte hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle her menstruel siklus başında 5-15 primer folikül gelişerek etraflarındaki tek katlı kübik epitel hücreleri çoğalmaya ve çok katlı granüloza hücrelerini meydana getirmeye başlamakta [34,38]. Ancak genellikle bir tanesi ovulasyon aşamasına kadar ilerleyebilmektedir. Dominant follikül dışında gelişmeye başlayan diğer folliküller atreziye uğramaktadır [34]. Daha sonra folikül hücreleri arasında folikül sıvısı birikmekte ve bu aşamadaki foliküle sekonder folikül denmektedir [38]. Sekonder oosit II. mayoz bölünmeye girmekte ve ovulasyondan önce metafaz II evresinde, oosit fertilize oluncaya kadar kalmaktadır. Fertilizasyon gerçekleşirse, sekonder oosit, II. mayoz bölünmeyi tamamlamaktadır. Fertilizasyon gerçekleşmezse, oosit, ovulasyondan 24 saat sonra mens kanıyla atılmaktadır [40]. Bu şekilde over korteksinde hiç follikül kalmayınca kadar follikül sayısı gittikçe azalmakta ve menapoz gerçekleşmektedir. Puberteden menapoza kadar 400-500 civarında follikül ovule olmaktadır [34].

2.2.3. Folikülogenez

Yaklaşık 1 yıllık bir süreç olan folikülogenez, primordial folikülün büyüyen folikül havuzuna alınmasıyla başlamaktadır. Ovulasyon veya atrezi nedeniyle ölümle sona ermektedir. Folikülogenez preantral ve antral faz olmak üzere iki aşamaya ayrılabilir. Preantral faz, gonadotropinden bağımsızdır, oositin büyümesi ve farklılaşması ile karakterizedir [33,39]. Antral faz, gonadotropine bağımlıdır ve antruma sahip olan tersiyer foliküllerin varlığı ile karakterizedir. Antrum, foliküler sıvı ile dolu bir boşluktur [39]. Preantral faz büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Büyüme faktörleri esas

olarak otokrin/parakrin mekanizmalar yoluyla lokal olarak üretilmektedir. Antral faz büyüme faktörlerine ilaveten FSH ve LH tarafından düzenlenmektedir [33,39].

Preantral ya da sınıf 1 faz; primordial, primer ve sekonder folikül aşamaları olmak üzere üç aşamaya ayrılmaktadır. Antral faz; küçük (sınıf 2, 3, 4, 5), orta (sınıf 6), büyük (sınıf 7) ve preovulatar (sınıf 8) graaf folikül aşamaları olmak üzere 4 aşamaya ayrılmaktadır. Sınıf 3 aşamasında antrum oluşmu sonrası, foliküler büyüme hızlanmaktadır. Luteal faz sonunda baskın bir folikül, sınıf 5 foliküllerden seçilmektedir. Yaklaşık 15-20 günlük bir süreçte baskın folikül preovulatar aşamaya gelmektedir [33,41].

Folikülogenez süreci ovaryum korteksinde gerçekleşmektedir. Primordial folikül alımı, preantral folikül gelişimi, antral folikülün seçimi ve büyümesi ve folikül atrezisi olmak üzere 4 önemli gelişimsel olayı içermektedir [33].

Primordial folikül

Primordial folikül, mayozun profaz I. aşamasında beklemekte olan primer oosit ve onu çevreleyen skuamöz granüloza hücresi ve bir bazal lamina içermektedir [33,34]. Ergenlik başlangıcından önce, ovaryum korteksinin tüm folikülleri primordial folikül aşamasındadır [35]. Primordial foliküllerin bağımsız bir kan kaynağı yoktur [42].

Bazı primordial foliküller, fetüste oluştuktan sonra büyüme aşamasına gelmektedir. Skuamözden küboidale şekil değişikliği, granüloza hücrelerinde mitotik potansiyel kazanımı ve sonrasında oosit büyümesi gerçekleşmektedir [33].

Primer folikül

Primordial foliküller, primer oosit ve oositi çevreleyen tek bir tabaka halinde düzenlenmiş bir veya daha fazla küboidal granüloza hücresinin varlığı ile tanımlanan primer foliküllere dönüşmektedir [33,35]. Primer folikül gelişiminden sorumlu faktörler tam olarak bilinmemekle birlikte, granüloza hücresinden türetilmiş anti-müllerian hormonu (AMH) ve aktivinlerin bu sürecin düzenlenmesine katıldığı belirtilmektedir [39]. Granüloza hücreleri tarafından FSH reseptörü ekspresyonu ve oosit büyümesi ve farklılaşması primer folikülde meydana gelen başlıca gelişimsel olaylardır [33]. Foliküler hücrelerin çoğalmasıyla primer

folikül çok katmanlı hale gelmekte ve oositi granüloza hücrelerinden ayıran zona pellusida da şekillenmeye başlamaktadır [34,35].

Preantral dönemde, oosit çapı ~25 µm'den ~120 µm'ye çıkmaktadır. Bu dönemde çevresindeki hücre dışı matrisi olan zona pellusida'yı geliştirmektedir [33]. İnsan oositlerinde yüksek düzeylerde eksprese edilen büyüme farklılaşma faktörü-9 (GDF-9), insan preantral foliküllerinin *in vitro* büyümesini uyarmaktadır [43,44].

Primer folikül gelişiminde, hem oosit hem de granüloza hücreleri, çok sayıda sitoplazmik çıkıntı ve mikrovillus oluşturmaktadırlar. Bu sayede difüzyon için geniş bir yüzey alanı sağlamış olmaktadır. Gap junctionlar, konneksinler adı verilen proteinlerden oluşan hücreler arası kanallardır ve primer folikül aşamasında oluşmaktadır [33,35]. Gap junctionlar bitişik hücreleri doğrudan birleştirerek iyonların, sinyal moleküllerinin ve metabolitlerin difüzyonunu sağlamaktadırlar [45].

Folikül alımından sonra oosit tarafından sentezlenen baskın gap junction proteini konneksin-37'dir. Bunun yanında granüloza hücreleri başlıca konneksin-43'ü sentezlemektedirler. Böylece, oosit ve granüloza hücreleri arasında konneksin-37 ve konneksin-43'den oluşan heterotipik gap junctionlar oluşturulurken, granüloza hücreleri birbirleri arasında homotipik konneksin-43 gap junctionları oluşturmaktadırlar [33].

Sekonder folikül

Primer-sekonder folikül geçişi; granüloza hücrelerinin düzenlenmesinde basit bir kübik epitelden tabakalı veya yalancı tabakalı bir silindirik epitele geçişi içermektedir [33].

Folikülogenezin preantral fazının tamamlanmasında, tamamen büyümüş sekonder bir folikül; zona pellusida ile çevrili tamamen büyümüş bir oosit, yaklaşık 9 katman granüloza hücresi, bir bazal lamina, bir teka interna, bir teka eksterna ve teka dokusunda bir kılcal ağ içermektedir [33,39]. Stromal hücreler, teka interna ve teka eksternayı oluşturmaktadır. Teka interna vaskülarize hücresel tabakadan oluşurken, teka eksterna çoğunlukla lifli bağ dokusundan oluşmaktadır. Teka interna hücreleri, erkek cinsiyet hormonu androstenedionu üretmektedir. Androstenedion, aromataz enzimi tarafından östradiole

dönüştürülebilmektedir. Granüloza hücreleri, bazal lamina ile internalardan ayrılmaktadır [35].

Tersiyer folikül

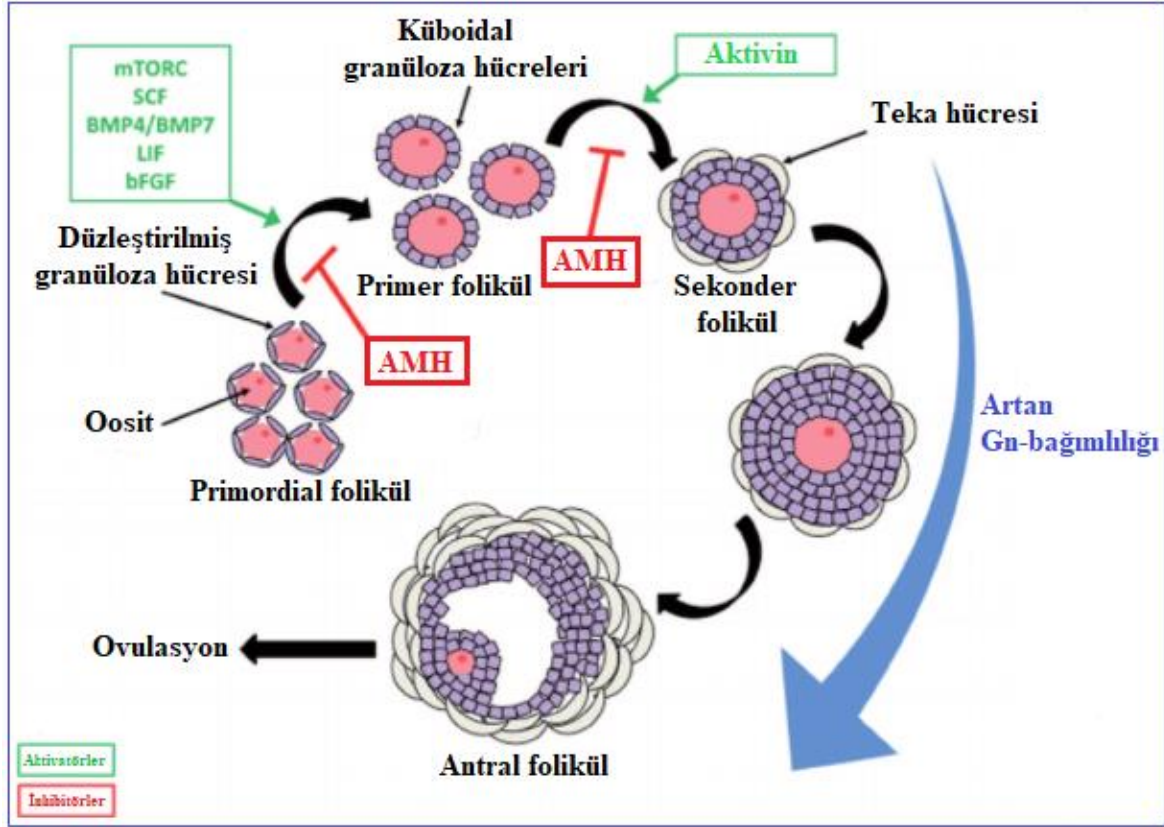
Sekonder folikül geliştikçe, daha fazla granüloza hücre tabakası oluşmakta ve aralarında foliküler sıvı ile dolu bir antral boşluk gelişmektedir. Foliküler büyümenin antral fazının başlamasıyla, folikül artık antral folikül ya da tersiyer folikül adını almaktadır. Birkaç folikül aynı anda tersiyer aşamaya ulaşmakta ancak bunların çoğu atrezi geçirmektedir [35,37,39] (Şekil 2.1).

Foliküler sıvı, oosit ve granüloza hücrelerinden salgılanan ürünler tarafından şartlandırılmış bir plazma eksüdasıdır. Kit ligandı ve konneksin-37 antrum oluşumu için gerekli iki proteindir [33]. Baskın bir folikülde, antrumun foliküler sıvı ile doldurulmasıyla birlikte granüloza ve teka hücreleri çoğalmaktadır [46].

Teka interna, teka interstisyel hücrelerini içermektedir. Sitoplazmalarında lipid damlacıkları, düz endoplazmik retikulum, tübüler krista ve mitokondri vardır [47]. İnterstisyel hücreler LH ve insülin reseptörlerine sahiptirler. LH ve insülin uyarısına yanıt olarak, yüksek seviyelerde androjen üretmektedirler [33].

Foliküler antrum oluşumu sırasında oosit tarafından salgılanan faktörlerin ve ovaryum hormonlarının etkisiyle granüloza hücreleri mural granüloza hücrelerine ve kümülüs hücrelerine farklılaşmaktadır [4,48]. Oosit ile yakın temasta bulunan kümülüs hücreleri, zona pellusida'yı geçen ve oolemma ile gap junctionları oluşturan sitoplazmik çıkıntılar geliştirmektedir. Bu yapıya kümülüs-oosit kompleksi denmektedir [49].

Granuloza ve teka hücrelerinin çoğalmasıyla foliküller gelişmektedir. Böylece, antrum ve folikül genişlemektedir. Foliküller, LH dalgalanmasından sonra preovulatuvar foliküller olarak adlandırılmaktadır [39].



Şekil 2.1. Folikülogenez (mTORC: Rapamisin kompleksinin memeli hedefi, SCF: Kök hücre faktörü, BMP4: Kemik morfogenetik protein 4, LIF: Lösemi inhibe edici faktör, bFGF: Bazik fibroblast büyüme faktörü, Gn: Gonadotropin) [50]

2.2.4. Ovulasyon

FSH ve LH'nin dalgalanmaları, ovulasyona yol açan sinyallerle folikülleri uyarmaktadır. 28 günlük bir adet döngüsünün 14. gününde, olası döllenme için kümülüs hücre kompleksi içine alınmış olgun bir oosit bırakılmaktadır [33].

Ovulasyon sırasında en dikkat çekici değişiklik ovaryum yüzeyinde, makula pellusida veya stigma olarak adlandırılan ve oosit ve kümülüs kütlelerinin folikülden çıktığı bir delik oluşumudur. Stigma oluşumu, hücre apoptozu, hücre göçü ve hücre dışı matris tabakalarının proteolitik sindiriminin bir kombinasyonunu içermektedir [33].

Ovulasyondan sonra, graaf folikülün kalıntıları önce korpus hemorajikum'a, sonra da korpus luteum'a dönüştürülmektedir [35]. Korpus luteum, döngünün luteal fazının ilk haftasında çok miktarlarda progesteron ve östradiol üretmektedir. Korpus luteum'u oluşturan hücrelere membrana granüloza, teka interna, teka eksterna ve kan dokusu katkıda bulunmaktadır [33].

Ovulasyonu takiben, oositleri çevreleyen kümülüs hücreleri, oositin fallop tüpünün ampullar-istmik birleşimine yapışmasına ve taşınmasına yardımcı olmaktadır. Foliküler büyüme ve östradiolün salınması, oviduktal kasılmaları uyarmaktadır. Böylece oositler dölleme alanına taşınmaktadır [51].

İmplantasyon gerçekleşmezse, korpus luteum luteolize uğramakta ve dejenere olmaktadır. Menstrüel siklusun 23. gününden sonra, korpus luteumda apoptotik hücreler bulunmakta ve luteolizle korpus luteumdaki tüm hücreler yok edilmektedir. Geriye korpus albicans adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan bir nodül kalmaktadır [33].

2.2.5. Oosit, kümülüs hücreleri ve folikül sıvısı

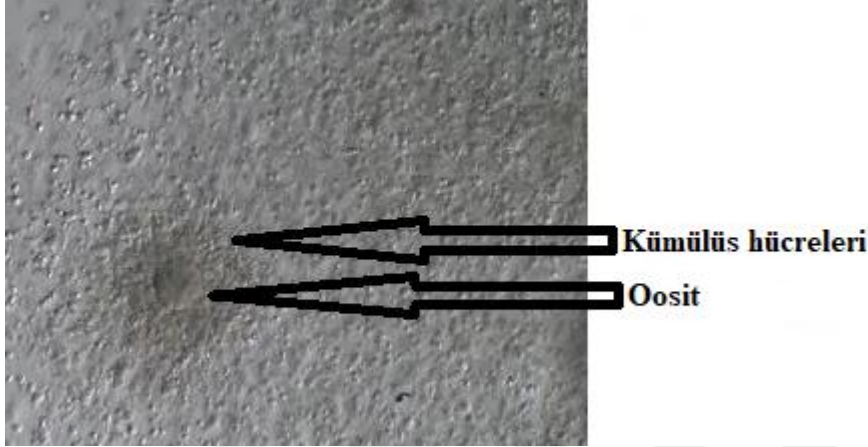
Granüloza hücreleri, ovaryumda bulunan ve gelişmekte olan oosit için gerekli fiziksel desteği ve mikro ortamı sağlayan birincil hücre türüdür [48]. Primer oositi çevreleyen tek granüloza hücresi katmanına korona radiata denmektedir [35]. Korona radiata transzonal projeksiyonlar yoluyla oosit ile doğrudan temas halindedir. Granüloza hücrelerinin bu uzantıları oositin zona pellusidasını aşarak oolemma ile özel kavşaklar oluşturmaktadır [4].

Granüloza hücrelerinin apikal ve bazal yüzeylerinde akuaporinler bulunmaktadır. Akuaporinler suyun foliküllerde, hücreler arasında hareket etmesine izin vermektedir [8].

Oositin büyüme ve olgunlaşma süreçlerinde önemli roller oynayan kümülüs hücreleri, ovaryum içinde sinyal iletiminde, oositi oksidatif stres hasarından korumada ve oositin metabolizmasında rol almaktadırlar. Oosit ve kümülüs hücreleri, oosit ve folikül büyümesinin, olgunlaşmasının ve ovulasyon süreçlerinin, ovulasyon oranının, oogenezin ve doğurganlığın düzenlenmesinde rol oynayan çift yönlü bir iletişim halindedirler. Bu iletişim sayesinde çeşitli biyolojik işlemler sırasında metabolitlerde değişim sağlamaktadırlar [4,48].

Kümülüs hücreleri ve oosit birlikte, foliküler sıvı ile temas halinde antral folikülün içinde yer alan kümülüs-oosit kompleksini oluşturmaktadırlar [4,48] (Resim 2.1, Şekil 2.2). Olgun kümülüs-oosit kompleksi, metafaz II'de tutulan sekonder oositten oluşmakta ve avasküler bir kompartmanda ortaya çıkmaktadır [4,48]. Folikül sıvısı, plazmadan kaynaklanan bir sıvıdır. Granüloza hücreleri tarafından sekonder folikül gelişiminin sonraki aşamalarında üretilmektedir [8]. Küçük sinyal moleküllerini, küçük peptitleri, proteinleri, steroidleri,

polisakkaritleri, ROT'ları, antioksidanları ve metabolitleri içermektedir [4, 52]. Kümülüs hücreleri ve foliküler sıvı, oosit kalitesinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Zararlı sistemik veya pelvik durumlarda kümülüs hücrelerinin ve folikül sıvısının oosit kalitesine etkisini bilmek, infertilite yönetimi sırasında alınan kararlarda etkili olmaktadır [8].



Resim 2.1. Oosit ve kümülüs hücreleri [53]

Oositlerin kümülüs hücrelerinden ayrıldıktan sonra yapılan *in vitro* kültürlerinde, nükleer ve sitoplazmik olgunlaşmada anormallikler görülmüştür. Bu oositler kümülüs hücreleriyle birlikte kültürlendiğinde bu anormallikler önlenmiştir [54]. Bununla birlikte bazı oositlerden salgılanan faktörler de kümülüs hücrelerinin olgunlaşmasında, metabolizmasında ve hayatta kalmasında etkilidir [55].

Hücreler arası iletişim başlıca iki ana mekanizma olan gap junctionlar ve parakrin sinyalleri ile gerçekleşmektedir. Folikülde, kümülüs hücreleri oositle ve birbirleriyle gap junctionlar vasıtasıyla iletişim kurmaktadır [8]. Böylece kümülüs hücreleri, oosit olgunlaşmasını desteklemekte, endokrin ve diğer çevresel sinyalleri ileterek oositin hayati rollerini yerine getirmesinde rol oynamaktadır. Konneksin-37'nin genetik olarak silinmesi, farelerde olgun folikül eksikliği, ovulasyon başarısızlığı ve çok sayıda uygunsuz korpora lutea gelişiminden kaynaklanan dişi sterilitesine yol açmaktadır. Ovulasyon sonrası kümülüs hücreleri ve oosit gevşek bir şekilde bağlı kalmakta ve kümülüs hücreleri oositi ovaryum dışında da desteklemeye devam etmektedir [48].

Oositler, glikoliz ve kolesterol sentezi için zayıf bir kapasiteye sahipken, kümülüs hücreleri kümülüs-oosit kompleksinde enerji üretimini desteklemektedir. Piruvat, laktat ve kolesterol biyosentetik yolunun ürünleri, trikarboksilik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon yoluyla

adenozin trifosfat (ATP) sentezi için metabolize edilmek üzere kümülüs hücrelerinden, gap junctionlar yoluyla oosite taşınmaktadır [8]. Kümülüs-oosit kompleksi içinde, glikoz metabolizması ile ilgili pentoz fosfat yolu ve hekzosamin biyosentez yolu da etkilidir. Hekzosamin biyosentez yolunda üretilen bazı substratlar kümülüs genişlemesi için önemlidir [56,57]. Kümülüs hücreleri mayozu desteklemekte ve gametin pH dengesinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Gap junctionlar yoluyla oosite iyonları, siklik nükleotitleri (siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP)), metabolitleri, amino asitleri ve ribonükleik asit (RNA) transkriptlerini aktarmaktadırlar. Kümülüs hücreleri ayrıca oositi foliküler sıvıda bulunan metabolitlere, ROT'a, toksinlere ve inflamatuvar belirteçlere karşı korumaktadır. Enfeksiyon gibi olumsuz koşullar altında, kümülüs hücrelerinin koruyucu özellikleri etkilenebilmektedir [8].

Foliküler büyüme ve olgunlaşma sırasında kritik bir rol oynayan intrafoliküler parakrin sinyalleri oogeneze boyunca aktiftir [58]. Bu sinyal iletimi özel reseptörler ve sinyal yolları ile gerçekleşmektedir. FSH ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) süper ailesinin üyeleri de dahil olmak üzere endokrin faktörlerle düzenlenmektedir. Kümülüs hücrelerinden oosite geçen parakrin sinyalleri mayozun yeniden başlamasında, nükleer ve sitoplazmik olgunlaşmada ve transkripsiyonel aktiviteyi kontrol etmede etkilidir [8].

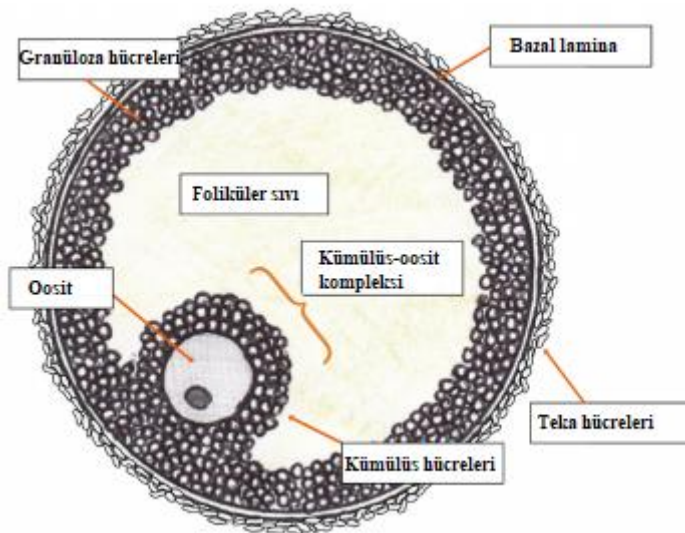
Oositin, kümülüs hücresi gen ekspresyonunu uyardığı, folikül büyümesini ve atreziiyi, kümülüs hücrelerinin metabolizmasını, farklılaşmasını, çoğalmasını, apoptozunu ve luteinize edilmesini düzenlediği belirtilmektedir [8]. Oositten kümülüs hücrelerine parakrin sinyallerin etkisi oosit kümülüs hücrelerinden ayrıldıktan sonra *in vitro* kültür ortamında gösterilmiştir. Kümülüs hücreleri tek başlarına kültürlendiğinde granüloza hücre luteinizasyonu, steroid üretiminde değişiklikler, hyalüronik asit sentezinde ve kümülüs genişlemesinde azalma gözlenmiştir [59-62].

Oosit, TGF- β süper ailesinden GDF-9 ve kemik morfogenetik protein-15 (BMP-15) proteinlerini salgılamaktadır. Bu proteinler folikülogenez süresince, çevredeki somatik hücrelerle etkileşime girmektedirler. Böylece kendi parakrin faktörlerini (aktivinler, inhibitörler, kit ligand, transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α), AMH) üreterek oosit büyümesi, granüloza hücre çoğalması ve teka hücre farklılaşmasını koordine etmede; kümülüs hücreleri çoğalmasının, farklılaşmasının, glikolizinin ve kolesterol sentezinin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar [8,63]. GDF-9, kümülüs hücrelerinin genişlemesinde,

BMP-15 ise kümülüs hücrelerinin proliferasyonunda ve metabolizmasında etkilidir [8,33]. Granüloza hücre ekspresyonunu ve kit ligandının salgılanmasını arttıran oosit tarafından salgılanan faktörler olan trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF) ve bFGF, folikül aktivasyonunu pozitif olarak düzenlemektedir. Granüloza hücresi kökenli kit ligandı oosit üzerindeki c-kit tirozin kinaz reseptörü ile etkileşime girerek oosit büyümesini desteklemektedir. Ayrıca kit ligandı primordial folikül aktivasyonu için gereklidir [33]. BMP-15'in, sıçan granüloza hücrelerinde kit ligand ekspresyonunu uyarırken, kit ligandının, BMP-15'in ekspresyonunu inhibe ettiği belirtilmektedir [64].

Konneksinlerin düzenlenmesi, kümülüs hücrelerinin parakrin sinyallere cevabını etkilerken, parakrin sinyaller de kümülüs hücreleri arasındaki konneksinlerin düzenlenmesini etkileyebilmektedir. Bu etkileşim folikülogenez ve oosit yeterliliğinde etkili bir faktördür [8].

İnfertil bireylerin primer granüloza-lutein hücrelerinde, BMP-15'in konneksin-43 ekspresyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise BMP-15'in konneksin-43'ü azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak BMP-15'in granüloza hücreleri arasındaki gap junctionları azalttığı belirtilmektedir [65].



Şekil 2.2. Antral folikülün şematik gösterimi [66]

2.2.6. Kümülüs hücrelerinin genişlemesi

Granüloza hücreleri, hormon tepkisi ve gen ekspresyonundaki ayrımlara dayanarak mural granüloza hücreleri, antral granüloza hücreleri, kümülüs hücreleri olmak üzere üç alt soya ayrılmaktadır. Mural granüloza hücreleri folikül duvarını çizmekte ve genellikle foliküler taban membranı ile temas kurmaktadır. Antral granüloza hücreleri, antral boşluğu hizalamakta ve foliküler sıvı ile temas etmektedir. Kümülüs hücreleri zona pellusidayı geçerek oositin plazma membranı ile gap junctionlar yoluyla temas halindedir. Kümülüs spesifik genlerin ekspresyonu GDF-9 ve BMP-15 sinyalleri ile aktive edilmektedir [67].

Kümülüs hücre matriksi, hiyalüronan zincirlerinden oluşmaktadır. Hiyalüronan zincirleri, kümülüs hücrelerinden tümör nekrozis faktör (TNF) ile uyarılan protein 6, mural granüloza hücrelerinden versikan ve serumdan türetilen tripsinler arası inhibitörün ağır zincirleri ile bağlanmaktadır. Kümülüs hücre matriksinin diğer bileşenleri arasında; pentraksin 3 ve trombospondin tip 1 motifli bir disintegrin-benzeri ve metalloproteinaz (ADAMTS-1) bulunmaktadır. Pentraksin 3 matriks stabilitesinde ve ovulasyon sonrası tutulmasında, ADAMTS-1 matriks yeniden modellemesinde gereklidir [68,69].

Kümülüs hücreleri, LH dalgalanmasına maruz kalmaktadır. Kümülüs hücreleri, doğrudan LH'a yanıt vermek yerine, mural granüloza hücrelerinden epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri ligandlar da dahil olmak üzere yayılabilir faktörler yoluyla dolaylı olarak ovulasyon uyarıcısını almaktadır. Ayrıca, prostaglandinler ovulasyonun kilit araçlarıdır. Özellikle, prostaglandin E2 (PGE2), ovulasyonun kilit araçları olarak kümülüs hücreleri tarafından hızla üretilmektedir [33].

İnterlökin-1 (IL-1), teka bölmesi içinde lökositlerden salınmakta ve hücre dışı matrisinin bileşenlerini sentezlemede kümülüs hücrelerini uyarmak için parakrin etkili olarak hareket etmektedir [70]. GDF-9 ve BMP-15 kümülüs hücre fenotipinin farklılaşmasını desteklemekte ve ovulasyon uyarılarına kümülüs hücresi tepkisine yol açmaktadır. Endokrin sistemden ve çeşitli foliküler bölmelerden gelen uyarılar, başarılı ovulasyon ve döllenme için kritik olan kümülüs genişlemesinde kümülüs hücreleri arasında hücre dışı matriksin ortaya çıkmasıyla sonuçlanmaktadır [33].

2.2.7. Oosit gelişiminde vasküleritenin rolü

Önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşumunu içeren anjiyogenez, dokularda oksijen eksikliği ile uyarılmakta ya da çeşitli anjiyogenik faktörlerin uyarılması ile ortaya çıkmaktadır. Anjiyogenez patofizyolojik bir süreçtir. Adet döngüsünde endometriyumun döngüsel rejenerasyonunda, endometriyal büyümede, plasental damarların büyümesinde, foliküler gelişimde, embriyo gelişiminde ve yara onarımı gibi fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Vasküler endotelyum içinde ve çevresinde üretilen ROT, normal hücrel sinyal mekanizmalarında rol oynayabilmektedir [71].

Somatik foliküler hücreler ve oosit içeren büyüyen bir folikül, kılcal bir ağ ile çevrilidir. Foliküler hücreler ile birlikte, bu damar sistemi kan-folikül bariyerini oluşturmaktadır. Kan-folikül bariyeri oosit koruması ve folikül sıvısı oluşumu için önemlidir [72].

Anjiyogenez foliküler gelişimde etkilidir. Primordial ve primer foliküller besin ve oksijeni, stromal kan damarlarından pasif difüzyonla almaktadır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) foliküler gelişim sırasında, granüloza ve tekal hücreler tarafından sentezlenmektedir. VEGF, tekal hücrelerin katmanları arasında bir damar ağı oluşumunu uyarmaktadır. Folikül, besin kaynaklarını buradan almaktadır [8].

Tekal hücrelerde eksprese edilen kemik morfogenetik protein-7 (BMP-7), VEGF'nin düzenlenmesinde etkilidir. Bu sitokin, granüloza hücrelerinde VEGF ekspresyonunu uyarmakta ve endotel hücrelerinin VEGF'ye duyarlılığını arttırmaktadır. Böylece endotel hücrelerini folikül içinde damar sistemi oluşturmak için uyarmaktadır [73,74].

2.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller

Atomun yapısında bulunan elektron çiftleri orbital denilen uzaysal bölgelerde bulunmaktadır. Elektronlar orbitallerde birbirlerine zıt yönde hareket etmektedirler. Bu harekete spin denmektedir. Orbitallerde çift elektron bulunması o bileşiğe kararlı bir yapı kazandırmaktadır [75,76]. Serbest radikaller dış orbitallerinde eşleştirilmemiş elektron içeren normal hücrel metabolizmanın ürünleri olan moleküllerdir [77,78]. Serbest radikaller, etrafındaki moleküller ile etkileşime girerek, hızlıca kararlı hale ulaşmak istemektedirler [79]. Serbest bir radikalın tek sayıda elektrona sahip olması, kararsız, kısa

ömürlü ve yüksek derecede reaktif olmasını sağlamaktadır [77]. Bu özellikleri sayesinde diğer atomları bazen oksitlemekte (bir elektronu çıkararak) bazen de indirgemektedirler (elektronlarını vererek) [78]. Serbest radikaller oksiradikaller, oksijen free radikaller gibi isimler de almaktadırlar [80].

ROT ve reaktif nitrojen türleri (RNT) serbest radikalleri ve radikal olmayan reaktif türleri oluşturmaktadır. ROT ve RNT'nin orta ve düşük seviyeleri bağışıklık fonksiyonu, bir dizi hücrel sinyal yolu, mitojenik yanıt ve redoks regülasyonu gibi hücre için faydalı çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda rol oynamaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda ise oksidatif strese neden olarak biyomoleküllerde potansiyel hasar oluşturmaktadırlar [77].

Oksijen karbonhidrat, protein ve lipid katabolizmasında rol oynayarak enerji üretiminde etkili olmaktadır. Oksijen kendi başına zararlı olmasa da, çeşitli ROT'un veya serbest radikallerin sentezinde rol oynayan toksik bir ajan olabilmektedir [81]. Pro-oksidanlar/oksidanlar, genel olarak ROT/RNT olarak adlandırılmaktadır. Metabolik reaksiyonlar sırasında üretilen en önemli serbest radikaller, oksijen ve ROT kaynaklı radikallerdir [77].

Oksijen molekülü (O_2)'nin kendisi bir radikaldır ve iki eşleştirilmemiş elektronu vardır. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), oksijen radikali, hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), alkoksi radikali ($RO^{\cdot}$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$), nitrik oksit (azot monoksit, $NO^{\cdot}$) ve azot dioksit (NO_2) radikal örnekleri arasındadır [77,80,82].

Radikal olmayan türler arasında H_2O_2 , hipoklorik asit ($HOCl$), hipobromöz asit ($HOBr$), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1O_2$), nitroz asit (HNO_2), nitrozil katyonu (NO^+), nitroksil anyonu (NO^-), dinitrojen trioksit (N_2O_3), dinitrojen tetraoksit (N_2O_4), nitronyum (nitril) katyonu (NO_2^+), organik peroksitler ($ROOH$), aldehytler ($R-CHO$) ve peroksinitroz asit ($ONOOH$) bulunmaktadır. Bu radikal olmayan türler serbest radikal olmamakla birlikte canlı organizmalarda kolayca serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilmektedirler [77,83].

O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesi ile $O_2^{\cdot-}$ oluşmaktadır. $O_2^{\cdot-}$ yüksek derecede reaktif olmamakla birlikte, H_2O_2 kaynağıdır ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. Çoğunlukla mitokondride oluşmaktadır [84]. Oksijenin iki elektron alarak indirgenmesi ile

H₂O₂, üç elektron almasıyla yüksek derecede reaktif OH[•] ve dördüncü elektronun eklenmesi ile su molekülü (H₂O) oluşmaktadır [79].

RNT arasında yer alan NO[•], damar endotel hücrelerinde L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin kataliziyle oluşmaktadır. Vazodilatör bir etkiye sahiptir. İmmün sistem reaksiyonu sonucunda monositler, makrofajlar ve nötrofiller tarafından salınmaktadır. NO[•], O₂^{•-} ile reaksiyona girerek yüksek oranda reaktif ve güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOO⁻)'i oluşturmakta ve bu da ilerleyen tepkimelerle OH[•] radikalini oluşturmaktadır. ONOOH, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarından sorumludur [79,84].

2.3.1. Reaktif oksijen türleri kaynakları

ROT, ekzojen veya endojen kaynaklardan üretilebilmektedir [77].

Ekzojen serbest radikal kaynakları oksijenin organik bileşiklerle enzimatik olmayan reaksiyonlarını içermektedir. Alkol, sigara, radyasyonlar, doğrudan maruz kalınan güneş ışığı, ozon, X-ışınları, endüstriyel kimyasallar, su ve hava kirliliği ve çevresel kirlleticiler, bazı ilaçlar, böcek ilaçları, ağır metaller, anestezikler, benzen ve endüstriyel çözücüler ekzojen serbest radikal kaynakları arasındadır [78,81,83].

Serbest radikal kaynağı olarak işlev gören bazı enzimatik reaksiyonlar endojen ROT kaynakları olabilmektedir. Bu reaksiyonlar solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P450 sisteminde yer almaktadır. Mitokondri, peroksizomlar, ksantin oksidaz, iltihaplanma mekanizmaları ve bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu, fagositler, demir ve diğer geçiş metallerini içeren reaksiyonlar, araşidonat yolları, iskemi/reperfüzyon, egzersiz, stres, kanser ve bulaşıcı hastalıklar ve yaşlanma endojen serbest radikal kaynaklarıdır [78,83].

Endojen ROT kaynakları olan başlıca organeller, oksijen tüketiminin yüksek olduğu mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumdur [77].

Serbest radikal kaynağı olarak mitokondri

Hücre içi ROT'un çoğu mitokondride oluşmaktadır [85]. ROT üretimi, mitokondride meydana gelen oksidatif fosforilasyondan kaynaklanabilmektedir [71]. Oksidatif

fosforilasyon, mitokondriyal solunum zinciri ve iç mitokondriyal membran üzerinde bulunan 4 kompleksden oluşmaktadır. Kompleks I ve II, trikarboksilik asit döngüsünün ürünlerini oksitledikçe, elde edilen elektronlar, lipidde çözünür bir elektron alıcısı olan koenzim Q'ya transfer edilmekte ve koenzim Q elektronları kompleks III'e vermektedir. Sitokrom c, kompleks III'den aldığı elektronları O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesi için kompleks IV'e aktarmaktadır. Sonrasında, elektron transferi ile üretilen enerji, bir elektrokimyasal gradyan üretmek için protonları mitokondriyal iç zar boyunca pompalamakta ve kompleks V tarafından ATP üretilmektedir [63].

Elektronlar elektron transport zincirinde O_2 'ye aktarıldıkça $O_2^{\cdot-}$ oluşmaktadır. Metabolik hız arttıkça ROT üretimi de artmaktadır [77,80]. $O_2^{\cdot-}$, mitokondriyal süperoksit dismutaz (SOD) etkisi ile H_2O_2 'ye dönüştürülmektedir. H_2O_2 , CAT ve glutatyon peroksidaz tarafından detoksifiye edilmektedir [77].

Serbest radikal kaynağı olarak peroksizom

Peroksizomlar önemli bir H_2O_2 kaynağıdır. Peroksizomlarda H_2O_2 üreten başlıca metabolik süreç yağ asitlerinin β -oksidasyonudur. $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ ve $NO^{\cdot}$ peroksizomlarda üretilen diğer serbest radikaller arasında yer almaktadır. Peroksizomlarda ksantin oksidaz, D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, D-aspartat oksidaz gibi enzimler ROT üretimine neden olmaktadır [86,87].

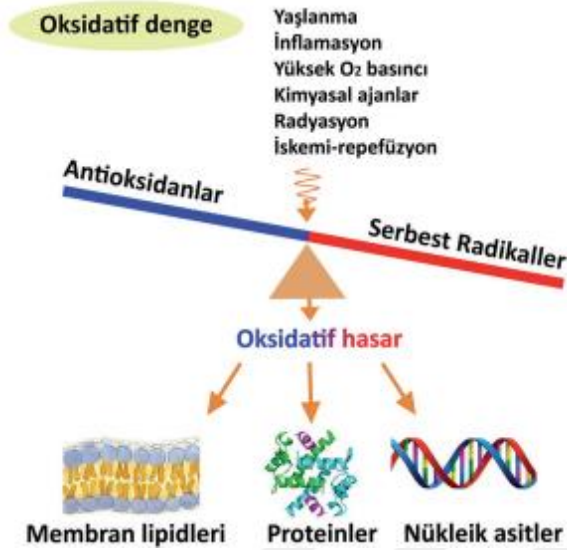
Serbest radikal kaynağı olarak endoplazmik retikulum

Endoplazmik retikulum, çeşitli endojen maddeleri ve ksenobiyotikleri oksitleyen enzimleri içermektedir [80]. ROT oluşumuna katkıda bulunan endoplazmik retikulum enzimleri arasında sitokrom p450 ve diamin oksidaz gibi enzimler bulunmaktadır [88].

2.3.2. Reaktif oksijen türlerinin hücredeki etkileri

Aerobik metabolizmanın normal bir ürünü olarak oluşturulan oksidanlar, patofizyolojik koşullar altında yüksek oranlarda üretilabilmektedir [82]. Oksidatif stres, vücudun antioksidan savunmasını aşan çeşitli ROT'ların kararlı durum seviyelerindeki artış olarak tanımlanmaktadır [89]. Oksidatif stres, ROT oluşumu ve detoksifikasyon arasındaki denge, ROT seviyelerinde artış lehine ilerlediğinde ve hücresel fonksiyonların bozulmasına neden

olduğunda ortaya çıkmaktadır [78]. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle serbest radikaller DNA, lipidler, proteinler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküllerle kolayca etkileşime girebilmektedir [81]. Böylece bu makromoleküler hedeflere geri dönüşü olmayan bir şekilde zarar verebilmektedirler [78] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Oksidatif denge [90]

Serbest radikallerin deoksiribonükleik asite etkileri

DNA, canlı bir sistemde serbest radikallerin hedeflerinden biridir [81]. Özellikle mitokondriyal DNA (mtDNA), ROT'un üretildiği yere yakın bir konumda olması nedeniyle nükleer DNA'ya göre ROT saldırısından daha fazla etkilenmektedir [77]. ROT, hem DNA bazlarını hem de şekerleri doğrudan modifiye edebilmektedir [80,83]. Serbest bir radikal DNA'nın spesifik bölgelerine zarar verebilmekte, tek ve çift iplik kopmasına neden olabilmekte, gen ekspresyonu veya onarımının düzenlenmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinde veya enzimlerde değişikliklere aracılık edebilmekte, baz deaminasyonuna veya ilave oluşumuna ve kaybına neden olabilmektedir [77,80,81,83]. ROT, onarım mekanizmalarında bozulmaya, mutasyonlara ve hücre ölümüne yol açarak DNA'da geri dönüşümsüz hasara neden olabilmektedir [52]. ROT'dan özellikle OH[•] saldırısı ile 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), 8-hidroksi deoksi adenozin, 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin oluşmaktadır. 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının biyobelirtecidir [77]. ROT, DNA'ya ve DNA onarım işlemlerine zarar vererek hücre ölümüne veya kromozomal anormalliklere, karsinogeneze ve mutasyonlara neden olmaktadır [81]. IVF sonrası granüloza hücrelerinde oksidatif stres belirteci olan 8-OHdG

konsantrasyonları ile embriyo kalitesi arasında negatif bir ilişkili olduğu saptanmıştır. Folikül sıvısında 8-OHdG konsantrasyonlarındaki artışla birlikte oosit morfolojisinde anormal özellikler de artmıştır [91].

Serbest radikallerin ribonükleik asite etkileri

RNA, tek sarmallı yapısı, oksitlenmiş RNA için aktif bir onarım mekanizmasının olmaması gibi nedenlerle DNA'ya göre oksidatif hasara daha fazla eğilimlidir. En çok incelenen RNA hasarı ürünü 7,8-dihidro-8-oksoguanozin (8-oksoG)'dir. RNA bazlarının oksidasyonu iplik kopmalarına, baz modifikasyonlarına ve anormal protein üretimine yol açabilmektedir [77,80]. Oksitlenmiş RNA, Alzheimer hastalığı başta olmak üzere birçok hastalıkta görülmektedir [80].

Serbest radikallerin lipidlere etkileri

Çoklu doymamış yağ asitlerinin varlığı biyolojik zarları peroksidasyona karşı savunmasız hale getirmektedir. Çünkü çoklu doymamış yağ asitleri, serbest radikaller tarafından oksidasyona karşı daha hassastır [77,81]. Reaktif bir serbest radikalın saldırısı, çoklu yağ asidi yan zincirlerini lipid peroksitlere dönüştürebilmektedir [88,92]. Lipid peroksidasyonu, membran akışkanlığının yanı sıra membrana bağlı proteinlerin veya kolesterolün bütünlüğünü etkilemektedir. Bu yüksek derecede oksitlenebilir lipidler, daha sonra, yakındaki proteinlere saldırabilmektedir [78]. Lipid peroksidasyonu, membrana bağlı enzimlerin ve reseptörlerin inaktivasyonu gibi membran fonksiyon kaybı ile sonuçlanmaktadır [93]. Serbest radikal etkisine bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun ürünleri, MDA ve 4-hidroksinonenal (4-HNE)'dir [94].

Serbest radikallerin proteinlere etkileri

ROT proteinlerin yapısında bulunan amino asitleri okside ederek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna neden olmaktadır. Proteinlerin denatürasyonu ve işlev kaybı, enzim aktivitesinde, reseptörlerin ve taşıma proteinlerinin işleyişinde bozulmaya neden olmaktadır [83,95].

Metionin ve sistein gibi kükürt içeren amino asitler ve lizin, prolin, treonin ve arjinin gibi amino asitler ROT tarafından oksidasyona karşı daha duyarlıdır. Oksidasyon sonrası bu

amino asitler sülfür radikalleri ve karbonil türevleri vermektedir. Proteinlerde karbonil gruplarının varlığı, O-tirozin ve 3-nitrotirozin protein oksidasyonunun belirteçlerindendir [77,80].

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

DNA, RNA ve proteinler üzerinde bulunan şekerlerin yanı sıra mono- ve polisakkaritler serbest radikallerin saldırısına maruz kalabilmektedir. Serbest glikoz, ileri glikasyon son ürünleri (AGE)'nin oluşmasına neden olan çeşitli oksidasyon reaksiyonlarına uğrayabilmektedir [96,97].

Serbest radikallerin hücre sinyaline etkileri

Hücre dışı kalsiyum miktarı hücre içinden 10 000 kat daha fazladır. Bu fark hücre membranında bulunan kanallar ve pompa sistemleri ile korunmaktadır. Kalsiyum hücre hasarına aracılık etmede etkili olabilmektedir. Endoplazmik retikulum ya da mitokondri gibi hücre içi depolardan kalsiyumun uygunsuz salınımı, endotelial veya nöronal nitrik oksit sentazlar (eNOS veya nNOS) gibi enzimleri aktive edebilmektedir. Bu durum NO[•] ve ONOO⁻'nin üretilmesi ile sonuçlanmaktadır [80].

Serbest radikaller ve hastalıklar

ROT terimi, zincir reaksiyonunun başlatılmasına ve/veya yayılmasına katılan hem radikal hem de radikal olmayan türler dahil olmak üzere tüm reaktif oksijen formlarını içeren bir terimdir [81].

ROT, hücrel makromoleküllere zarar vererek ateroskleroz, iskemik kalp hastalıkları, karsinogenez, diyabet ve karaciğer hastalığı gibi çeşitli hastalıkların başlatılması veya ilerlemesine neden olmaktadır [78,81]. ROT, biyomoleküllerle reaksiyonu takiben lokal yaralanmaya ve organ işlev bozukluğuna yol açmaktadır. Ayrıca yaşlanmayla ilgili dejeneratif süreçleri de hızlandırmaktadırlar [81].

Bununla birlikte, serbest radikaller her zaman zararlı değildir, insan vücudunda faydalı etkileri de vardır [83]. Fizyolojik seviyelerde ROT, apoptoz, anjiyogenez, endotel bağımlı vazorelaksasyon, ovaryumların normal işlevleri, eritropoietin üretimi ve bakteri ve diğer

yabancı maddelerin makrofajlar tarafından imha edilmesi gibi sinyalizasyon veya savunma süreçlerinde düzenleyici araçlar olarak yararlı roller oynamaktadır [98,99]. Bu nedenle, bu radikallerin tamamen ortadan kaldırılması zararlı etkilere neden olmaktadır [83].

Serbest radikallerin vücutta önemli fizyolojik işlevlerinden birisi, nötrofiller ve makrofajlar tarafından $O_2^{\cdot-}$ ve $NO^{\cdot}$ üretilmesidir. Bunlar fagositozda hücrelerin bakterileri yok etmesine yardımcı olmaktadır [78]. Fagositoza başlamak için aktive edildiğinde, bu hücreler, oksijen tüketiminde belirgin bir artış sergilemektedir. Aktif hale getirilmiş fagositlerin oksidatif patlaması (veya solunum patlaması) oksijenin $O_2^{\cdot-}$ 'ye hızlı bir şekilde indirgenmesini içermektedir. Bu reaksiyon NADPH (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotidfosfat) oksidaz tarafından büyük miktarda ROT'un hücre dışı üretimi ile katalize edilmektedir [80].

2.4. Antioksidanlar

Oksidasyon reaksiyonları hücreler için hayati olmakla birlikte, zararlı etkileri de vardır. Bu etkilerden korunmada çeşitli antioksidanlar rol oynamaktadır [78].

Antioksidanlar, makromoleküllerin oksidasyonunu önleme veya yavaşlatma yeteneğine sahip moleküllerdir. Serbest radikalleri uzaklaştırarak veya kendileri oksitlenerek zincir reaksiyonlarını düşürmekte veya sonlandırmaktadırlar. Bu nedenle, antioksidanlar genellikle polifenoller veya tiyoller gibi indirgeyici ajanlardır [78].

Antioksidanlar enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar da ayrıca endojen ve ekzojen antioksidanlar olarak iki gruba ayrılmaktadır [81,82].

Başlıca antioksidan enzimler; CAT, SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz (GR), glutatyon oksidaz, GST, PON ve ARE'dir [15,78]. Bu enzimler, hücrelerde homeostazın korunmasında önemli rol oynamaktadır. Bu enzimlerin uyarılması, oksidatif strese spesifik bir yanıtı yansıtmaktadır [82,99]. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar arasında albümin, haptoglobin, seruloplazmin, transferrin, bilirubin, glutatyon, ubikuinon, lipoik asit ve ürik asit yer almaktadır. Askorbik asit (C vitamini), E vitamini, karotenoidler, polifenoller ve kininler ise ekzojen antioksidanlardandır [81].

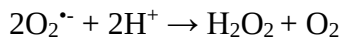
Bu moleküller, serbest radikallerin veya ROT'un oluşturduğu oksidatif reaksiyonları engelleyebilmektedirler. Bazı bileşikler redoks aktif metallerini şelatlayabilmekte veya belirli oksidatif enzimleri inhibe edebilmektedirler [81].

Antioksidan enzimlerin bozuklukları veya inhibisyonları oksidatif strese yol açmakta ve hücreler zarar görebilmektedir. Antioksidan savunma, serbest radikallerin üretiminin engellenmesi, oksidanların ortadan kaldırılması, serbest radikallerin daha az toksik maddelere dönüştürülmesi, ROT'un konsantrasyonunun azaltılması, toksik metabolitlerin üretiminin engellenmesi, zincir kırma reaksiyonları, zarar görmüş moleküllerin onarımı, endojen antioksidan savunma sisteminin başlatılması, geçiş metali katalizörünün şelatlanması gibi birtakım yollarla etkilerini göstermektedir [78,83].

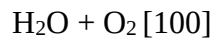
2.4.1. Katalaz

CAT (H_2O_2 oksidoredüktaz) (EC 1.11.1.6) esas olarak memeli hücrelerinin peroksizomlarında olmak üzere mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerde de bulunan bir metalloenzimdir. Her biri aktif merkezinde bir hem grubu ve bir NADPH içeren, 500 amino asit uzunluğunda dört polipeptid zincirinden oluşmaktadır [9,78,81,99-101]. ROT'a karşı ilk savunma hattını oluşturan SOD, $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'nin bir dismutasyon reaksiyonunda H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşümünü katalizleyerek bu radikalın etkisini azaltan bir antioksidan savunma sistemidir [77,83,84,100,101]. H_2O_2 daha sonra, CAT ya da glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından ortamdan uzaklaştırılmaktadır [100].

SOD

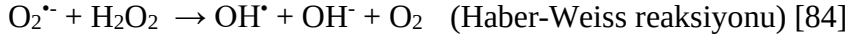
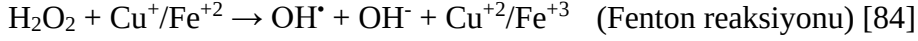


↓ CAT



H_2O_2 ile çok hızlı reaksiyona giren bir enzim olan CAT, 1 dk. da, H_2O_2 'nin yaklaşık 6 milyon molekülünü H_2O ve O_2 'ye ayrıştırmaktadır [9]. H_2O_2 çiftlenmemiş elektron içermediğinden radikal olarak isimlendirilmemektedir [76]. H_2O_2 , biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile spesifik olarak reaksiyon göstermemektedir [101].

H₂O₂, serbest radikal oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonuyla ve O₂^{•-} varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda H₂O₂'den, en güçlü ROT olan OH[•] oluşmaktadır [84,90].



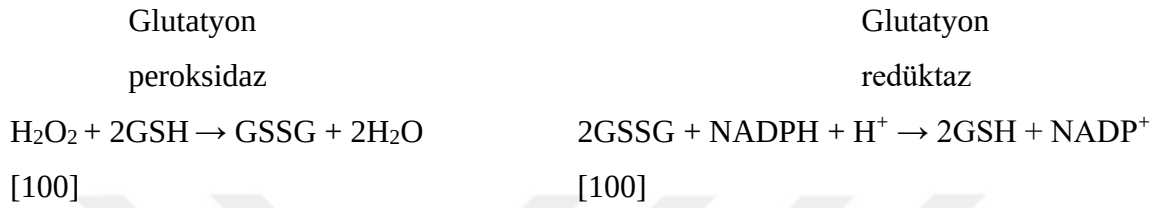
CAT, H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak iki enzimatik aktiviteye sahiptir. H₂O₂ konsantrasyonu yüksekse, CAT katalitik olarak etki etmekte, yani H₂O ve O₂ oluşturarak H₂O₂'yi uzaklaştırmaktadır. H₂O₂ konsantrasyonu düşük olduğunda ve etanol, metanol gibi uygun hidrojen donörlerinin varlığında, CAT peroksidaz aktivitesi sergileyerek bu bileşiklerin oksidasyonuna neden olmakta ve H₂O₂'yi uzaklaştırmaktadır [9,78].

H₂O₂, serbest bir radikal olmamakla birlikte, düşük miktarları hücre sinyal iletiminde, hücre ölümünde, mitokondriyal fonksiyon ve normal tiyol redoks dengesinin korunması gibi bazı fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır [77,84]. Nispeten düşük konsantrasyonda (10 µM) hücreye zarar verebilmektedir. Geçiş metali iyonlarının varlığında OH[•] üreterek DNA'ya zararlı etki gösterebilmektedir [77]. CAT hücrelerde H₂O₂ konsantrasyonunu sınırlayarak fizyolojik süreçlerde önemli bir antioksidan savunma enzimi olarak rol oynamaktadır [84]. İnflamasyon gibi oksidatif stresin eşlik ettiği birçok hastalıkta, CAT aktivitesinde azalma ortaya çıkmaktadır [9].

CAT aktivitesi, bakır sülfat (non-kompetatif inhibitör), siyanür (kompetatif inhibitör), 3-amino-1,2,4-tetrazol gibi kimyasallarla inhibe edilebilmektedir [9].

Glutasyon peroksidaz, H₂O₂'yi mitokondri ve sitozolde H₂O'ya parçalayan önemli bir antioksidandır. H₂O₂'den OH[•]'nin oluşmasını engelleyerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır [84]. Elektron kaynağı olarak GSH'ı kullanmaktadır. H₂O₂'yi ve organik hidroperoksitleri metabolize etmede rol oynamaktadır. Glutasyon peroksidaz'ın selenyuma bağımlı olan ve selenyuma bağımlı olmayan iki ana tipi vardır. Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz aktif bölgesinde selenyum içermektedir. H₂O₂ ve organik hiperoksitlere karşı etkilidir. Selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz ise başlıca organik hidroperoksitlerin metabolize edilmesinde etkilidir [100]. GSH bu reaksiyonlar sırasında,

hidrojen vericisi olarak hareket etmekte ve H_2O_2 ve hidroperoksitler indirgenirken, GSH okside olarak glutatyon disülfid (GSSG, oksitlenmiş glutatyon) oluşmaktadır. GSSG, NADPH'nin elektron vericisi olarak kullanıldığı reaksiyonla, flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir enzim olan GR enzimi tarafından GSH haline geri indirgenebilmektedir. Bunu, NADPH'nin bir elektronunu GSSG'nin disülfid bağlarına aktararak gerçekleştirmektedir [100,101].



Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan GSH, lipid peroksitlerin ve H_2O_2 'nin detoksifiyonunda ya da $^1O_2$ ve $OH^\bullet$ 'nin temizlenmesinde rol oynamaktadır. Tiyol grupları, serbest radikalleri yakalayıp işlev gören hücrel antioksidanlardır. Ayrıca, GSH, plazma membranında aminoasit transportunda, bazı önemli antioksidanların yeniden oluşturulmasında, C ve E vitaminlerinin düzenlenmesinde etkilidir. Biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır [101].

2.4.2. Glutatyon-s-transferazlar

GST (EC 2.5.1.18) enzimleri; memelilerde, balıklarda, böceklerde, kuşlarda, bitkilerde, mikroorganizmalarda, Annelid'de, Mollusk'ta, Planaria'da ve Crustacea'da yaygın olarak bulunmaktadır ve bu enzimlerin hayatın birçok formunda işlev gördüğü bilinmektedir [102-104]. GST, çok işlevli proteinlerin bir ailesini oluşturan büyük bir detoksifiye edici enzim grubunu temsil etmektedir. Sitotoksik ve genotoksik bileşiklerin hücrel detoksifikasyonunda ve dokuların oksidatif hasara karşı korunmasında rol oynamaktadırlar [78,105].

Her bir alt birimi 200-240 aminoasitten oluşan ve 20 000-25 000 dalton molekül ağırlıklığına sahip olan GST, GSH'nin çok çeşitli endojen ve ekzojen elektrofilik bileşiklere konjugasyonunu katalize eden Faz II detoksifikasyon enzimleri ailesidir [105-107].

GST, elektrofilik bileşiklerin GSH ile etkileşimlerini sağlayarak, hücrel makromolekülleri reaktif elektrofillere karşı korumaktadırlar. İlk kez sıçan karaciğerinde tanımlanmışlardır [106]. Bunun yanında böbrek, akciğer, meme, kas, plasenta, testis, dalak, ince bağırsak ve kalın bağırsak gibi organların sitozolünde ve membranında yaygın olarak bulunmaktadır [102-104]. GST, bu organların dışarıdan alınan ksenobiyotiklerle doğrudan temas içinde bulunmalarına bağlı olarak, organların sitozollerinde bulunan total protein içeriğinin %5'ini kapsamaktadır [103].

Ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonu sırasında faz I ve II aşamaları, lipofilik yapıdaki polar olmayan ksenobiyotiklerin suda çözünürlüklerini arttırarak daha az toksik bir metabolite dönüştürülmesini sağlamaktadır. Böylece hücreden eliminasyonları kolaylaşmaktadır. Faz II enzimleri, aktifleştirilmiş ksenobiyotiklerin GSH, UDP-glukuronik asit veya glisin gibi endojen, suda çözünür bir substrata konjugasyonunu katalize etmektedir. Kantitatif olarak, GST tarafından katalize edilen GSH'a konjugasyon, birçok türdeki ana faz II reaksiyonudur [102, 103,106,108].

Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan GSH, tiyol grubu içeren bir tripeptiddir. GST, ksenobiyotikleri GSH'daki tiyol grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize etmektedir. Oluşan metabolitlerin suda çözünürlükleri artmaktadır. Bu sırada GSH'dan koparılan glisin ve glutamik asit, sistein amino asidinin amino grubu ile asetillenmekte ve merkapturik asitlere dönüştürülerek safra yoluyla atılmaktadır [102]. Merkapturik asit detoksifikasyon metabolik yolunda son üründür. GST, merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizlemektedir. GSH ile endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofilik bileşikler bu basamakta bağlanmaktadır [104].

Bir dizi GST izoenzimi, konjugasyon reaksiyonlarına ek olarak, organik hidroperoksitlerin indirgenmesi ve çeşitli doymamış bileşiklerin izomerleştirilmesi de dahil olmak üzere GSH'a bağlı diğer katalitik reaksiyonlarda yer almaktadır [105]. Ayrıca taşıma proteinleri olarak da işlev görmektedirler [12]. Tüm GST enzimleri, GSH aktif bölgeye bağlandığında GSH'ın sülfhidril grubunun pKa'sını sulu çözeltide 9,0'dan yaklaşık 6,5'e düşürme kapasitesine sahiptirler. Bu, GST'nin katalitik aktivitelerinin temel dayanağını oluşturmaktadır. GSH, GST enzimi ile kompleksleştirildiğinde nötr pH'da tiyolat anyonu (GS^-) olarak bulunmaktadır [109].

GST; mikrozomal, sitozolik ve mitokondriyal olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadırlar [106].

Mikrozomal GST, sitozolik GST'den yapısal olarak farklıdır, tek bir aktif bölge oluşturmak için dimerleşmek yerine homo- ve heterotrimerize olmaktadır. Mikrozomal GST, birçok dokuda membrana bağlı olarak ve yüksek miktarlarda bulunmaktadır [103]. Peroksidaz aktiviteleriyle lipid peroksitlere karşı membran lipidlerinin korunmasında etkilidirler [106]. Mikrozomal GST, lökotrienlerin ve prostaglandinlerin endojen metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar [110]. Eikozanoid sentezinde yer alan GSH'a bağımlı transferaz ve izomeraz reaksiyonlarını katalizlemektedirler [102].

Sitozolik GST, pek çok endojen ve ekzojen elektrofilik bileşenin GSH ile konjugasyonunu katalizleyen her biri aktif bölge içeren dimerik yapıda proteinlerdir [102,103].

Mitokondriyal GST'nin ise katalitik aktivitede, taşıma fonksiyonlarında ve yağ asitlerinin β -oksidasyonunda etkili olduğu belirtilmektedir [102].

GST'nin substratları genel olarak, hidrofobik özelliğe sahiptirler ve elektrofilik merkezlerinde karbon içermektedirler. Bunun yanında bazıları azot, oksijen veya kükürt içermektedir [105,110]. GST'nin en yaygın substratları, elektrofilik merkeze sahip olan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'dir. GST aktivitesinin belirlenmesinde, CDNB'nin GSH ile konjugasyon reaksiyonu kullanılmaktadır [102].

GST'nin diğer görevleri arasında, hücrenin antikanser ilaçlara, herbisitlere ve pestisitlere karşı direncinin sağlanması, ligandların bağlanması ve taşınması, lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesi, tirozin katabolizması ve sinyal yollarının modülasyonu, steroid hormonların sentezi, testosteron ve progesteron biyosentezi, prostoglandin izomerizasyonu, hem'in, bilirubinin, safra tuzlarının, bazı ilaçların, boyaların ve kanserojenlerin taşınması, hidrofobik moleküllerin, demirin ve polisiklik hidrokarbonların hücre içine bağlanması ve transportu gibi çeşitli fizyolojik etkiler yer almaktadır [102-104].

2.4.3. Arilesteraz

PON, kolinesterazların güçlü inhibitörü olan paraokson'u hidroliz edebilen, başlıca karaciğerde sentezlenen, antioksidan özellikte bir ester hidrolazdır [13,15,111-114]. Enzim

kalsiyuma bağımlı aktivite göstermektedir [111,114]. PON gen ailesinin, insanlarda, 7q21.3-22.1 kromozomu üzerinde mevcut üç üyesi (PON1, PON2 ve PON3) bulunmaktadır. PON1 enzimi hem PON hem de ARE aktivitelerine sahiptir [115]. Lipoproteinleri oksidasyondan korumaktadır [15,115]. PON1 ve ARE'nin doğal substratları farklı olmakla birlikte PON1 enzimi ARE'nin doğal substratı olan fenil asetatı hidroliz edebilmektedir [111]. Böylece hem PON hem de ARE aktivitesi göstermektedir [116]. PON1 aktivitesi genetik olarak belirlenmektedir. PON1'de 55. (metiyonin/lösin) ve 192. pozisyonlarda (arjinin/glutamin) aminoasit polimorfizmi bulunmaktadır. Proteinin 192. pozisyonundaki arjinin aminoasidi yüksek-aktiviteli PON'u, glutamin aminoasidi ise düşük-aktiviteli enzimi belirtmektedir [112].

Oksidatif stres altında PON1 enzimi, hem LDL'yi, hem de HDL'yi oksidasyondan koruyucu etkiye sahiptir [13,111,113,116]. HDL'nin yapısında yer alan PON1, karaciğerde sentezlenerek dolaşıma verilmektedir. PON1, HDL lipidlerine N-terminal bölgesi aracılığıyla bağlanmaktadır. Bu bağlanmada apolipoprotein A1 (Apo A1) ve apolipoprotein J (Apo J) proteinlerinin rolü, PON1'i bağlayan HDL alt birimlerinin Apo A1 ve Apo J'yi içermesine dayandırılmaktadır [13]. HDL düzeylerinde azalma PON1'in HDL'nin yapısında bulunan bir antioksidan olması nedeniyle PON1 aktivitelerindeki azalmaya yol açmaktadır [111].

PON1'in, hücre membranlarında serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonuna karşı temel bir savunma oluşturduğu ve antiinflamatuvar özellik gösterdiği belirtilmektedir [111,113,114]. PON1, LDL yapısındaki oksidasyona uğramış poliansatüre yağ asitlerini hidroliz edebilmektedir. Ateroskleroz sırasında arteriyel duvar hücreleri tarafından üretilen başlıca reaktif oksijen metaboliti H_2O_2 'dir ve oksidatif stres sırasında LDL oksidasyonuna neden olmaktadır [13]. PON1, H_2O_2 gibi radikalleri nötralize ederek antioksidan etki göstermektedir [13,111,113]. Serum PON1'i oksidatif stresle inaktive olmaktadır [113]. Düşük PON1 aktivitesi ileri yaş, sigara içimi, ailesel hiperkolesterolemi, miyokard enfarktüsü, diyabet, hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği, koroner arter hastalığı ve artmış oksidatif stres ile ilişkilidir [111,114,116]. Plazma PON1 aktivitesinin 1M sodyum klorür (NaCl) varlığında arttığı, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) varlığında inhibe olduğu belirtilmektedir [13,117].

İnsan serumunun ARE'si (E.C.3.1.1.2) aromatik esteraz olarak da adlandırılmaktadır [117]. Aromatik karboksilik asit esterlerinden fenil asetat, ARE enziminin aktivite tayininde sıklıkla substrat olarak kullanılmaktadır [13,117]. Bunun yanında o- ve p-nitrofenil asetat, β -naftilasetat, vinilasetat ve tiyofenilasetat gibi aromatik esterler de hidrolize edilmektedir [117]. ARE, 4-aminoantipirin ve potasyum ferrisiyanit ile stabil bir indofenol boyası üretebilen fenolü serbest bırakmak için fenil asetat üzerine etki etmektedir [15]. ARE, aktivitesi için kalsiyum gerekmektedir, p-hidroksimerküribenzoat ve EDTA tarafından inhibe edilmektedir [117]. Bir tiyol enzimi olan ARE, 2-merkaptoetanol ve sistein ile reaktif edilebilmekte ancak GSH ile reaktif edilememektedir. Bu enzim oksidatif stresi azaltmada rol oynamaktadır [15].

2.5. Malondialdehit

Lipidler, polar ve apolar lipidler olarak sınıflandırılabilir. Polar lipidler, hücre zarlarının yapısal bileşenleridir. Trigliseridler gibi apolar lipidler ise, başlıca yağ dokusunda depolanarak memelilerde enerji depolanmasında rol oynamaktadırlar. Bununla birlikte diasilgliserol (DAG) ve inozitol trifosfatlar gibi sinyal molekülleri olarak da rol oynayan lipidler vardır [118].

Serbest radikaller hücre membranında bulunan serbest yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır [84,119]. Reaktif oksijen metabolitlerinin hücre membranında başlattıkları lipid peroksidasyonunun ürünleri, DNA harabiyetine yol açmaktadır [119].

Lipidleri etkileyebilen en yaygın iki ROT; $OH^\bullet$ ve hidroperoksil radikali ($HO_2^\bullet$)'dir. $HO_2^\bullet$, $O_2^{\bullet-}$ 'den çok daha güçlü bir oksitleyicidir ve çoklu doymamış fosfolipidlerin zincir oksidasyonunu başlatabilmekte, böylece membran fonksiyonunda bozulmaya yol açabilmektedir [118].

Lipid peroksidasyonu başlangıç, ilerleme ve sonuç aşamalarından oluşmaktadır. Başlangıçta $OH^\bullet$ gibi prooksidanlar tarafından yağ asidi zincirinden hidrojen atomları koparılarak poliansatüre yağ asitleri hidrojenini kaybetmekte, yağ asidi zinciri, bir lipid radikali özelliği kazanmaktadır [84,118,119]. İlerleme aşamasında, lipid radikali, oksijen ile hızla reaksiyona girerek bir lipid peroksi radikali ($LOO^\bullet$) oluşturmaktadır. Böylece $LOO^\bullet$ başka bir lipid

molekölünden hidrojeni ayırarak yeni bir lipid radikali ve açığa çıkan hidrojeni bağlayarak lipid hidroperoksit (LOOH) oluşturmaktadır [84, 118]. Sonuç reaksiyonunda, E vitamini gibi antioksidanlar, LOO[•] türlerine bir hidrojen atomu vererek, radikal olmayan ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır [118,119]. Lipid peroksidasyonunun ana ürünleri LOOH'lardır. Lipid peroksidasyonunun en mutajenik ürünü MDA iken en toksik ürünü 4-HNE'dir [118].

Lipid peroksitlerin en çok bilinen aldehid formları, MDA gibi TBA reaktifleridir. MDA, araşidonik asidin oksijenasyonu ya da poliansature yağ asitlerinin enzimatik ya da enzimatik olmayan oksidatif yıkımı sonucu oluşmaktadır [17,120]. MDA'nın lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterdiği belirtilmektedir [84].

MDA, TBA ile kolay reaksiyonu nedeniyle, lipid peroksidasyonunda hücrel hasarın derecesini ölçmede bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [17,118]. Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu için uygun bir biyobelirteçtir [84]. Bunun yanında MDA'nın haberci sinyalcisi ve gen ifadesini düzenleyici olarak hareket edebileceği de söylenmektedir [121]. MDA'nın Alzheimer hastalığı, diyabet, karaciğer hastalıkları, kanser, Parkinson ve kardiovasküler hastalıklar gibi farklı hastalıklarda düzeylerinin arttığı belirtilmektedir [84].

MDA, tromboksan A2'nin biyosentezi sırasında enzimatik işlemlerle bir yan ürün olarak *in vivo* üretilmektedir. Tromboksan A2, araşidonik asidin biyolojik olarak aktif bir metabolitidir [118].

MDA'nın reaktivitesi, pH'a bağlıdır. Fizyolojik pH'da düşük reaktiviteye sahip enolat iyonu olarak bulunurken, düşük pH'da β -hidroksiakrolein olarak bulunmakta ve reaktivitesi artmaktadır. MDA'nın yüksek reaktivitesi esas olarak elektrofiliğine dayanmakta ve bu da onu temel amino asit kalıntıları gibi nükleofillere karşı güçlü bir şekilde reaktif hale getirmektedir. MDA ile serbest amino asitler veya proteinler arasındaki ilk reaksiyonlar, schiff bazlı eklentiler oluşturmaktadır [122].

MDA, DNA hasarı ve mutasyonuna önemli bir katkıda bulunmaktadır. Onarım olmadığında, MDA-DNA eklentileri mutasyonlara (nokta ve çerçeve kayması), iplik kopmalarına, hücre döngüsü durmasına ve apoptozun uyarılmasına yol açabilmektedir [118].

MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girme, amino grupları arasında çapraz bağlanmalara yol açma, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyona yol açarak esneklik, enzimatik aktivite, iyon transportu ve hücre yüzey determinantlarının agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirme yetenekleriyle mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkiler gösterebilmektedir [17,119].

2.6. Oksidatif Stres

2.6.1. Oksidatif stres ve yardımcı üreme teknikleri

Serbest radikaller oositler, spermiler ve embriyolar üzerinde etkilidir [123]. Yardımcı üreme teknikleri sırasında ROT, ortamda bulunan çoklu oositlerden, büyük kümülüs hücre kütesinden veya dölleme için kullanılan spermatozoadan da kaynaklanabilmektedir [71,89,124]. Oksidatif stres, insan oositlerinde hücre içi kalsiyum homeostazı, oosit olgunlaşması ve dölleme üzerine olumsuz etkilere sahip olabilmektedir. Foliküller içinde ROT, ovulasyon sırasında üretilmekle birlikte ROT'un aşırı üretimi, duvar rüptürünü teşvik ettiği için zayıf oosit kalitesi riskini artırabilmektedir [123]. Oosit olgunlaşması ve embriyo gelişimi, ROT artışından veya antioksidan savunmanın azalmasından etkilenmektedir [89]. Foliküler oksidatif stresin oosit olgunlaşması, dölleme ve gebelik üzerindeki etkileri üzerine araştırmalar yapılmıştır [125]. Preimplantasyon embriyo kültürü ortamında 24 saatlik inkübasyon sonrası, düşük kaliteli embriyolar, total antioksidan kapasitede azalma ve ROT üretiminde artış ile ilişkilendirilmiştir [126]. Bunun yanında gebe kalmamış hastalarda ROT düzeylerinin gebe kalanlara göre anlamlı derecede düşük olduğunu bildiren çalışmalar da vardır [127]. Oksidatif stres embriyo içinde enerji üretiminde rol alan enzimlerin aktivitesini engelleme yeteneğine sahiptir. ROT seviyelerindeki artış, gliseraldehid-3 fosfat dehidrojenazı inaktive ederek ATP üretiminde azalmaya neden olabilmektedir. Oksidatif stres, mitokondriyal DNA bozulmasına neden olarak ATP içeriğini azaltmaktadır [89].

Yardımcı üreme teknikleri sırasında, *in vitro* ortamda gametler ve embriyolar, ROT'un suprafizyolojik seviyelerine maruz kalmaktadır. Yardımcı üreme teknikleri ortamında, fizyolojik savunma mekanizmalarının bulunmamasından dolayı ve potansiyel ROT kaynaklarının sayısına bağlı olarak oksidatif stresin etkileri artabilmektedir [89]. Oosit kalitesini etkileyen oksidatif stres miktarı antioksidan konsantrasyonu ve oksidatif stres biyobelirteçleri ile değerlendirilebilmektedir [123].

Endojen ya da ekzojen üretilen ROT, oosit ve embriyoyu etkileyebilmektedir. IVF kültür ortamı, ROT oluşumuna neden olabilen ekzojen bölgedir [71]. Normalde *in vivo* döllenme ve gebelik sırasında mevcut olan enzimatik antioksidanların koruması, *in vitro* ortamda olmadığından gamet ve embriyolar aşırı ROT'a maruz kalmaktadır [123].

Kültür ortamında bulunan oksijen konsantrasyonu, ışığa maruz kalma ve metalik katyonların varlığı ROT üretimini artırabilecek faktörlerdir [124]. Bu faktörlerden en önemlisi pO_2 'dir. *In vitro* kültür ortamındaki hücreler, *in vivo* koşullara göre hiperoksik bir ortama maruz kalmaktadır. Bu hiperoksik ortam, hücrelerdeki çeşitli oksidaz enzim sistemlerini aktive etmekte ve ROT üretiminin artmasına katkıda bulunmaktadır. ROT üretiminin artışına neden olabilecek diğer bir çevresel faktör de görünür ışıktır. Görünür ışık fotodinamik stresi uyarmakta ve doymamış lipidlerin ve membran sterollerinin oksidatif hasarına yol açmaktadır [89]. Metal iyonları bazen oksidanların üretilmesine neden olabilmektedir [71]. Bileşimlerinde demir ve bakır gibi metalik iyonların bulunduğu ticari kültür ortamlarında ROT üretebilmektedir. Bu iyonlar Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarına katılarak hücre içinde ROT oluşumunu hızlandırma potansiyeline sahiptir [89]. Oksidanların üretimini azaltmak için kültür ortamına metal iyonu kenetleme maddelerinin eklenmesi yararlı olabilmektedir [71].

Bunların dışında, kültür ortamına yaygın olarak eklenen serum preperatları bir diğer ROT üretim kaynağıdır. Bu serum preperatları yüksek seviyelerde amin oksidaz içermektedir. Böylece H_2O_2 üretiminde artışa neden olmaktadır [89].

2.6.2. Oksidatif stres, oosit ve kümülüs hücreleri

Kümülüs hücreleri, oosit ile ekstra foliküler mikro ortam arasında köprü ve bariyer görevi görerek oositin korunmasında etkilidirler. Kümülüs hücreleri oositin ihtiyaçlarını desteklemekle birlikte gameti zararlı koşullardan da korumaktadırlar [8]. Ovulasyon sırasında, olgunlaşan oosit, etkili bir ATP kaynağı olarak serbest yağ asitlerinin mitokondriyal oksidasyonu yoluyla fazla miktarda enerji elde etmektedir [63]. Oosit içindeki aşırı yağ asidi birikimi endoplazmik retikulum stresini ve hücre ölümünü teşvik eden ROT birikimini uyarma yoluyla hücre fonksiyonlarında toksisite gösterebilmektedir [8]. Foliküler mikro çevrede, serbest yağ asitlerindeki artışın, toksisite göstermesinden dolayı, zayıf kümülüs-oosit kompleksi morfolojisi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir [128]. Foliküldeki artan

kortizol seviyelerinin, oosit olgunlaşması ve döllenmeyle ve bazı IVF ile ilişkili gebelik sonuçlarıyla pozitif yönde ilişkili olduğu belirtilmektedir [129-132].

Kümüls hücresi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan korumalara da katkıda bulunarak oositi ROT ve oksidatif stres kaynaklı apoptozdan korumaktadır [8]. Evre III/IV endometriozisi olan infertil hastalarla yapılan bir çalışmada, intrastoplazmik sperm enjeksiyonu için kontrollü ovaryum uyarımı sonrası klinik gebelik elde eden hastaların kümüls hücrelerinde, süperoksid dismutaz1 (SOD1) ekspresyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir [133].

Olumsuz koşullarda kümüls hücresi bazen oositi folikül sıvısındaki değişikliklere karşı koruyamamaktadır. Bazı zararlı faktörler kümüls hücrelerinin, onları nötralize etme kapasitesini aştığında oosit kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir [8]. Kümüls hücrelerinin düşük H_2O_2 ve $OH^\bullet$ konsantrasyonlarını nötralize edebileceği, fakat yüksek H_2O_2 ve $OH^\bullet$ konsantrasyonlarında kümüls hücrelerinin sayısında ve canlılığında azalma, antioksidan yanıtta bozulma olduğu ve oositlerin hasara daha duyarlı hale geldiği gözlenmiştir. $HOCl$ 'nin ise konsantrasyondan bağımsız olarak oositlere ve kümüls hücrelerine zararlı etkili olduğu belirtilmektedir [134].

Yaşlanmayla birlikte ROT üretiminin artması ve antioksidan savunmanın bozulmayla, kümüls hücresi oositleri zararlı etkenlere karşı korumada yetersiz kalabilmektedir. Bu durumda mitokondriyal fonksiyon bozulmakta, oksidan üretimi artmakta, ATP üretimi azalmakta, oosit/embriyonik anöploidi ve subfertilite uyarılabilmekte, mayotik gecikme, genomik kararsızlık görülmektedir. Kümüls hücrelerinin ve oositlerin fonksiyonları bozulmaktadır [8,63].

2.6.3. Oksidatif stres ve kadın üreme sistemine etkisi

ROT birçok hastalığın oluşmasında rol oynamaktadır. Dişi üreme sistemine de fizyolojik ve patolojik açıdan etkilidir [71]. ROT'un ovaryumlar, fallop tüpleri ve embriyoların dahil olduğu üreme sistemine etkisi çok sayıda insan ve hayvan çalışmasında gösterilmiştir [135-137]. ROT, oosit olgunlaşması, ovaryum steroidogenezi, korpus luteal fonksiyon ve luteoliz gibi fizyolojik üreme fonksiyonlarının tümünün düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Oksidatif stres luteal gerilemeye yol açmaktadır [71]. Tekrarlayan düşüklere ve luteal faz

defektleri olan kadınlarla sağlıklı kadınların antioksidan konsantrasyonları karşılaştırılmış, tekrarlayan düşükleri ve luteal faz defektleri olan kadınların antioksidan konsantrasyonları anlamlı derecede düşük bulunmuştur [138]. Luteal faz defekti olan hastalara C vitamini takviyesi yapılmış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında C vitamini takviyesi yapılan grupta gebelik oranları daha yüksek bulunmuştur [139].

Oksidatif stresin kadınlarda folikülogenez ve oosit olgunlaşması gibi üremeyle ilgili bir dizi süreci olumsuz yönde etkilediği ve endometriozis ve defektif embriyo gelişimi gibi üreme sorunlarına yol açtığı belirtilmektedir. Oksidatif stres hücre membranına zarar verebilmekte, embriyo gelişimini geciktirebilmekte ve hücrel apoptozu uyatabilmektedir. Ayrıca, embriyo transferinden sonra da oksidatif stres etkili olabilmektedir [89,124].

Kadın infertilitesinde, oksidatif stresin doğurganlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir [140]. Oksidatif stres, kadın yaşamında menopoz dönemi de dahil tüm üreme sürecini etkilemektedir [71]. Doğurganlıkta yaşa bağlı düşüşün oksidatif stres tarafından düzenlendiği öne sürülmüştür [141]. Kadın infertilitesinde patolojik süreçte rol oynayan lipid hasarı, protein sentezinin inhibisyonu, ATP'nin tükenmesi ve toplam antioksidan kapasite IVF sonrası oosit fertilizasyonu ve gebelik oranları ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [89,142]. ROT konsantrasyonları ayrıca oositlerin implantasyonunda ve döllelenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [71].

Oksidatif stres, sitokinler ve kadın üreme sistemine etkisi

Ovaryum fonksiyonlarının düzenlenmesini ve steroidogenezi etkileyen otokrin ve parakrin faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerden olan sitokinler, lökositler tarafından hücre dışı alana salgılanan polipeptitler veya glikoproteinlerdir [143]. Embriyonun endometriyuma implantasyonunu desteklemek için gerekli olan koşulları oluşturmaktadırlar. Sitokinler ve anjiyogenez faktörleri arasındaki denge başarılı bir implantasyon ve gebeliğin devamı için gereklidir [144].

Defektif plasenta, iskemi-reperfüzyon hasarına yol açmaktadır. Oluşan oksidatif stres, sitokinlerin ve prostaglandinlerin salınımını uyarak endotelial hücre fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır. Böylelikle preeklampsi gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır [71].

Endometriozisde mononükleer fagositlerin aktivasyonu uyarılabilmektedir [71]. Plazma sitokini olan TNF- α 'nın periton sıvısındaki konsantrasyonları ile endometriozis arasında ilişki olduğu belirtilmektedir [143]. Ovaryum endometriomalarından elde edilen ektopik endometriyal dokuda ölçülen MDA düzeyleri ile plazma 17- β östradiol düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır [145].

2.6.4. Oksidatif stres ve üreme hastalıkları

Oksidatif stres endometriozis, PKOS ve açıklanamayan infertilite gibi üreme hastalıklarına neden olmaktadır. Oksidatif strese yanıt olarak gelişen gebelik komplikasyonları arasında ise tekrarlayan gebelik kaybı, spontan düşük ve preeklampsi sayılabilmektedir [123].

Oksidatif stres ve endometriozis

Endometriozis, uterus dışında endometriyal dokunun varlığı ile karakterize östrojene bağımlı, iyi huylu, kronik, jinekolojik bir hastalıktır [123].

ROT düşük oosit ve embriyo kalitesine aracılık ederek endometriozisli hastaların yaşadığı subfertiliteye katkıda bulunabilmektedir. Endometriozisli hastalar, hastalığı olmayan kadınlardan daha düşük gebelik oranlarına sahip olma eğilimindedir [123]. Endometriumda geç salgı evresinde SOD aktivitesi azalırken, ROT seviyeleri artmaktadır. Bu değişikliklerin menstrüasyon ve endometriyal dökülme oluşumunda önemli olduğu belirtilmektedir [71].

ROT, hücre proliferasyonunda etkili inflamatuvar aracılardır. Aynı zamanda endometriozis de kronik inflamasyonla ilişkilidir. Periton boşluğunda ROT üretiminin ve oksidatif stresin artmasında endometriotik hücrelerin etkili olduğu bilinmektedir [8]. Endometriozisli hastaların periton sıvısının yüksek konsantrasyonlarda MDA, proinflamatuvar sitokinler ve anjiyojenik faktörler içerdiği belirtilmektedir. Proinflamatuvar ve kemotaktik sitokinler, ROT'un ana üreticileri olan fagositik hücrelerin alımında ve aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır [146].

Demir, Fenton reaksiyonu yoluyla ROT üretimine aracılık ederek oksidatif stresi uyarmaktadır. Retrograd menstrüasyon kaynaklı olarak endometriozisli hastaların peritonunda endometriotik lezyonlar etrafında demir ve hem birikmektedir. DNA demir ve hem tarafından parçalanmaktadır. Hastalığın gelişiminde endometriotik lezyonlarda demir

birikmine bağı kronik oksidatif durumlar önemli etkiye sahiptir [123]. Endometriozisli dişilerden alınan periton sıvısının oositlerde mikrotübül ve kromozom anormalliklerini desteklediğı ve bu durumun ortama antioksidan ilavesiyle azaltılabildiğı belirtilmektedir [147].

Oksidatif stres ve polikistik over sendromu

PKOS, üreme çağındaki kadınlarda sık görülen, hiperandrojenizm, ovulasyon fonksiyonunda bozulma ve polikistik ovaryumlar ile karakterize endokrin ve metabolik bir durumdur. PKOS'lu kadınların %90'ı gebe kalamamaktadır [4,123]. PKOS sıklıkla obezite, dislipidemi, hiperandrojenizm, insülin direnci, metabolik sendrom, LH hipersekresyonu ve anovülasyonla ilişkilidir [8].

PKOS hastalarında, kümülüs hücrelerinin mitokondriyal ROT üretiminde artma, antioksidan kapasitelerinde azalma olduğı ve oksidatif streste artış olduğı belirtilmektedir [148]. PKOS'da görülen mitokondriyal fonksiyon bozukluğu; artmış ROT üretimi ile birlikte mitokondriyal oksijen tüketimi ve GSH düzeylerindeki azalmaya bağlanmaktadır [149].

Obez ve zayıf PKOS'lu kadınların mononükleer hücrelerinde ROT üretiminin arttığı görülmüştür. Bu kadınlarda ROT kaynaklı oksidatif stresin hiperandrojenizmden ve insülin direncinden sorumlu olabileceğı belirtilmiştir [150,151]. PKOS'lu kadınlar kontrollerle karşılaştırıldığında oksitlenmiş proteinlerin serum konsantrasyonunda artış, antioksidan seviyelerinde azalma ve MDA düzeylerinde artış görülmüştür [150,152]. DNA'nın oksidatif stres kaynaklı hasara duyarlılığı PKOS'lu kadınlarda yükselmiştir [153].

PKOS'da GSH seviyelerinde azalma ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu görülmüştür [149].

Oksidatif stres ve açıklanamayan infertilite

Açıklanamayan infertilite, bilinen infertilite nedenlerinin dışlandığı çiftlerde 12 ay korunmasız ilişkiden sonra gebe kalmama olarak tanımlanmaktadır. Açıklanamayan infertilitenin patofizyolojisi belirsizliğini korumakla birlikte oksidatif stres ve folat metabolizması bozuklukları gibi bazı nedenlere bağı olabileceğı belirtilmektedir. Bu

duruma, periton boşluğunda özellikle MDA'nın artmış seviyelerinin olası bir katkı sağladığı önerilmektedir [123,154].

Folat, amino asit metabolizmasında ve lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin metilasyonunda rol oynayan, üreme için çok önemli bir vitamindir. Edinilmiş veya kalıtsal folat eksikliğinde homosistein birikimi görülmektedir. Folat metabolizmasıyla ilgili yollardaki genlerde görülen polimorfizmler, homosistein düzeylerinde değişikliklere neden olarak homeostatik durumu bozmaktadır. Folat metabolizması bozukluğu endometriyal olgunlaşmanın ve oosit kalitesinin de bozulmasına neden olmaktadır [123].

Yapılan çalışmalar, ROT'da artma ve antioksidanlarda azalmanın açıklanamayan infertiliteye katkıda bulunabileceğini göstermektedir [99,154]. Patolojik koşullar, ilaç tedavisi veya çevresel değişiklikler gibi etkenlere bağlı olarak ROT üretiminde artış antioksidan aktiviteyi baskılayarak apoptozu uyurabilmekte ve oosit kalitesinde bozulmaya, implantasyon başarısızlığına, embriyo gelişiminin önlenmesine, korpus luteum tarafından steroid üretiminin inhibe edilmesine neden olabilmektedir [99].

Oksidatif stres ve gebelik komplikasyonları

Gebelik sırasında plasenta besin, oksijen ve hormon değişimlerinin gerçekleştiği maternal-fetal bağlantı olarak rol oynamaktadır. Bunun yanında gelişmekte olan fetüse karşı koruma ve bağışıklık sağlamada etkilidir. Tekrarlayan gebelik kaybı olgularının %50'sinde nedensel faktörler tanımlanmakla birlikte, geri kalan %50'sinde tanımlanmış bir neden yoktur [123]. Yapılan çalışmalarda tekrarlayan gebelik kaybının etyolojisinde oksidatif stresin rolü olduğu belirtilmektedir [155,156].

Spontan düşük oluşum nedenlerinden biri olarak oksidatif stres gösterilmektedir. Normal gebelikte plasenta 10-12 hafta arasında oksidatif bir patlama yaşamaktadır. Sonrasında oksidatif stres antioksidan aktivitenin artması üzerine taban seviyesine geri dönmektedir [123]. Gebelik esnasında oksidatif stres çok erken gelişirse plasenta gelişiminin bozulmasına neden olabilmekte, sinsityotrofoblastik dejenerasyonu arttırabilmekte ve idiyopatik tekrarlayan gebelik kaybına yol açabilmektedir [157,158]. İdiyopatik tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda MDA seviyelerinde artış, glutatyon peroksidaz, SOD ve CAT seviyelerinde anlamlı düzeyde düşüş gözlenmiştir [159].

Uterus natural killer (NK) hücrelerinde artışın gebelikte erken dönemde oksidatif stresi önemli ölçüde artırdığı öne sürülmüştür. Bunu, implantasyon öncesi anjiyogenezi arttırarak, erken gebelikte plasenta içi maternal dolaşıma yol açarak yaptıkları belirtilmektedir [160].

Preeklampsi erken başlangıçlı veya geç başlangıçlı olabilmektedir. Sürekli olmayan plasental perfüzyona ve düşük seviyeli iskemi-reperfüzyon hasarına neden olan yetersiz spiral arter dönüşümünün preeklampsi’de oksidatif stresin nedenleri olabileceği belirtilmektedir [123,161].

Preeklampside görülen vazokonstriksiyonun ve hipertansiyonun nedeni olarak, dolaşımdaki vazokonstriktör etkili H_2O_2 ’nin artması ve vazodilatatör etkili NO ’nun azalması gösterilmektedir. Nötrofil modülasyonu, preeklampside, $O_2^{\cdot-}$ üretiminin artmasına ve NO salınımının azalmasına neden olarak endotelial hücre hasarına yol açmaktadır [123].

NADPH oksidaz ailesinin üyelerinin, aktivasyonu yoluyla artan $O_2^{\cdot-}$ üretimi bazı vasküler hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır [123]. Preeklampitik hastalarda SOD ve CAT gibi antioksidanlarda azalma olduğu bildirilmiştir [161]. Özellikle 6 ve 8 haftalık gebeliklerde, aktif plasental NADPH, fazla miktarda $O_2^{\cdot-}$ üretimine neden olmaktadır [123]. Preeklampitik kadınlar, hastalığı olmayanlara göre daha yüksek NADPH ekspresyonu sergilemiştir [162].

PON1 maternal serumda lipid peroksidasyonunun önlenmesinde etkilidir. Preeklampsili hastalarda PON1 düzeylerinin yüksek olduğunun gösterilmesi, PON1’in oksidatif stres patogenezinde katkıda bulunduğunu düşündürmekle birlikte klinik semptomların varlığında ve şiddetli preeklampsili hastalarda PON1 düzeylerinin önemli ölçüde azalmış olduğunu gösteren çalışmalar da vardır [163-166].

Yenidoğanların %10’unu etkileyen rahim içi büyüme kısıtlaması, 10. persentilin altındaki bebek doğum ağırlığı olarak tanımlanmaktadır. Rahim içi büyüme kısıtlaması hastalarının uygunsuz spiral arteriol gelişimine sekonder plasental iskemi/reperfüzyon hasarı nedeniyle oksidatif stres geliştirdiği belirtilmektedir [123].

Preterm doğum 37. gebelik haftasından önce ortaya çıkmaktadır ve antioksidan savunmada ROT kaynaklı azalmaya bağlı olarak oluşabileceği belirtilmektedir [123]. Hem term hem de

preterm doğum yapan kadınlarda glutatyon peroksidaz protein ekspresyonunun, belirgin şekilde azaldığı bildirilmiştir [167]. Erken doğum yapan kadınlarla term doğum yapan kadınların karşılaştırıldığı bir çalışmada, erken doğum yapan kadınların kanında belirgin şekilde daha yüksek MDA ve 8-OHdG seviyeleri ve anlamlı derecede daha düşük GSH seviyeleri tespit etmişlerdir [168].

2.6.5. Oksidatif stres ve doğurganlığı etkileyen diğer faktörler

Yaş, vücut ağırlığı, sigara, alkol, uyuşturucu ve çevresel kirleticiler gibi faktörler oksidatif stresi tetikleyerek doğurganlığı etkilemekte ve infertilitede artışa yol açmaktadır [123].

Oksidatif stres ve kadın yaşı

Yaşlanma, organ ve doku fonksiyonlarının kademeli kaybı olarak tanımlanmaktadır. Düşük kaliteli oositlerin, yaşa bağlı işlev bozukluklarıyla birlikte mtDNA hasarı ve kromozomal anöplöide artış gösterdiği belirtilmektedir. Bu değişiklikler, iyon kanallarının açılmasıyla ortaya çıkan kalsiyum homeostazı kaybına bağlı olarak aşırı ROT'dan kaynaklanabilmektedir. Yaşlı kadınların granüloza hücrelerinde koenzim Q10'a bağlı mitokondriyal solunum aktivitesinin azaldığı belirtilmektedir [4,123].

Kadınlarda folikül sayısı ve kalitesi yaşa bağlı olarak azalmaktadır. Yaş artışıyla birlikte görülen oosit kalitesinde azalma, beraberinde, çocuklarda konjenital anomali insidansında artışı da getirmektedir [71].

Oksidatif stres, özellikle menopoza sonra yaşla birlikte artmaktadır. Adet sıvısının menopoza sonrası kesilmesi, vücuttaki demir seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Yüksek demir depoları oksidatif dengesizliği uyarmaktadır. Bu durumun, menopoza sonrası kalp hastalığı insidansındaki artışla ilişkili olduğu belirtilmektedir [123].

Oositlerde yaşlanma, implantasyondan önce ve sonra, embriyo gelişimiyle ilgili biyokimyasal yollara etkilidir. Östrojen LDL üzerinde antioksidan etkilidir. Menopozda östrojen kaybı nedeniyle oksidatif stres ortaya çıkmaktadır [71].

Oksidatif stres ve vücut ağırlığı

Maternal obezite, düşük kilo, düzensiz hormon ve adetler doğurganlık üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Maternal obezite; gestasyonel diyabet, preeklampsi ve PKOS gibi çeşitli üreme patolojileri ile ilişkilendirilmektedir [123].

Obezitenin infertilite ile ilişkili olduğu ama infertilite patofizyolojisindeki etkisinin net olarak bilinmediği aynı zamanda yardımcı üreme tekniklerinin sonuçlarını da zayıflatığı belirtilmektedir [8]. Obezite oosit morfolojisinde ve döllenmesinde, bozulmaya neden olabilmektedir. Özellikle 35 yaş altı kadınlarda embriyo kalitesini ve canlı doğum oranını bozduğu belirtilmektedir [63].

Kendi oositini kullanan ve donör oosit kullanan obez kadınların normal kilolu kadınlarla gebe kalma olasılığı karşılaştırılmıştır. Kendi oositini kullanan obez kadınların normal kilolu kadınlara göre gebe kalma olasılığı daha düşükken, donör oosit kullanan obez kadınların gebe kalma olasılığının normal kilolu bireylerle aynı olduğu belirtilmiştir [169]. Obez kadınlardan elde edilen olgun oositlerle normal VKİ'ne sahip kadınların oositleri karşılaştırıldığında, obez kadınların oositlerinin daha küçük, anormal iğ ve yanlış kromozom hizalanmasına sahip oldukları gösterilmiştir [170,171].

Hücre içi lipid birikimi mitokondriyal fonksiyonu bozarak, elektron transport zinciri (ETZ)'nden elektron sızıntısına neden olabilmektedir. Yüksek lipid seviyelerinin ve oksidatif stresin kombine etkisi, oksitlenmiş lipidlerin üretimini uyarmaktadır [123].

Total foliküler serbest yağ asiti seviyelerinde artış kötü kümülüs-oosit kompleksi morfolojisi ile ilişkilidir [63]. Obez dişi farelerde kümülüs hücresi-oositlerde lipid içeriğinde artış, oksidatif stresi, hücrel apoptozu ve oositlerdeki mayotik kusurları, döllenmede bozulmayı, blastosist sağkalımında düşüşü ve fetal büyümede anormallikleri uyarmaktadır [172-175].

Embriyonik dönemde yetersiz anne beslenmesi de fetal büyümeyi olumsuz yönde etkilemektedir. İn-utero yetersiz beslenme, NO⁺ depolarını azaltmakta ve endotele bağlı vazodilatasyon bozukluğuyla birlikte oksidatif stresi tetiklemektedir [123]. 8-OHdG ve MDA konsantrasyonları hem düşük VKİ'li hem de obez kadınlarda, normal VKİ olanlara kıyasla çarpıcı bir şekilde yükselmiştir [176,177]. Özellikle kritik embriyonik ve fetal

gelişim dönemlerinde annenin yetersiz beslenmesine bağlı olarak ortaya çıkan yüksek düzey ovaryum oksidatif stresi, bozulmuş mitokondriyal antioksidan savunmadan, azalmış folikül sayılarından ve folikül büyümesinden sorumlu tutulmaktadır [178].

Steroid hormon sentezine yağ dokunun dahil olması, obez bireylerde bu hormonların oosit olgunlaşmasını ve yeterliliğini etkilemesine neden olabilmektedir [8]. Obez kadınlarda insülin konsantrasyonunda ve insülin direncinde artışın, steroid hormon bağlayıcı globulin (SHBG) düzeylerinde azalma ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [179]. Artmış insülin, LH reseptörlerinde ve LH salgılanmasında da yükselmeye, ovulasyonda ve oosit olgunlaşmasında bozulmaya neden olmaktadır [180].

Tip II diyabet de obezite ve insülin direnci ile ilişkilidir ve bu hastalıkta kan şekerinde ve insülin düzeylerinde yükselme görülmektedir. Artan glikoz düzeyleri de, ROT üretiminde artışa, antioksidan düzeylerinde azalmaya neden olmaktadır. Hiperglisemi, kümülüs-oosit kompleksinde gap junctionlar yoluyla iletişimi bozmakta, kümülüs hücreleri ve oositlerde mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına, granüloza hücrelerinde apoptoza ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır [8].

Oksidatif stres ve sigara

Sigara dumanında, ROT üretimiyle ilişkili birçok toksik madde bulunmaktadır. Sigara toksisitesinden sorumlu olduğuna inanılan temel bileşenler, nikotin ve benzo a-pirendir. Solunan sigara dumanı, partikül (katran) fazı ve gaz fazı olmak üzere iki fazdan oluşmaktadır. $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve $OH^{\cdot}$ gibi ROT, suda çözünebilen katran bileşenleri tarafından oluşturulmaktadır. $NO^{\cdot}$, gaz fazında bulunmaktadır. $NO^{\cdot}$ 'nun aşırı üretimi, $ONOO^{\cdot-}$ oluşumuna neden olmaktadır [123].

Kadınlarda sigara maruziyeti, infertiliteye, gebelik komplikasyonlarına, embriyoda hasara ve düşük riskinde artışa neden olabilmektedir [123]. Sigara metabolitlerine intrafoliküler maruziyetin, foliküler lipid peroksidasyonunda anlamlı bir artış ve antioksidatif potansiyelde anlamlı bir azalma ile ilişkili olduğu gözlenmiştir [181]. Sigara dumanına maruziyet dahi oosit kalitesinde ve gebelik oranlarında düşmeye neden olabilmektedir [182,183]. Gebelik sırasında sigara içmenin lipid peroksidasyonunu uyardığı belirtilmektedir. Sigara içenlerde sigara içmeyenlere kıyasla antioksidan konsantrasyonlarında azalma olduğu gösterilmiştir

[184]. Sigara içmek ovaryum fonksiyonu üzerinde uzun süreli ve doza bağımlı yan etkiler oluşturmaktadır. Sigara içme faktörünün ortadan kaldırılmasının doğurganlığın ve yardımcı üreme tekniklerinin sonuçlarının iyileştirilmesine yardımcı olacağı belirtilmektedir [71].

Oksidatif stres ve alkol

Gebelik esnasında orta dercede alkol kullanımı rahim içi büyüme kısıtlaması ve düşük doğum ağırlığına neden olabilmenin yanı sıra konjenital anomali riskini de artırabilmektedir. Ayrıca alkol kullanımı erken gebelik kaybı ve spontan düşüklere de neden olabilmektedir. Alkolün yaşa bağlı infertiliteyi şiddetlendirebileceği belirtilmektedir [123,183].

Etanolün, hepatik metabolizması oksidatif bir mekanizma yoluyla gerçekleşmekte ve bu sırada ROT oluşmaktadır. Düzenli alkol kullanımı, aşırı ROT üretilmesine, lipid peroksidasyonunun uyarılmasına ve SOD ve GSH seviyelerinin azalmasına yol açmaktadır. Etanol metabolizması tarafından uyarılan oksidatif stres, AGE'nin üretimini uyarabilmektedir [123,185].

Oksidatif stres ve uyuşturucu

Dünya çapında en yaygın kullanılan eğlence amaçlı uyuşturucu olan esrarın aktif bileşenleri kannabinoidlerdir. Ovaryum ve uterus gibi kadın üreme organlarında endokannabinoid reseptörleri saptandığı belirtilmektedir. Esrar oogenezi, implantasyonu ve embriyo gelişimini engelleyerek kadın üremesini etkileyebilmekte ve spontan düşüklere katkıda bulunabilmektedir [123].

Kokain yüksek derecede bağımlılık potansiyeline sahip, güçlü uyarıcı bir maddedir. Gebelik sırasında kullanımının düşük doğum ağırlığı, prematürite, rahim içi büyüme kısıtlaması ve düşük yapma gibi olumsuz sonuçlara neden olabildiği belirtilmektedir [186-189].

Kokainin oksidatif metabolitinden biri formaldehittir ve ROT üretiminde rol oynamaktadır. Fetüs kokain maruziyeti ile hipoksiye maruz kalabilmektedir. Gelişmemiş embriyonik ve fetal savunma sistemleri ekzojen antioksidanların desteği olmadan aşırı oksidatif strese karşı koyamamaktadır [123,190]

Kokaine maruz kalan farelerin embriyolarında lipid peroksidasyonunun arttığı ve antioksidan uygulamasıyla da bu durumun önlendiği gözlenmiştir [188].

Oksidatif stres ve çevresel maruziyet

İnsanlar sürekli olarak hava, toprak, kontamine gıda ve su alımı yoluyla kirleticilere maruz kalmaktadır [191].

Organoklorinler, pestisitlerde yaygın olarak kullanılan, güçlü hidrofobik özelliklere sahip ve lipofilik bileşiklerdir. Yüksek lipid içeriğine sahip vücut dokularında zamanla birikmektedirler. Üreme üzerine olumsuz etkilerinin yanı sıra embriyo veya fetüsün kendisini de olumsuz yönde etkileyebilmektedirler [123]. Pestisitlerle doğrudan temas halinde olan erkek tarım işçilerinin eşlerinde kendiliğinden düşüklerde artış olduğu gösterilmiştir [192].

Poliklorlu bifeniller de lipofilik bileşiklerdir. İnsanlar poliklorlu bifenillere balık, et ve süt ürünleri gibi poliklorlu bifenillerin izlerini içeren gıdaların tüketilmesiyle, mesleki olarak ya da poliklorlu bifenil elemanları içeren çevredeki havanın solunmasıyla maruz kalmaktadır [193]. Poliklorlu bifenillerin kadın üremesi üzerine etkili olduğu belirtilmektedir [123]. Poliklorlu bifenillere maruziyet ile IVF hastalarında görülen başarısız implantasyon arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir [193].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışmanın etik kurul onayı Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 23.12.2019 toplantı tarihli kararı (Karar No: 271) ile alınmıştır.

Aralık 2019 - Aralık 2020 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezi'nde ve Özel Nova Art Tüp Bebek Merkezi'nde değerlendirilmiş ve muayenesi, rutin laboratuvar tetkikleri yapıldıktan sonra IVF ile infertilite tedavisi gören 102 kadın hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların infertilite nedenleri erkek faktörü, kadın faktörü (tubal faktör, anovülasyon ve endometriozis), açıklanamayan infertilite veya erkek ve dişi faktörlerin bir kombinasyonudur. 23 yaş altı ve 40 yaş üstü hastalar ile diyabetli fertil hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Kümüllüs hücrelerinde CAT, GST, ARE enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle analiz edilmiştir.

OPU (oosit toplama işlemi) gününde alınan oosit sayısına göre; düşük yanıt veren, normal yanıt veren ve yüksek yanıt veren olarak hastalarımız gruplandırılmıştır. Çalışmamıza 28 düşük yanıt veren (oosit sayısı $\leq$ 4), 48 normal yanıt veren ($5\leq$ oosit sayısı $\leq$ 14), 26 yüksek yanıt veren (oosit sayısı $\geq$ 15) kadın hasta dahil edilmiştir.

3.2. Örnek Toplanması

Antagonist sikluslarda, tedaviye, ovaryumların ultrasonografik değerlendirilmesinde ovaryum kistlerinin bulunmadığını gösterdikten sonra döngünün 3. gününde başlanmış ve serum progesteron düzeyleri <1 ng/ml olarak bulunmuştur. Stimülasyon protokolü, rekombinant (Gonal F, Merck Serono, Türkiye veya Puregon, Merck Sharp Dohme, Türkiye) veya insan menopozal gonadotropin (hMG) (Menogon, Erkim, Türkiye veya Merional, IBSA, Türkiye) ile kombinasyon halinde 150-300 IU/gün gonadotropinleri içermiştir. Hastalar, 2 veya daha fazla folikül >18 mm çapında ve eşlik eden foliküller >14 mm çapında olduğunda ve yeterli östradiol (E2) yanıtı varken hCG (Ovidrelle 250, Merck

Serono, Türkiye) almışlardır. Oositler, hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra toplanmıştır. Bu çalışmada test edilen tüm hastalar intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ile tedavi edilmiştir.

Alınan kümülüs-oosit kompleksleri kültür ortamına (G-MOPS, VitroLife, İsveç) sahip kaplara yerleştirilmiştir; burada kümülüs hücreleri, biri oositi tutmak için diğeri oositi çevreleyen kümülüs hücrelerini diseke etmek için iki 26 G x 1/2 iğnesi kullanılarak mekanik olarak ayrılmıştır. Her hastanın kümülüs hücreleri, tek bir eppendorf tüpünde toplanmıştır.

Her numune iki kez 0.5 ml fosfat tamponlu salin (PBS) (CAPRICORN SCIENTIFIC, Bulbecco's PBS) ile yıkanmıştır. 1 ml'lik eppendorf tüpüne konulup üzerine 0.5 ml izotonik serum fizyolojik ilave edilmiş ve numuneler analiz zamanına kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.3. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Laboratuvar Malzemeleri

pH metre (Milwaukee, Mi 150)

Vorteks (XH-C)

Isıtcılı manyetik karıştırıcı (TMA 2071)

Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601)

Sıcak su banyosu (P-D Industriegesellschaft mbH, Typ WB 20)

Homojenizatör (Braun Melsungen)

Santrifüj (Sigma, Type Model: 2-5)

Hassas terazi (Shimadzu, Libror AEG-220)

Otomatik pipet

Otomatik pipet ucu

Puar

Cam malzemeler (pipet, balon joje, mezür, erlen mayer, beher, deney tüpleri)

Eppendorf tüpleri

3.4. Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemeler

Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), monopotasyum fosfat (KH_2PO_4), sodyum hidroksit (NaOH), H_2O_2 , hidroklorik asit (HCl), CDNB, GSH, etanol, tris bazı, kalsiyum klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fenil asetat, metanol, trikloroasetik asit (TCA), TBA, 1,1,3,3-Tetraetoksi propan (TEP).

3.5. Biyokimyasal Analizler

Kümüls hücreleri -80°C 'den alınmış ve bench üzerinde buz-su karışımında çözünmeye bırakılmıştır. Daha sonra kümüls hücreleri 3 dk homojenize edilmiştir. Tüm enzim ve MDA prosedürleri ticari kitler kullanılmadan manuel olarak gerçekleştirilmiştir. CAT, GST, ARE enzim aktiviteleri ve MDA düzeyi, sırasıyla Aebi'nin [194], Habig ve arkadaşlarının [195], Clement ve arkadaşlarının [196] ve Van Ye ve arkadaşlarının [197] metodlarına göre çalışılmıştır. Tüm analizlerde Shimadzu UV-1601 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

3.5.1. Katalaz enzim aktivite tayini

Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 'nin CAT tarafından H_2O ve O_2 'ye yıkım hızıyla birlikte 240 nm dalga boyunda gözlenen absorbans değişimi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Deneyin yapılışı

Reaktif olarak fosfat tamponu (50 mM, pH:7), %30'luk H_2O_2 kullanılmıştır. Kör küvetine fosfat tamponu koyularak spektrofotometre cihazının sıfır ayarı yapılmıştır. Absorbans yaklaşık 0,5 olana kadar, fosfat tamponuna H_2O_2 ilave edilmiştir. Numune küvetine tamponlanmış H_2O_2 ve numune eklenmiştir ve küvet 2-3 kez altüst edilerek karıştırılmıştır. Absorbans değişimi 3 dk boyunca 240 nm dalga boyunda izlenmiştir. Lineer bölgeden $\Delta A/\text{dk}$ değeri bulunmuştur. CAT enzim aktivitesi hesaplanarak, sonuçlar IU/L olarak verilmiştir.

3.5.2. Glutasyon-s-transferaz enzim aktivite tayini

CDNB'nin GSH ile reaksiyonu sonucu oluşan S-2,4-dinitrofenilglutasyon (DNPG)'un 340 nm'de gösterdiği absorbans değişimi 3 dk takip edilerek GST aktivitesi hesaplanmıştır.

Deneyin yapılışı

Reaktif olarak fosfat tamponu (100 mM, pH:6,5), CDNB (25 mM) ve GSH (50 mM) kullanılmıştır. K r küvetine fosfat tamponu koyularak spektrofotometre cihazının sıfır ayarı yapılmıştır. Numune küvetine önce fosfat tamponu, CDNB, numune ilave edilip iyice karıştırılmış ve absorbans değişimi 1-3 dk boyunca takip edilmiştir. Daha sonra numune küvetine GSH eklenerek 340 nm’de absorbans değişimi 3 dk boyunca izlenmiştir. Lineer olan bölgeden $\Delta A/dk$ değeri bulunmuştur. GST enzim aktivitesi hesaplanarak, sonuçlar IU/L olarak verilmiştir.

3.5.3. Arilesteraz enzim aktivite tayini

Aril esteraz, fenil asetatın fenol ve asetik aside parçalanmasını katalizlemektedir. Enzim etkisi ile reaksiyon sonucunda oluşan fenolün 270 nm’de absorbansı ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

Deneyin yapılışı

Reaktif olarak Tris-HCl tamponu (100 mM, pH:8), $CaCl_2$ (2 mM), fenil asetat çözeltisi (1 mM) kullanılmıştır. K r küvetine Tris-HCl tamponu koyularak spektrofotometre cihazının sıfır ayarı yapılmıştır. Numune küvetine önce Tris-HCl tamponu, $CaCl_2$ ve numune ilave edilip iyice karıştırılmış ve absorbans değişimi 1-3 dk boyunca takip edilmiştir. Sonrasında numune küvetine fenil asetat çözeltisi eklenerek 270 nm’de absorbans değişimi 3 dk boyunca izlenmiştir. Lineer olan bölgeden $\Delta A/dk$ değeri bulunmuştur. ARE enzim aktivitesi hesaplanarak, sonuçlar IU/L olarak verilmiştir.

3.5.4. Malondialdehit tayini

TBA’nın MDA ile 85-100  C sıcaklıkta reaksiyonu sonucu pembe renkli bir pigment oluşmaktadır. MDA düzeylerinin belirlemesinde kullanılan bu pigment, 532 nm’de maksimum absorbans vermektedir.

Deneyin yapılışı

Reaktif olarak fosfat tamponu (100 mM, pH: 6), etanol, TBA (%2'lik) ve TCA (%20'lik) kullanılmıştır. Numune tüplerine fosfat tamponu, etanol, TBA, TCA, numune; numune körü tüplerine fosfat tamponu, etanol, TCA, numune; standart tüpüne fosfat tamponu, etanol, TBA, TCA, standart; standart körü tüpüne fosfat tamponu, etanol, TCA, standart ilave edildikten sonra 30 dk kaynar su banyosunda (85-100 °C'de) inkübe edilmişlerdir. Sonrasında tüpler soğutulmuş ve 5000xg'de santrifüj edilerek süpernatantları alınmıştır. Numune körlerine ve standart körüne TBA ilave edilip iyice karıştırılmıştır. Her bir tüpün absorbansı kendi körüne karşı spektrofotometrede 532 nm'de okunmuştur. 1,1,3,3-Tetraetoksi propan (TEP)'dan hazırlanan çözelti standart solüsyon olarak kullanılmıştır. Konsantrasyonu bilinen standartın absorbansından yararlanılarak numune konsantrasyonları hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mL olarak verilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel analizleri için SPSS 22.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler kısmında sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma (ort. $\pm$ std. ss.) ile sunulmuştur. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov testleri) kullanılarak değerlendirilmiştir ve normal dağılmadığı gözlenmiştir. Normal dağılıma uymayan verilerde, iki bağımsız grup arasındaki karşılaştırma analizleri için Mann-Whitney U testi, üç grup arasındaki karşılaştırma analizlerinde Kruskal Wallis testi (post hoc test: Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi, anlamlılık düzeyi bu test için $p<0,017$) kullanılmıştır. Parametreler arasındaki korelasyon analizi için ise Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Bu çalışmada istatistik anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Düşük yanıt veren grubuna göre normal yanıt veren ve yüksek yanıt veren gruplarında yaş düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,001$), (Çizelge 4.1). VKİ düzeyleri açısından bakıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,118$) (Çizelge 4.1).

Düşük yanıt veren grubuna göre yüksek yanıt veren grubunda ($p<0,001$) ve normal yanıt veren grubuna göre yüksek yanıt veren grubunda ($p=0,002$) kümülüs hücresi GST enzim aktivitesi düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). Düşük yanıt veren grubuna göre yüksek yanıt veren grubunda kümülüs hücresi MDA düzeyleri anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,008$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.4). Kümülüs hücresi CAT ve ARE enzim aktivitesi açısından bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla, $p=0,175$, $p=0,124$), (Çizelge 4.2, Şekil 4.1 ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.1. Grupların yaş ve VKİ düzeyleri

	Düşük yanıt veren (n = 28) ortalama $\pm$ SS ortanca (min-maks)	Normal yanıt veren (n = 48) ortalama $\pm$ SS ortanca (min-maks)	Yüksek yanıt veren (n = 26) ortalama $\pm$ SS ortanca (min-maks)	p ¹
Yaş (yıl)	37,5 $\pm$ 4,89 39,5 (23-40)	32,50 $\pm$ 6,21 33,5 (23-40)	29,58 $\pm$ 4,76 29 (23-40)	< 0,001 ²
VKI	26,22 $\pm$ 5,06 25,5 (17-34)	23,50 $\pm$ 3,70 23 (19-36)	24,47 $\pm$ 4,97 24 (19-36)	0,118

VKI: Vücut kitle indeksi

¹ Kruskal Wallis testi

² Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi: düşük yanıt veren grubuna karşı normal yanıt veren grubu $p<0,001$; düşük yanıt veren grubuna karşı yüksek yanıt veren grubu $p<0,001$; yaş için

Çizelge 4.2. Grupların CAT, GST, ARE enzim aktivitesi ve MDA konsantrasyon düzeyleri

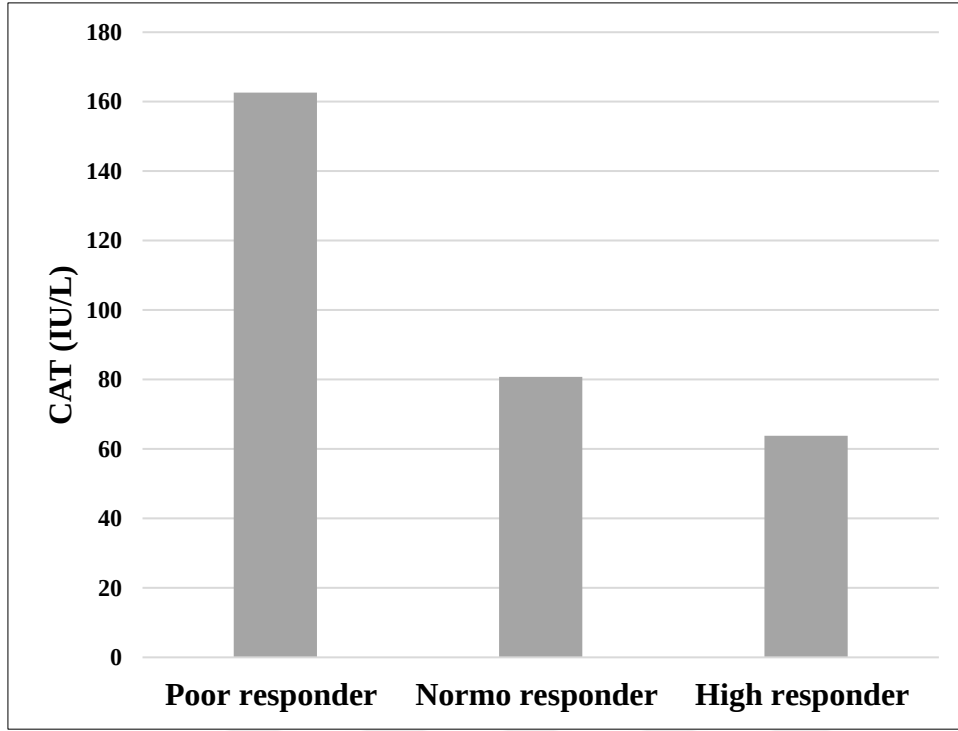
	Düşük yanıt veren (n = 28) ortalama ± SS ortanca (min-maks)	Normal yanıt veren (n = 48) ortalama ± SS ortanca (min-maks)	Yüksek yanıt veren (n = 26) ortalama ± SS ortanca (min-maks)	p ¹
CAT (IU/L)	162,61 ± 23,80 51,24 (7,32-680,76)	80,73 ± 16,48 21,96 (7,32-897,00)	63,79 ± 17,65 25,62 (7,32-322,08)	0,175
GST (IU/L)	0,13 ± 0,09 0,11 (0,01-0,42)	0,15 ± 0,09 0,13 (0,01-0,47)	0,22 ± 0,12 0,21 (0,03-0,64)	< 0,001 ³
ARE (IU/L)	0,06 ± 0,04 0,04 (0,00-0,32)	0,05 ± 0,04 0,04 (0,01-0,20)	0,07 ± 0,05 0,07 (0,01-0,19)	0,124
MDA (nmol/mL)	2,56 ± 0,18 2,55 (2,28-3,01)	2,38 ± 0,38 2,43 (1,38-3,06)	2,27 ± 0,41 2,38 (1,33-2,67)	0,023 ⁴

CAT: katalaz; GST: glutatyon-s-transferaz; ARE: arilesteraz; MDA: malondialdehit

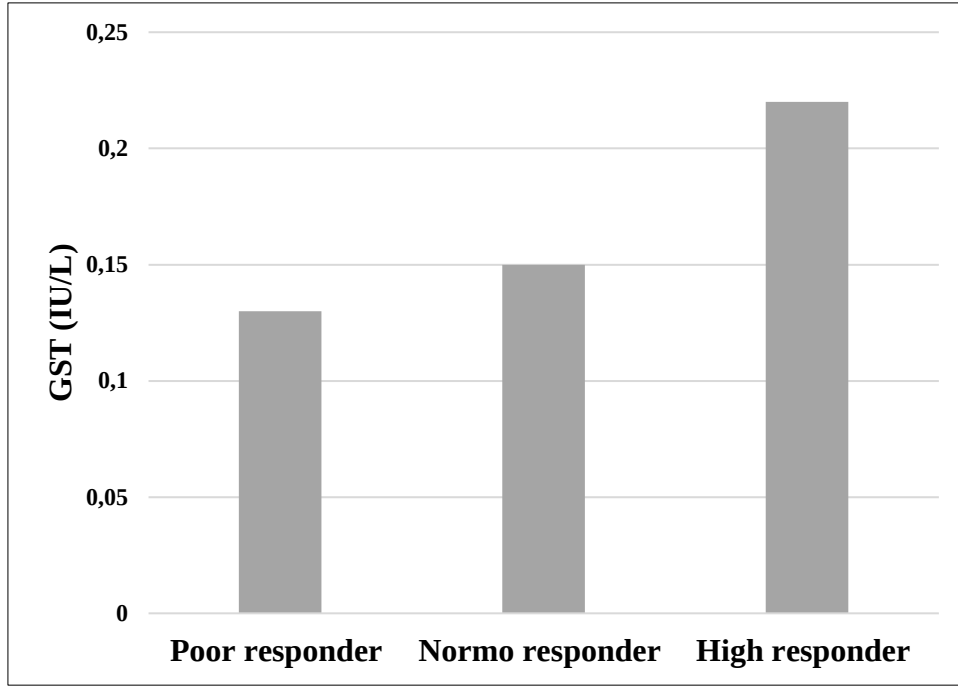
¹ Kruskal Wallis testi

³ Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi: düşük yanıt veren grubuna karşı yüksek yanıt veren grubu p<0,001; normal yanıt veren grubuna karşı yüksek yanıt veren grubu p=0,002; GST için

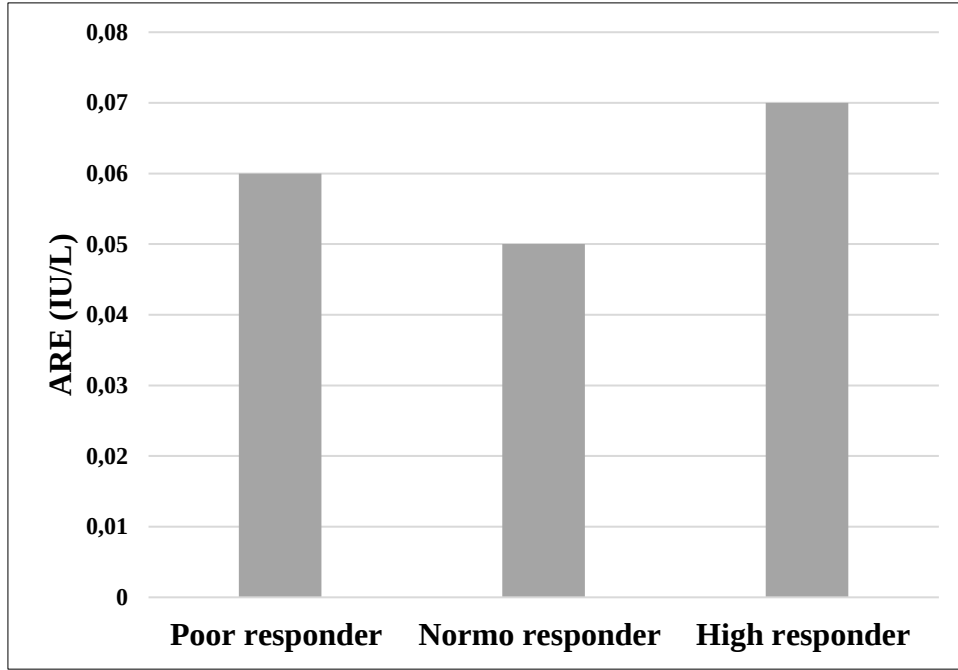
⁴ Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi: düşük yanıt veren grubuna karşı yüksek yanıt veren grubu p=0,008; MDA için



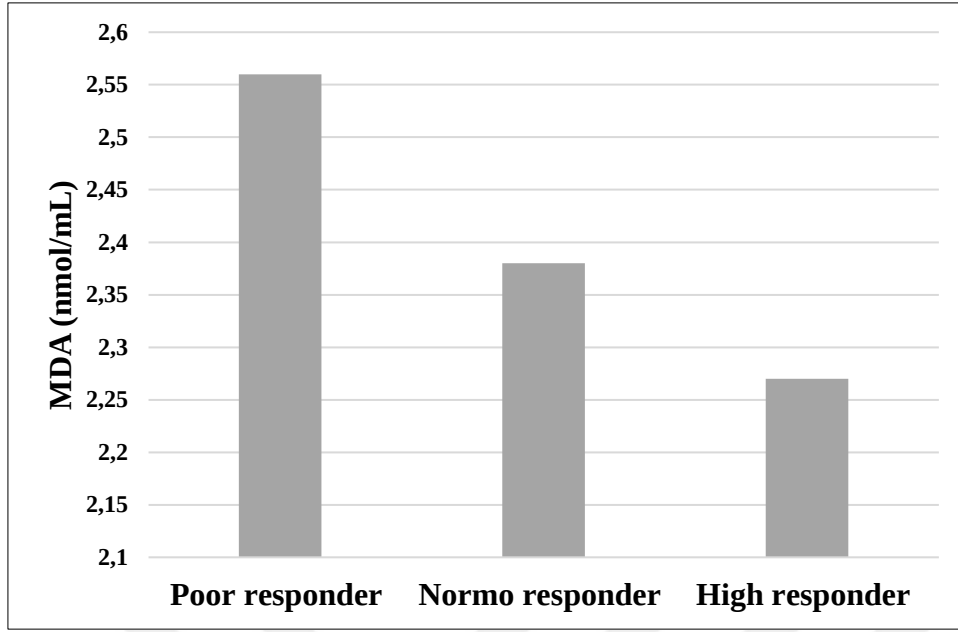
Şekil 4.1. Grupların CAT enzim aktivite düzeyleri (p=0,175)



Şekil 4.2. Grupların GST enzim aktivite düzeyleri ($p < 0,001^3$) (³ Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi: düşük yanıt veren grubuna karşı yüksek yanıt veren grubu $p < 0,001$; normal yanıt veren grubuna karşı yüksek yanıt veren grubu $p = 0,002$)



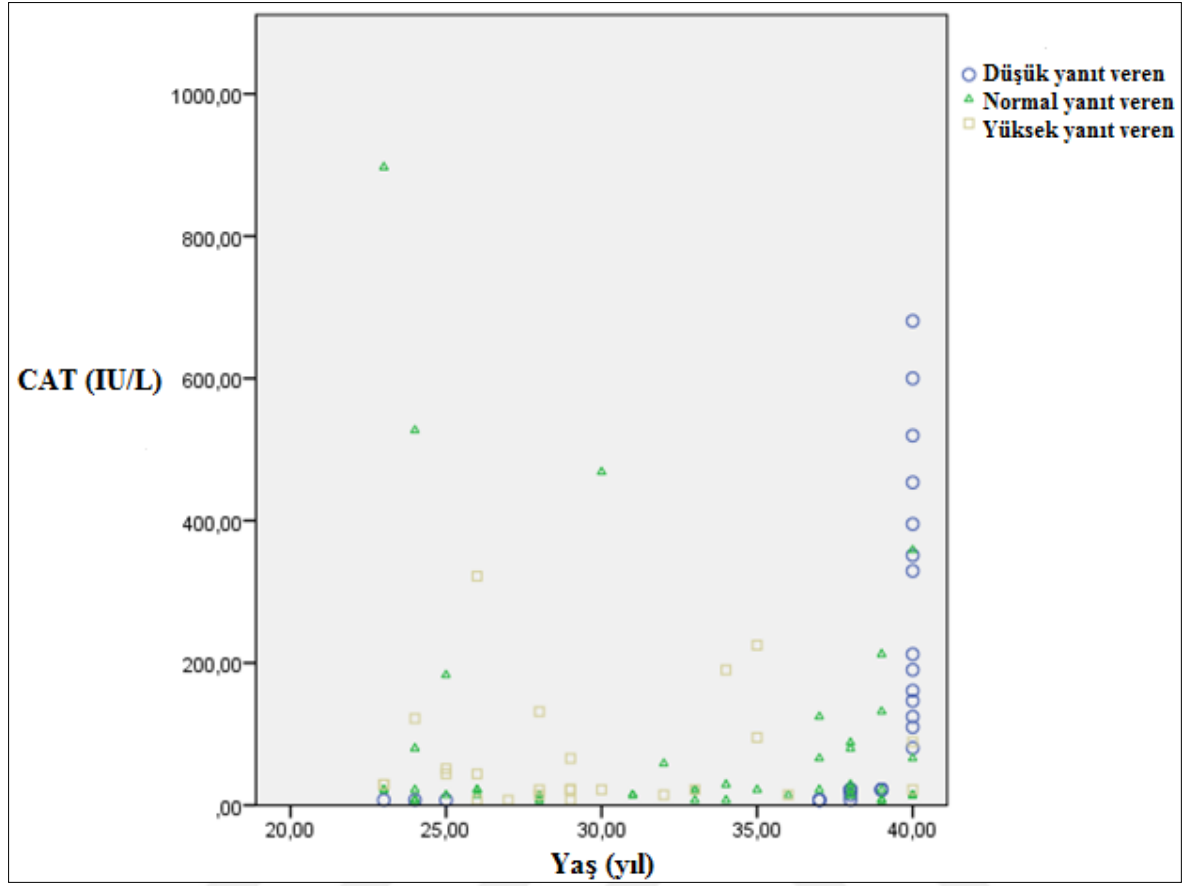
Şekil 4.3. Grupların ARE enzim aktivite düzeyleri (p=0,124)



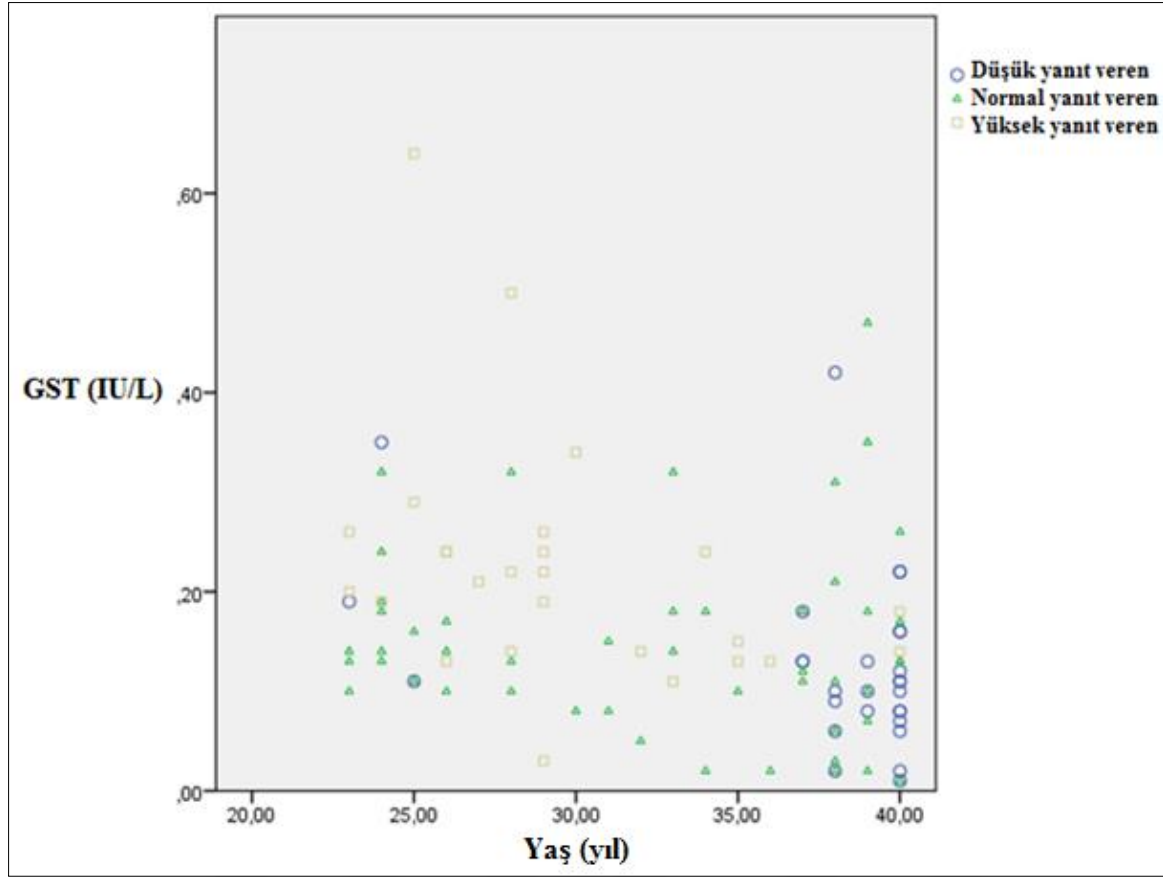
Şekil 4.4. Grupların MDA konsantrasyon düzeyleri ($p=0,023^4$) (^{4} Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi: düşük yanıt veren grubuna karşı yüksek yanıt veren grubu $p=0,008$)

Spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre yaş ve CAT enzim aktivitesi arasında pozitif yönde, zayıf, anlamlı ilişki bulunmuştur ($r_{\text{spearman}} = 0,287$, $p=0,003$) (Şekil 4.5). Yaş ve GST enzim aktivitesi arasında negatif yönde, zayıf, anlamlı ilişki bulunmuştur ($r_{\text{spearman}} = -0,353$, $p<0,01$) (Şekil 4.6). Yaş ve ARE enzim aktivitesi arasında negatif yönde, zayıf, anlamlı ilişki bulunmuştur ($r_{\text{spearman}} = -0,247$, $p=0,012$) (Şekil 4.7). Yaş ve MDA konsantrasyonu arasında pozitif yönde, zayıf, anlamlı ilişki bulunmuştur ($r_{\text{spearman}} = 0,285$, $p=0,004$) (Şekil 4.8).

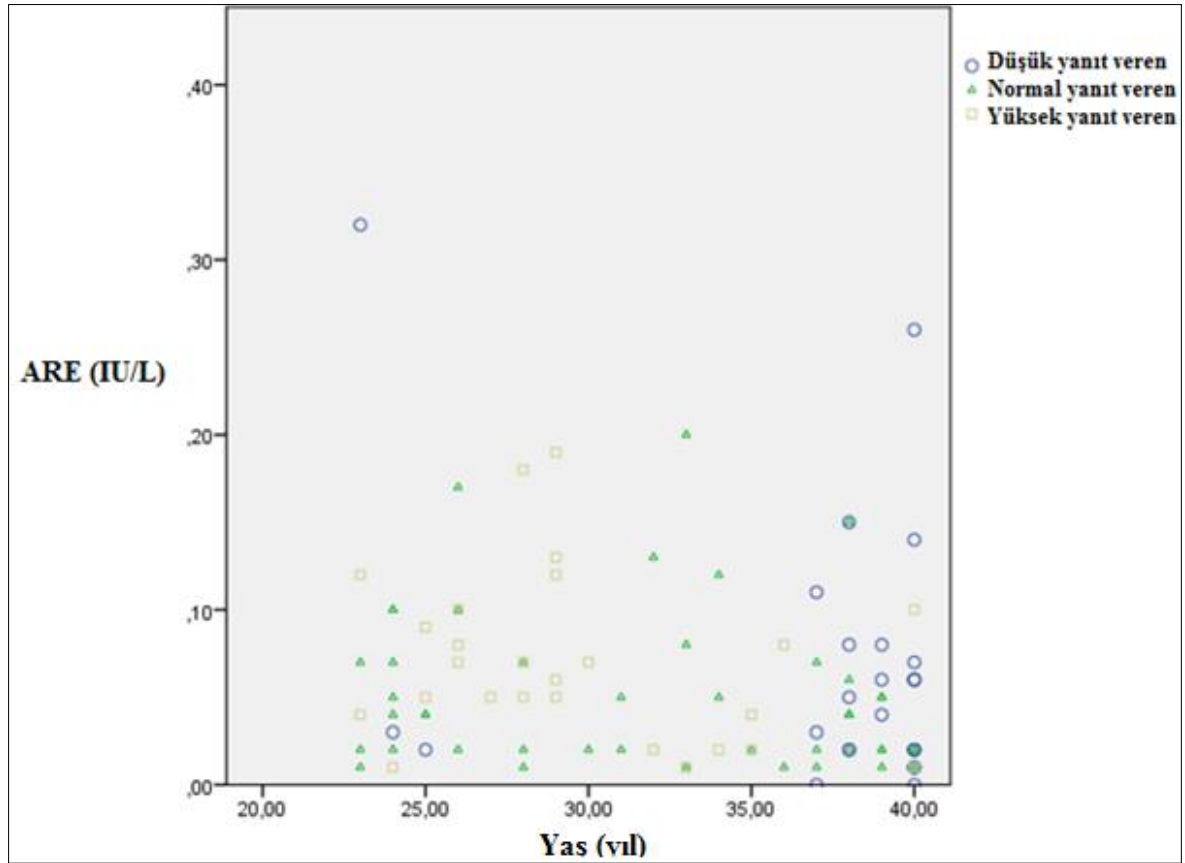
Bunların yanı sıra düşük yanıt veren grubunda yaş ve CAT enzim aktivitesi arasında pozitif yönde, yüksek, anlamlı ilişki bulunmuştur ($r_{\text{spearman}} = 0,914$, $p<0,01$). Yüksek yanıt veren grubunda ise yaş ve GST enzim aktivitesi arasında negatif yönde, zayıf, anlamlı ilişki bulunmuştur ($r_{\text{spearman}} = -0,456$, $p=0,019$).



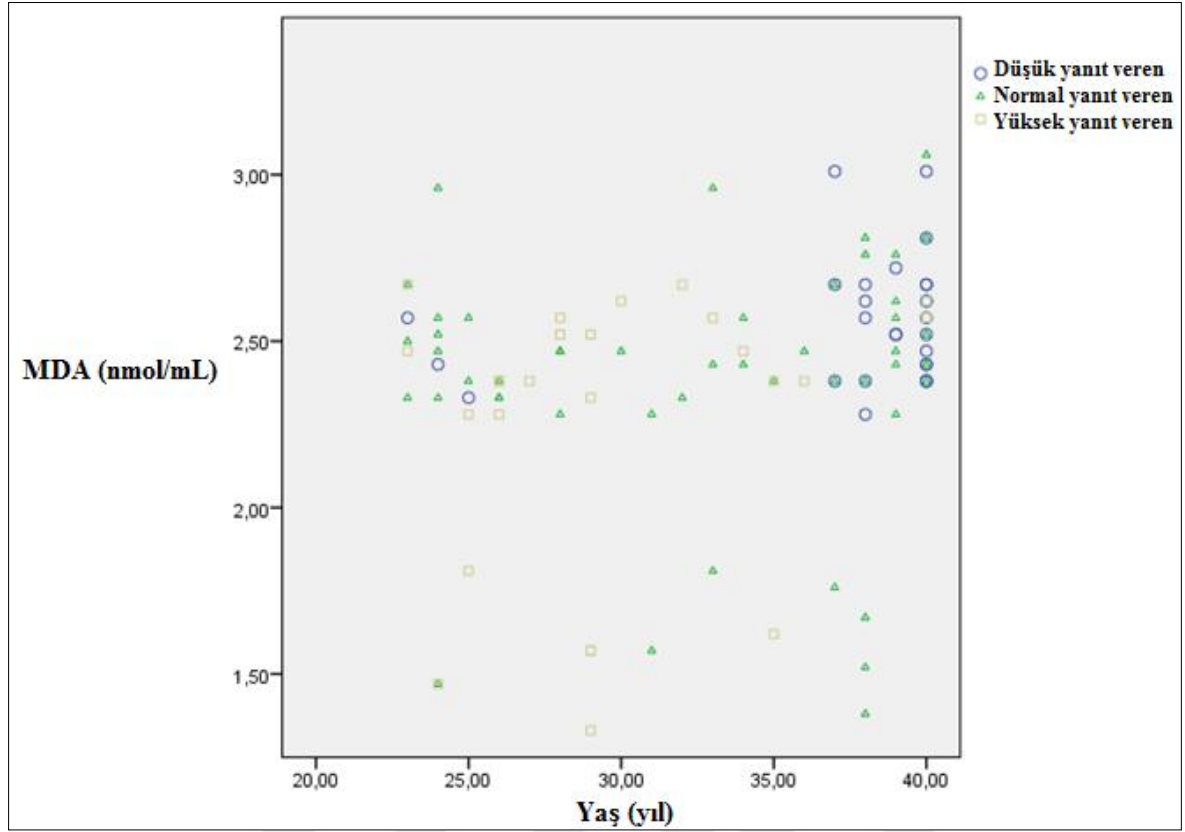
Şekil 4.5. Grupların yaş-CAT enzim aktivite ilişkisi dağılım/nokta (scatter/dot) grafiği ($r_{\text{spearman}} = 0,287$, $p = 0,003$)



Şekil 4.6. Grupların yaş-GST enzim aktivite ilişkisi dağılım/nokta (scatter/dot) grafiği ($r_{\text{spearman}} = -0,353$, $p < 0,01$)



Şekil 4.7. Grupların yaş-ARE enzim aktivite ilişkisi dağılım/nokta (scatter/dot) grafiği ($r_{\text{spearman}} = -0,247$, $p = 0,012$)



Şekil 4.8. Grupların yaş-MDA konsantrasyonu ilişkisi dağılım/nokta (scatter/dot) grafiği
 ($r_{\text{spearman}} = 0,285$, $p=0,004$)



5. TARTIŞMA

Oksijen hücre canlılığı için hayati önem taşımaktadır. Oksijenin paradoksik etkilerine, aerobik yaşayan hücreler sürekli maruz kalmaktadır [198]. Aerobik metabolizmanın yan ürünleri olan ROT normal oksijen metabolizması sırasında oluşmaktadır [99,199]. ROT üretimi, normal hücre işleyişi sırasında gen ekspresyonu, hücre sinyalleme ve redoks homeostazı için gereklidir. Memelilerde hemen hemen her türlü metabolik süreçte ROT oluşmakta ve ortamdan temizlenmektedir. Bu işlemler denge içinde yürütülmektedir. Böylece hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozis sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmektedir [99]. Oksidasyon reaksiyonlarının hayati önemleri olmakla birlikte zararlı etkileri de vardır. Bu zararlı etkilerden korunmada antioksidanlar rol oynamaktadır [78]. ROT, RNT veya diğer serbest radikallerin aşırı miktarda üretimi, prooksidanlar ve antioksidanlar arasında dengesizliğe neden olarak oksidatif strese yol açmaktadır [200]. Oksidatif stres, enzim inaktivasyonu, iyon kanallarının açılması, kararsız mitokondriyal membran potansiyeli, lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonları, DNA oksidasyonu ve ATP tükenmesi ile hücre ya da organların işlevini bozarak yaşamlarını tehdit edebilecek düzeylere varan etkiler oluşturabilmektedir [198-201]. ROT'un organizmada membran lipidlerini, proteinleri ve nükleik asitleri hasara uğratmasıyla; sırasıyla MDA, karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri, 8-OHdG oluşmaktadır [120,202].

Kadın üreme sisteminde oksidatif stresin ve antioksidanların, yardımcı üreme tekniklerinin başarısını sınırlayan koşullarla ilişkili olabileceği belirtilmektedir. İnfertilite ve IVF patofizyolojisinde ve tedavisinde oksidatif stresin rolüne dair bazı kanıtlar olmakla birlikte mevcut veriler çelişkilidir [127,203]. ROT ovaryumların normal fizyolojik işlevleri sırasında üretilmektedir [99]. ROT'un düşük konsantrasyonları oositlerin gelişimsel yeterliliklerini kazanmasında ve implantasyon öncesi embriyo gelişim hızının düzenlenmesinde rol oynarken, ROT ve antioksidanlar arasındaki dengenin ROT lehine bozulması hücrelerde oksidatif hasarı ve apoptozu uyarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına, oosit olgunlaşması, ovulasyon, döllenme, implantasyon ve embriyo gelişimi gibi süreçlerde patolojik bozukluklara, infertilite oluşumuna ve IVF ile gebelik sonucunun azalmasına neden olmaktadır [99,199,201,203,204].

Oksidatif stresin, yaşa bağlı hücre ve moleküler hasarın ana nedenlerinden biri olduğu belirtilmektedir [205]. Genç ve sağlıklı bireylerde ROT ve antioksidanlar arasındaki denge,

yaşlanma ile birlikte antioksidanlarda fonksiyon bozukluğu nedeniyle ROT lehine bozulmaktadır [206]. Yaş artışıyla birlikte oosit kalitesinde azalma, doğurganlıkla ilgili bozulmalar, kromozom anormallikleri artmakta ve mevcut IVF teknolojileriyle sağlanan oosit başına canlı doğum oranı azalmaktadır. Mitokondrilerin günlük biyolojik metabolizma sırasında ürettikleri ROT'dan kaynaklanan hasarın birikmesi, oosit kalitesindeki yaşa bağlı düşüşün arkasındaki mekanizmalardan biridir. Bununla birlikte yaşam tarzı, çevresel faktörler, stres koşulları, inflamasyon, AGE'lerin üretiminde artış, hücre proliferasyonu ve apoptoz hücresel yaşlanmaya katkıda bulunan diğer ROT kaynaklarıdır [207]. Bizim çalışmamızda, literatür ile uyumlu olarak düşük yanıt veren grubuna göre normal yanıt veren ve yüksek yanıt veren gruplarında yaş anlamlı derecede azalmış olarak bulunmuştur.

Organizmalarda, hücrelerin ROT'un neden olduğu hasarı onarmasına yardımcı enzimlerden biri olan SOD, dismutasyon reaksiyonunda $O_2^{\cdot-}$ 'yi ortadan kaldırıp H_2O_2 ve O_2 oluşturarak antioksidan etki göstermektedir. H_2O_2 'nin uzaklaştırılması için hem CAT hem de glutatyon peroksidaz tarafından, daha fazla detoksifikasyonu katalize edilmektedir [201,208,209]. CAT inhibisyonu oosit çekirdeğinde, kromozom yanlış hizalanması ve DNA hasarı gibi kromozom kusurlarına neden olabilmektedir [99]. Carbone ve arkadaşlarının [205] çalışmasında, genç kadınlarla karşılaştırıldığında yaşlı kadınların foliküler sıvısında CAT seviyeleri daha düşük bulunmuştur. Nuñez-Calonge ve arkadaşlarının [210] çalışmasında CAT mRNA düzeyleri, düşük yanıt veren kadınlarla karşılaştırıldığında normal yanıt veren kadınların kümülüs hücrelerinde daha yüksek bulunmuştur. Chowdary ve arkadaşlarının [211] çalışmasında antral foliküllerden toplanan foliküler sıvıdaki CAT seviyeleri karşılaştırılmış, orta ve büyük boyutlu foliküllere göre küçük boyutlu foliküllerde ve dominant foliküllere göre dominant olmayan foliküllerde CAT seviyeleri anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Folikül büyümesinin ilk aşamalarında CAT ekspresyonundaki artış, antral folikülogenezin sonraki aşamalarına kıyasla küçük foliküllerde oksidatif stres seviyelerinin daha yüksek olmasına bağlanmıştır [211]. Gupta ve arkadaşlarının [204] çalışmasında antral foliküllerin boyutu arttıkça foliküler sıvıda CAT aktivitesi ve H_2O_2 seviyeleri anlamlı derecede azalmıştır. Bunların yanı sıra yaşlanmayla birlikte serum FSH düzeylerinin kademeli olarak arttığı ve FSH'ın CAT aktivitesini arttırdığı da literatürde belirtilmektedir [99,206,212]. FSH'ın GSH'ı artırmak suretiyle ovaryumlarda ve granüloza hücrelerinde bir antiapoptotik molekül görevi görebileceği belirtilmektedir [206]. Behl ve arkadaşlarının [212] çalışmasında FSH stimülasyonu sonrası CAT aktivitesinin arttığı ve bu artışın büyük foliküllerde orta veya küçük foliküllere kıyasla daha yüksek olduğu

görülmüştür. Bizim çalışmamızda da düşük yanıt veren grubuna göre normal yanıt veren ve yüksek yanıt veren gruplarında yaş anlamlı derecede azalmış ve buna paralel olarak da düşük yanıt veren grubuna göre diğer grupların kümülüs hücrelerinde CAT aktivitesinde anlamlı olmayan bir azalma eğilimi gözlenmiştir. Düşük yanıt veren grubunda CAT aktivitesinin daha yüksek olması, yaş arttıkça gerek metabolizma sırasında üretilen ROT'a gerekse yaşam tarzı ve çevresel koşullara bağlı olarak, oksidatif stres maruziyetindeki artışla birlikte antioksidan düzeylerindeki ihtiyacın da artmasına bağlanmaktadır. Aynı zamanda literatürde yaşın ilerlemesi ile birlikte FSH'da artış olduğu ve FSH'ın da CAT aktivitesini arttırdığı belirtildiğinden, çalışmamızda düşük yanıt veren grubunda FSH'ın CAT aktivitesindeki yükselişte bir etken olabileceği düşünülmektedir.

GST, hücreleri oksidatif hasardan, hücre membranlarının lipid peroksidasyonundan ve toksik bileşiklerden koruyan geniş bir enzim ailesinden oluşmaktadır [4]. GST'nin peroksidaz, izomeraz ve genotoksinlerin GSH'a konjugasyonunu katalize etme gibi işlevlerine ek olarak, hücresel apoptozis yolunda rol oynayan Jun N-terminal kinazı inhibe ederek hücrelerin H₂O₂ ile indüklenen hücre ölümüne karşı korunmasında da etkileri vardır [206]. Aynı yaşta, yüksek yanıt verenlere ve oosit donörlerine kıyasla, ovaryum rezervi azalmış genç kadınlarda, foliküler sıvıda GST aktivitesi anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. Sonuçlara dayanarak, olgun folikül sayısındaki artışın antioksidan enzimlerin yeterli düzeyde olmasıyla ve düşük ovaryum tepkisinin daha yüksek oksidatif stres seviyeleri ile ilişkili olduğu ve bunun da artmış foliküler yaşlanmaya işaret ettiği belirtilmektedir [203]. GST aktivitelerinin yaştan etkilendiği, yaş artışıyla birlikte GST aktivitelerinde azalma olduğu belirtilmekle birlikte sonuçlar çelişkilidir. IVF tedavisi alan genç ve daha yaşlı kadınların foliküler sıvısında GST alfa izoenzimi iki grupta farklılık göstermemiştir. GST Pi izoenzimi daha yaşlı kadınlara kıyasla genç kadınlarda daha yüksek bulunmuştur. Yaşlanmayla GST'ye özgü aktivitede gözlenen azalmanın, oksidatif stres yan ürünlerinin detoksifikasyonunda etkili olan Pi izoformunun miktarındaki bir azalmaya bağlı olabileceği belirtilmektedir [205]. Meijide ve arkadaşlarının [213] çalışmasında hem donörlerde hem de doğurganlık sorunu olan hastalarda GST aktivitesinin, küçük oositlere kıyasla olgun oositlerde anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise diğer gruplara göre yüksek yanıt veren grubunda yaş azalırken GST aktivitesi anlamlı düzeyde artmıştır. Bu artış, GST aktivitesinin oositleri apoptozdan korumuş olabileceğini düşündürmektedir.

IVF’de, foliküler sıvıda antioksidan seviyeleri azalmakta ve lipid peroksidasyon seviyeleri artmaktadır [14]. Lipid peroksidasyonunun, IVF sonrası oosit fertilizasyonunu ve gebelik oranlarını etkilediği belirtilmektedir [89]. Oositlerin lipid açısından zengin bir membrana sahip olması, lipid peroksidasyonuna ve ROT'un zararlı etkilerine açık hale gelmelerine neden olmaktadır. MDA, hücrelerdeki peroksidatif hasarın derecesini takip etmede kullanılan lipid peroksit ayrışmasının bir yan ürünüdür [198]. Kumar ve arkadaşlarının [214] çalışmasında, pozitif IVF sonucu gösteren kadınlarla karşılaştırıldığında negatif IVF sonucuna sahip kadınlarda foliküler sıvıda MDA düzeyleri, anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Karakaya ve arkadaşlarının [215] çalışmasında kontrollü over stimülasyonu uygulanan hastaların foliküler sıvısında, normal yanıt veren ve yüksek yanıt veren gruplarıyla karşılaştırıldığında düşük yanıt veren grubunda, MDA seviyeleri daha yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da bu çalışmalarla paralel olarak diğer gruplara göre düşük yanıt veren grubunda kümülüs hücrelerinde MDA düzeyleri artmıştır. Bu durum yaş artışıyla birlikte hücrelerin lipid peroksidasyonuna daha fazla açık hale gelmesine bağlanmaktadır.

PON1, PON ve ARE aktivitesine sahip serum ve foliküler sıvıda bulunan ve hücre zarını ve dolaşımdaki lipidleri oksidatif hasara karşı koruyan, HDL’ye bağlı antioksidan bir enzimdir [14,16]. Tekrarlayan ovulasyon döngüleri boyunca folikülogenez yoluyla üretilen yüksek ROT'a tekrar tekrar maruz kalma oksidatif stresi uyarmakta ve oosit kalitesinde, implantasyon sıklığında ve gebelik oranlarında azalmaya da neden olabilmektedir [207]. Okyay ve arkadaşlarının [14] çalışmasında ovaryan stimülasyon öncesine göre OPU günü serum PON1 ve ARE aktiviteleri anlamlı derecede düşük bulunurken LOOH düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Nuñez-Calonge ve arkadaşları [210] oksidatif stresi düzenleyen genlerin ekspresyonu ile apoptoz ve ovaryum stimülasyonuna yanıt arasında bir korelasyon bulmuşlardır; bu durumda, ovaryum oksidatif stresindeki bir artışın, ovaryum stimülasyonundan sonra elde edilen oosit sayısını azaltabileceğini belirtmişlerdir. Bunların yanı sıra, Angelucci ve arkadaşları [216], normal ovulatuvar kadınların foliküler sıvısında nispeten yüksek miktarlarda antioksidan aktiviteye sahip PON1 tanımlamışlardır. Bu enzimin muhtemelen olgunlaşma sırasında folikülün oksidatif stresten korunmasına yardımcı olduğunu belirtmişlerdir [216]. Subfertil kadın hastaların ve kanıtlanmış fertil kadınların (oosit donörü) dahil edildiği çalışmada, her iki grupta da, küçük foliküllere kıyasla büyük foliküllerin foliküler sıvısında PON1’in PON ve ARE aktiviteleri, anlamlı derecede daha yüksek bulunurken, donörlerden alınan oosit sayısı ile foliküler sıvı PON1’inin PON

ve ARE aktiviteleri, pozitif korelasyon göstermiştir [217]. Bizim çalışmamızda, düşük yanıt veren ve normal yanıt veren gruplarına göre yüksek yanıt veren grubunun kümülüs hücrelerinde ARE aktivitesinde artış gözlenmiştir fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak yine çalışmamızda diğer gruplara göre yüksek yanıt veren grubunun kümülüs hücrelerinde MDA düzeylerinde düşüş gözlenmesi ARE aktivitesinin bu grupta lipid peroksidasyonunu azaltma yönünde etkili olduğunu ve bu durumun da elde edilen oosit sayısını ve kalitesini etkilediğini düşündürmektedir.

Ovaryum stimülasyonu, kadınları yüksek fiziksel ve psikolojik strese maruz bırakmaktadır [213]. IVF’de büyük ilerlemelere rağmen, düşük yanıt veren hastalardan elde edilen oositlerin sınırlı sayıda olması, canlı doğum oranlarının optimize edilmesinde temel sorunlardan biridir [218]. Erken ovaryum yetmezliği, ovaryum tümörü, endometrioma veya ovaryum yaşlanması gibi pek çok neden düşük yanıt veren etiyolojisinde yer almaktadır [200]. Ayrıca genetik kusurlar, radyoterapi, kemoterapi, otoimmün bozukluklar, tek ovaryum, kronik sigara içimi ve tip I diyabet ovaryum rezervinde azalmaya neden olmaktadır [218]. Bununla birlikte normal başlangıç karakteristikleri ile başvuran ve standart dozlarda gonadotropin alan bazı infertil kadınlar, herhangi bir nedene bağlı olmadan zayıf bir ovaryum tepkisi problemiyle karşılaşabilmektedir [200,219]. Düşük yanıt veren hastalarda spesifik etiyolojinin belirlenememesi tekrarlayan IVF başarısızlıklarına yol açmaktadır [200].



6. SONUÇ

İnfertilite patolojisinin temelini oluşturan hücresel ve moleküler mekanizmalar üzerine oksidatif stresin etkilerini ortaya koyan birçok biyolojik çalışma yapılmıştır. ROT'un kadın üreme sisteminde normal fizyolojik işleyiş sırasında ovulasyonda üretildiği ve oosit olgunlaşması için önemli olduğu bilinmektedir. Ancak oksidanlar/antioksidanlar arasındaki dengenin yaş artışı, yaşam koşulları, çevresel faktörler ve stres gibi birçok nedene bağlı olarak oksidanlar lehine bozulmasıyla aşırı ROT üretilmekte ve oksidatif stres meydana gelmektedir. Bu durum kadın üreme sistemini olumsuz yönde etkilemektedir.

Çalışmamızda düşük yanıt veren, normal yanıt veren ve yüksek yanıt veren gruplarında CAT, GST, ARE enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri ölçülerek gruplar arasındaki değişimleri incelenmiştir. Sonuçlarımıza baktığımızda düşük yanıt veren grubuna göre normal yanıt veren ve yüksek yanıt veren gruplarında yaş anlamlı derecede azalmıştır. Diğer gruplara göre düşük yanıt veren grubunda CAT aktivitesindeki artış, yaşın ilerlemesiyle birlikte oksidatif strese maruziyetteki artışa paralel, antioksidanlara duyulan ihtiyaçtaki artışa bağlanmaktadır. Aynı zamanda bu durum, ilerleyen yaşla birlikte artan FSH'nin CAT'ı aktive etmiş olabileceğini düşündürmektedir. Düşük yanıt veren ve normal yanıt veren gruplarına göre yüksek yanıt veren grubunda GST aktivitesinde anlamlı derecedeki artış antioksidanların elde edilen oosit sayısında etkili olduğunu desteklemektedir. Diğer gruplara göre yüksek yanıt veren grubunda ARE aktivitesinde artış ve MDA düzeylerinde azalma gözlenmesi ARE aktivitesinin bu grupta lipid peroksidasyonunu azaltma yönünde etkili olduğunu düşündürmektedir.

IVF'de büyük ilerlemelere rağmen, oksidatif stresin hastalardan elde edilen oosit sayısını sınırlaması tedaviyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu durum araştırmacıları canlı doğum oranlarını arttırmada yeni tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yöneltmektedir. İnfertil hastaların kümülüs hücrelerinde değişen parametrelerin incelenmesi tedaviye yön vermede çok önemlidir.

Çalışmamızda yüksek yanıt veren grubunda diğer gruplara göre yaştaki azalmayla birlikte ovaryan stimülasyona yanıtta artış gözlenmiştir. Diğer gruplara göre yüksek yanıt veren grubunda kümülüs hücrelerinde her ne kadar CAT enzim aktivitesinde azalma gözlenirse de, GST ve ARE enzim aktivitelerinde gözlenen artışın, MDA düzeylerinde gözlenen azalmada

ve oksidatif strese karşı korunmada etkili olduğunu düşünmekteyiz. IVF hastalarının ovaryan stimölasyona yanıtlarında oksidan/antioksidan parametrelerin etkilerinin prediktif değeri açısından, daha geniş hasta gruplarıyla desteklenmesini önermekteyiz.



KAYNAKLAR

1. Ibrahim, R., Musavi, M., Shojaee, M., Moossavi, M., Moossavi, S.Z., Alaei, M., Poodineh, J., Ibrahim, M., Farahani, Y., and Khorasani, M. (2019). The polymorphism of XRCC1 Arg399Gln (rs25487) and male infertility risk: a meta-analysis of 1,407 cases and 974 control studies. *Bratislava Medical Journal*, 120(5), 349–355.
2. Badger-Emeka L. Chapter 10: In-vitro fertilisation. (2013, January). In Ogbonna, J. C., Ubi, B. E., and Enweani, I. B (Eds). *Fundamentals, Industrial and Medical Biotechnology*. Beijing: Universal Academic Services, 180 – 195.
3. Rani, K., and Paliwal, S. A. (2014). Brief review on in-vitro fertilization (Ivf): An advanced and miraculous gateway for infertility treatments. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 647-658.
4. Mengden, L. v., Klamt, F., and Smits, J. (2020, March). Redox biology of human cumulus cells: Basic concepts, impact on oocyte quality and potential clinical use. *Antioxid Redox Signal*, 32(8), 522–535.
5. Tatemoto, H., Sakurai, N., and Muto, N. (2000, September). Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: Role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, 63 (3), 805–810.
6. Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., de Guevara, M. L., de la, Blanca, M. G. M., Ramos-Ibeas, P., Gutiérrez-Adán, A., Rizo, D. and González, E. M. (2020, August). Antioxidant Nobiletin Enhances Oocyte Maturation and Subsequent Embryo Development and Quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 5340.
7. Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J., and Sugino, N. (2008, April). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 44(3), 280-287.
8. Da Broi, M. G., Giorgi, V. S. I., Wang, F., Keefe, D. L., Albertini, D., and Navarro, P. A. (2018, May). Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: Clinical implications. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(5), 735–751.
9. Scibior, D., and Cieczot, H. (2006). Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej*, 60, 170-180.
10. Narayanan, S. N., Kumar, R. S. , Kedage, V., Nalini, K., Nayak, S., and Bhat, P.G. (2014). Evaluation of oxidant stress and antioxidant defense in discrete brain regions of rats exposed to 900 MHz radiation. *Bratislava Medical Journal*, 115(5), 260–266.
11. Sarandol, E., Tas, S., Serdar, Z., and Dirican, M. (2020, February). Effects of thiamine treatment on oxidative stress in experimental diabetes. *Bratislava Medical Journal*, 121(3).

12. Smith, G. S., Walter, G. L., and Walker, R. M. (2013). Chapter 18 - Clinical pathology in non-clinical toxicology testing. In Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., and Wallig, M. A. (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)*. Academic Press: Elsevier, 565-594.
13. Başkol, G., And Köse, K. (2004, January). Paraoxanase: Biochemical features, functions and clinical importance. *Erciyes Medical Journal*, 26(2), 75-80.
14. Okyay, A. G., Aslan, M., Taşkın, A., Selek, S., Cengiz, Altın, G., and Kahraman, S. (2014, January). Oxidative stress markers in IVF patients and their association with pregnancy results. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 34(2), 204-209.
15. Hatipoglu, Erdem, F. Karatay, S., Yildirim, K. and Kiziltunc, A. (2010, February) Evaluation of serum paraoxonase and arylesterase activities in ankylosing spondylitis patients. *Clinics (Sao Paulo)*, 65(2), 175–179.
16. Rincón, J., Madeira, E. M., Campos, F. T., Mion, B., Silva, J. F., Absalón-Medina, V. A., Butler, W. R., Corrêa, M. N., Pegoraro, L., and Schneider, A. (2016, July). Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 827-830.
17. Sezer, K., ve Keskin, M. (2014). Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 28(1), 49–56.
18. Kellogg, E. W, and Fridovich, I. (1977, October). Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *Journal Biological Chemistry*, 252(19), 6721-6728.
19. Dasgupta, A., and Klein, K. (2014). Chapter 2-Methods for measuring oxidative stress in the laboratory. In Antioxidants in food, vitamins and supplements. *Prevention and Treatment of Disease*, 19-40.
20. Almas, Nounihar, S., and Liyakhath, Ali, S. (2016, November). Assisted reproductive technology (ART) is a solution for infertility. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(11), 34-38.
21. Anwar, S., and Anwar, A. (2016, May). Infertility: A review on causes, treatment and management. *Womens Health Gynecol*, 2(6), 040.
22. Mustafa, M., Sharifa, A. M., Hadi, J., IIIzam, E. M., and Aliya, S. (2019, September). Male and female infertility: Causes, and management. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 18(9), 27-32.
23. Lessy, B. A. (2000, June). Medical management of endometriosis and infertility. *Fertility and Sterility*, 73(6), 1089-1096.
24. Mishail, A., Marshall, S., Schulsinger, D., and Sheynkin, Y. (2009, May). Impact of a second semen analysis on a treatment decision making in the infertile man with varicocele. *Fertility and Sterility*, 91(5), 1809-1811.
25. Avidor-Reiss, T., Khire, A., and Fishman, E. L. (2015, April). Atypical centrioles during sexual reproduction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3,21.

26. Menezo, Y., Ncollet, B., Herbaut, N. and Andre, D. (1992, November). Freezing cocultured human blastocyst. *Fertility and Sterility*, 58(5), 977-980.
27. Eskew, A. M., and Jungheim, E. S. (2017, May/June). A history of developments to improve *in vitro* fertilization. *Missouri Medicine*, 114(3), 156–159.
28. The practice committee of the society for assisted reproductive technology and the practice committee of the american society for reproductive medicine. (2008, November). Preimplantation genetic testing: A practice committee opinion. *Fertility and Sterility*, 90(5), 136-143.
29. Schoolcraft, W. B., Treff, N. R., Stevens, J. M., Ferry, K., Katz-Jaffe, M., Scott, Jr., R. T. (2011, September). Live birth outcome with trophoctoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertility and Sterility*, 96(3), 638–640.
30. İnternet: Gibson, E., and Mahdy, H. (2010). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary. *StatPearls*. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545187/> adresinden 15 Mayıs 2021’de alınmıştır.
31. Yoshino, T., and Saito, D. (2019, August). Epithelial-to-mesenchymal transition-based morphogenesis of dorsal mesentery and gonad. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 92, 105-112.
32. Ying, J., Feng, J., Hu, J., Wang, S., Han, P., Huang, Y., Zhao, W., and Qian, J. (2019, June). Can ovaries be preserved after an ovarian arteriovenous disconnection? One case report and a review of surgical treatment using Da Vinci robots for aggressive ovarian fibromatosis. *Journal of Ovarian Research*, 12(1), 52.
33. Williams, C. J., and Erickson, G. F. (2012, January). Morphology and physiology of the ovary. In Feingold, K. R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., de Herder, W. W., Dhatariya, K., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J. M., Hofland, J., Kalra, S., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C. S., Kuohung, W., Laferrière, B., McGee, E. A., McLachlan, R., Morley, J. E., New, M., Purnell, J., Sahay, R., Singer, F., Stratakis, C. A., Trencé, D. L., and Wilson, D. P. (Eds.). *Endotext: Comprehensive FREE online Endocrinology Book*.
34. Kuyucu, Y. ve Tap, Ö. (2009). Oosit olgunlaşma süreci ve düzenleyici faktörler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18(4), 227-240.
35. Garrtner, L. P. and Hiatt, J. L. (2007). *Chapter 20: Female Reproductive System. In Color Textbook of Histology (Third edition)*. Philadelphia: Saunders.
36. Owens, L. A., Kristensen, S. G., Lerner, A., Christopoulos, G., Lavery, S., Hanyaloglu, A. C., Hardy, K., Yding Andersen, C., and Franks, S. (2019, December). Gene expression in granulosa cells from small antral follicles from women with or without polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 104(12), 6182-6192.

37. İnternet: 27.2: Anatomy and Physiology of the Female Reproductive System. *Anatomy and Physiology*. Web: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/27-2-anatomy-and-physiology-of-the-female-reproductive-system> adresinden 8 Mayıs 2021’de alınmıştır.
38. Gedikli, S., Özbek, E., ve Demirci, T. (2013, Ekim). Fertilizasyonun moleküler temeli. *Van Tıp Dergisi*, 20(4), 294-301.
39. Andrade, G. M., del Collado, M., Meirelles, F. V., da Silveira, J. C., and Perecin, F. (2019, July/September). Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Animal Reproduction*, 16(3), 485-496.
40. Sadler, T. W. (2005). *Langman’s Medikal Embriyoloji*. (Çev. Başaklar A. C.) Ankara: Palme Yayıncılık, 7-38.
41. Gougeon, A. (1996, April). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17(2), 121-155.
42. Reynolds, S. R. M. (1950, October/December). The vasculature of the ovary and ovarian function. *OmniaMed Communications*, 28(10-12), 456-457.
43. Teixeira, Filho, F. L., Baracat, E. C., Lee, T. H., Suh, C. S., Matsui, M., Chang, R. J., Shimasaki, S., and Erickson, G. F. (2002, March). Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(3), 1337-1344.
44. Hreinsson, J. G., Scott, J. E., Rasmussen, C., Swahn, M. L., Hsueh, A. J., and Hovatta, O. (2002, January). Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(1), 316-321.
45. Bruzzone, R., White, T. W., and Paul, D. L. (1996, May). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry*, 238(1), 1-27.
46. Hendriks, D. J., Mol, B. W., Bancsi, L. F., Te, Velde, E. R., and Broekmans, F. J. (2005, February). Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after *in vitro* fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertility and Sterility*, 83(2), 291-301.
47. Erickson, G. F., Magoffin, D. A., Dyer, C. A., and Hofeditz, C. (1985, July). The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrine Reviews*, 6(3), 371-399.
48. Huang, Z., and Wells, D. (2010, October). The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Molecular Human Reproduction*, 16(10), 715–725.
49. İnternet: The oocyte. *Atlas of Human Embryology*. Web: <http://atlas.eshre.eu/es/14546584881546780> adresinden 13 Mayıs 2021’de alınmıştır.

50. Dunlop, C. E. ve Anderson, R. A. (2014). The regulation and assessment of follicular growth. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 74(244), 13–17.
51. Geisert, R. D. and Lucy, M. C. (2018). Early Embryonic Development. In Skinner M. K. (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press: Elsevier, 2, 641-649.
52. Freitas, C., Neto, A. C., Matos, L., Silva, E., Ribeiro, Â., Silva-Carvalho, J. L., and Almeida, H. (2017, July). Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. *Journal of Ovarian Research*, 10(1), 44.
53. İnternet: Web: <http://www.aliburan.com/kumumumumu/> adresinden 8 Mayıs 2021’de alınmıştır.
54. Ge, L., Sui, H. S., Lan, G. C., Liu, N., Wang, J. Z., and Tan, J. H. (2008, December). Coculture with cumulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cumulus oophorus: observations of nuclear and cytoplasmic events. *Fertility and Sterility*, 90(6), 2376–2388.
55. Gilchrist R. B., Lane M., and Thompson J. G. (2008, March-April). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, 14(2), 159–177.
56. Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., and Thompson, J. G. (2010, April). The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, 139(4), 685–695.
57. Downs S. M., Humpherson P. G., and Leese H. J. (1998, April). Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biology of Reproduction*, 58(4), 1084–1094.
58. Coticchio, G., Dal, Canto, M., Mignini, Renzini, M., Guglielmo, M. C., Brambillasca, F., Turchi, D., Novara, P. V., and Fadini, R. (2015, July-August). Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*, 21(4), 427–454.
59. Pincus, G., and Enzmann, E. V. (1935, October). The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. The activation of ovarian eggs. *Journal of Experimental Medicine*, 62(5), 665–675.
60. Buccione, R., Vanderhyden, B. C., Caron, P. J., and Eppig, J. J. (1990, March). FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Developmental Biology*, 138(1), 16–25.
61. Salustri, A., Yanagishita, M., and Hascall, V. C. (1990, March). Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Developmental Biology*, 138(1), 26–32.
62. Salustri, A., Ulisse, S., Yanagishita, M., and Hascall, V. C. (1990, November). Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells *in vitro* is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-beta. *Journal of Biological Chemistry*, 265(32), 19517–19523.

63. Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., and Schoolcraft, W. B. (2015, February). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and Sterility*, 103(2), 303-316.
64. Otsuka, F., and Shimasaki, S. (2002, June). A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8060–8065.
65. Chang, H. M, Cheng, J. C, Taylor, E., and Leung, P. C. (2014, May). Oocyte-derived BMP15 but not GDF9 down-regulates connexin43 expression and decreases gap junction intercellular communication activity in immortalized human granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*, 20(5), 373–383.
66. Hennet M. L., and Combelles, C. M. H. (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 56, 819-831.
67. Russell, D. L., and Robker, R. L. (2018). Cumulus Cells. In Skinner M. K. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier, 2, 43-46.
68. Russell, D. L., Doyle, K. M., Ochsner, S. A., Sandy, J. D., and Richards, J. S. (2003, October). Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42330-42339.
69. Varani, S., Elvin, J. A., Yan, C., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Horton, H. F., Byrne, M. C., and Matzuk, M. M. (2002, June). Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Molecular Endocrinology*, 16(6), 1154-1167.
70. Eppig, J. J, Wigglesworth, K., and Pendola, F. L. (2002, February). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2890-2894.
71. Agarwal, A., Gupta, S., and Sharma, R. K. (2005, July). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 28.
72. Siu, M. K, and Cheng, C. Y. (2012). The blood-follicle barrier (BFB) in disease and in ovarian function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 763, 186–192.
73. Shimasaki, S., Moore, R. K., Otsuka, F., and Erickson, G. F. (2004, February). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews*, 25(1), 72–101.
74. Akiyama, I., Yoshino, O., Osuga, Y., Shi, J., Harada, M., Koga, K., Hirota, Y., Hirata, T., Fujii, T., Saito, S., and Kozuma, S. (2014, April). Bone morphogenetic protein 7 increased vascular endothelial growth factor (VEGF)-a expression in human granulosa cells and VEGF receptor expression in endothelial cells. *Reproductive Sciences*, 21(4), 477–482.

75. Konukoğlu, D. (1997). Serbest radikaller ve önemleri. *Aile Hek Dergisi*, 1(4), 197-200.
76. Çavdar, C., Sifil, A., ve Çamsarı, T. (1997). Reactive oxygen particles and antioxidant defence. *Office Journal of the Turkish Nephrology*, 6, 92-95.
77. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. (2015, January). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.
78. Adwas, A. A., Ibrahim, Elsayed, A. S., Azab, A. E., and Quwaydir, F. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 6(1), 43-47.
79. Büyüksulu, N., ve Yiğitbaşı, T. (2015). Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(3), 197-203.
80. Kehrer, J. P., and Klotz, L. O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: Implications for Health. *Critical Reviews In Toxicology*, 45(9), 765-798.
81. Sachdeva, M., Karan, M., Singh, T., and Dhingra, S. (2014). Oxidants and antioxidants in complementary and alternative medicine: A review. *Spatula DD*, 4(1), 1-16
82. Sies, H. (1997, March). Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.
83. Kumar, S. (2011). Free radicals and antioxidants: Human and food system. *Pelagia Research Library. Advances in Applied Science Research*, 2(1), 129-135.
84. Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E. Ş., ve Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (Cat) ve glutatyon peroksidaz (Gpx). *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.
85. Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000, November). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
86. De Duve, C., and Bauduhuin, P. (1966, April). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews*, 46, 323-357.
87. Schrader, M., and Fahimi, H. D. (2006, December). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12), 1755-1766.
88. Cheeseman, K. H., and Slater, T. F. (1993, July). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493.
89. Agarwal, A., Said, T. M., Bedaiwy, M. A., Banerjee, J., and Alvarez, J. G. (2006, September). Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and Sterility*, 86(3), 503-512.

90. Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., ve Yönden, Z. (2015, September). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.
91. Combelles, C. M. H., Gupta, S., and Agarwal, A. (2009, June). Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes?. *Reprod Biomed Online*, 18(6), 864-880.
92. Schafer, F. Q., Qian, S. Y., and Buettner, G. R. (2000, May). Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cellular and Molecular Biology*, 46(3), 657-662.
93. Bast, A. (1993). Oxidative stress and calcium homeostasis. In: Halliwell, B., and Aruoma, O. I. (Eds.). *DNA and free radicals*. London: Ellis Horwood, 95-108.
94. Marnett, L. J. (1999, March). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424(1-2), 83-95.
95. Butterfield, D. A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., Yatin, S., Allen, K., Aksenov, M., Aksenova, M., and Carney, J. (1998, November). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 448-462.
96. Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete-Santos, A., Grune, T., Simm, A. (2014, january). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, 2, 411-429.
97. Demple, B., and Levin, J. D. Repair systems for radical-damaged DNA, In: Sies H, editor. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. New York: Academic Press, 1991. pp 119-154.
98. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry*, 39, 44-84.
99. Wang, S., He, G., Chen, M., Zuo, T., Xu, W., and Liu, X. (2017, September). The role of antioxidant enzymes in the ovaries. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 4371714.
100. Karabulut, H., ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1).
101. Koca, N., ve Karadeniz, F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 32-37.
102. Aksoy, A. S. (2018). *Bazı flavonoidlerin sığır karaciğer glutatyon s-transferaz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
103. Türkan, F. (2015). *Karayemiş meyvesinden (Prunus Laurocerasus L.) glutatyon s-transferaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

104. Arı, F., ve Dere, E. (2003). Benzen'in karaciğer glutatyon s-transferaz enzim aktivitesine *in vitro* etkisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 24(1).
105. Dzoyem, J. P., Kuete, V. and Eloff, J. N. (2014). Biochemical parameters in toxicological studies in Africa: Significance, principle of methods, data interpretation, and use in plant screenings. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, 659-715.
106. Tekeli, H. (2012). Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında glutatyon (GSH) ve glutatyon stransferaz (GST) aktivitesi üzerine n-asetil sisteinin etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
107. Jawahar, M. S., and Banu, Rekha, V. V. (2012). Drugs used in tuberculosis and leprosy. *Side Effects of Drugs Annual*, 34, 479-486.
108. Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. and Dowd, C. A. (2001, November). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(1), 1–16.
109. Nebert, D. W. and Vasiliou, V. (2004, November). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics*, 1(6), 460–464.
110. Townsend, D. M., and Tew, K. D. (2003, October). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22, 7369–7375.
111. Türkoğlu, S., Gülcü, Bulmuş, F., Parmaksız, A., Özkan, Y., ve Gürsu, F. (2008). Metabolik sendromlu hastalarda paraoksonaz 1 ve arilesteraz aktivite düzeyleri. *Fırat Tıp Dergisi*, 13(2), 110-115.
112. Gülcü, F., ve Gürsu, M.F. (2003). Paraoksonaz ve aril esteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu. *Türk Biyokimya Dergisi*, 28 (2), 45-49.
113. Gökbulut, V., Dursun, H., Kaplan, M., and Öztaş, E. (2019). Paraoxonase 1 and arylesterase levels in patients with ulcerative colitis and their relationship with disease activity. *The Turkish Journal of Academic Gastroenterology*, 18, 33-37.
114. Yıldırım, A., Aslan, Ş., Ocak, T., Yıldırım, S., Kara, F., and Şahin, Y. N. (2007, August). Serum paraoxonase/arylesterase activities and malondialdehyde levels in trauma patients. *The Eurasian Journal of Medicine*, 39(2), 85-88.
115. Akoglu, G., Metin, A., Kilinc, F., Demir, Pektas, S., Isikoglu, S., Akbas, A., and Sener, S. (2013, August). Total Serum Oxidant/Antioxidant Status and Arylesterase Activity in Recurrent Aphthous Stomatitis. *Annals of Dermatology*, 25(3), 273-277.
116. Kurban, S., Akpınar, Z., ve Mehmetoğlu, İ. (2010). Multiple skleroz hastalarında serum paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri ile oksidatif stresin araştırılması. *Genel Tıp Dergisi*, 20(1), 13-17.

117. Eckerson, H. W., Wyte, C. M., and La Du, B.N. (1983, November). The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*, 35, 1126-1138.
118. Ayala, A., Muñoz, M.F., and Argüelles, S. (2014, May). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 360438.
119. Kavas, G. Ö. (1994). Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. *Ankara Tıp Mecmuası (The Journal Of The Faculty Of Medicine)*, 47, 579-592.
120. Süleyman, H., Gül, V., ve Erhan, E. (2018). Oksidatif stres ve doku hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi*, 1(1), 1-4.
121. García-Ruiz, I., de la Torre, P., Díaz T., Esteban, E., Fernández, I., Muñoz-Yagüe, T., and Solís-Herruzo, J. A. (2002, August). Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30551–30558.
122. Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81–128.
123. Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A. and Gupta, S. (2012, June). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10, 49.
124. İnternet: Agarwal, A., Gupta, S. and Sabanegh, E. *Oxidative Stress and Female Infertility*. Obstetrics/Gynecology perspectives. Web: [https://www.clevelandclinic.org/ReproductiveResearchCenter/docs/publications/45_Oxidative Stress and Female Infertility.pdf](https://www.clevelandclinic.org/ReproductiveResearchCenter/docs/publications/45_Oxidative%20Stress%20and%20Female%20Infertility.pdf) adresinden 08 Mayıs 2021’de alınmıştır.
125. Pasqualotto, E. B., Agarwal, A., Sharma, R. K., Izzo, V. M., Pinotti, J. A., Joshi, N. J., and Rose, B. I. (2004, April). Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility*, 81, 973-976.
126. Paszkowski, T., and Clarke, R. N. (1996, November). Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Human Reproduction*, 11, 2493-2495.
127. Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., Goldberg, J. M., Miller, K. F., Agarwal, A., and Sharma, R. K. (2000, September-October). The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of *in vitro* fertilization. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*, 45, 314-320.
128. Jungheim, E. S., Macones, G. A., Odem, R. R., Patterson, B. W., Lanzendorf, S. E., Ratts, V. S., and Moley, K. H. (2011, May). Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 95(6), 1970–1974.

129. Fateh, M., Ben-Rafael, Z., Benadiva, C. A., Mastroianni Jr, L., and Flickinger, G. L. (1989, March). Cortisol levels in human follicular fluid. *Fertility and Sterility*, 51(3), 538–541.
130. Michael, A. E., Gregory, L., Piercy, E. C., Walker, S. M., Shaw, R. W., and Cooke, B. A. (1995, September). Ovarian 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity is inversely related to the outcome of *in vitro* fertilization-embryo transfer treatment cycles. *Fertility and Sterility*, 64(3), 590–598.
131. Keay, S. D., Harlow, C. R., Wood, P. J., Jenkins, J. M., and Cahill, D. J. (2002, September). Higher cortisol: Cortisone ratios in the preovulatory follicle of completely unstimulated IVF cycles indicate oocytes with increased pregnancy potential. *Human Reproduction*, 17(9), 2410–2414.
132. Lewicka, S., von Hagens, C., Hettinger, U., Grunwald, K., Vecsei, P., Runnebaum, B., and Rabe, T. (2003, August). Cortisol and cortisone in human follicular fluid and serum and the outcome of IVF treatment. *Human Reproduction*, 18(8), 1613–1617.
133. Donabela, F. C., Meola, J., Padovan, C. C., de Paz, C. C., and Navarro, P. A. (2015, November). Higher SOD1 gene expression in cumulus cells from infertile women with moderate and severe endometriosis. *Reproductive Sciences*, 22(11), 1452–1460.
134. Shaeib, F., Khan, S. N., Ali, I., Thakur, M., Saed, M. G., Dai, J., Awonuga, A.O., Banerjee, J., and Abu-Soud, H. M. (2016, April). The defensive role of cumulus cells against reactive oxygen species insult in metaphase II mouse oocytes. *Reproductive Sciences*, 23(4), 498–507.
135. Jozwik, M., Wolczynski, S., and Szamatowicz, M. (1999, May). Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Molecular Human Reproduction*, 5(5), 409–413.
136. El Mouatassim, S., Guerin, P., and Menezo, Y. (1999, August). Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Molecular Human Reproduction*, 5(8), 720–725.
137. Guerin, P., El Mouatassim, S., and Menezo, Y. (2001, March-April). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2), 175–189.
138. Vural, P., Akgul, C., Yildirim, A., and Canbaz, M. (2000, May). Antioxidant defence in recurrent abortion. *Clinica Chimica Acta*, 295(1-2), 169–177.
139. Henmi, H., Endo, T., Kitajima, Y., Manase, K., Hata, H., and Kudo, R. (2003, August). Effects of ascorbic acid supplementation on serum progesterone levels in patients with a luteal phase defect. *Fertility and Sterility*, 80(2), 459–461.
140. Sabatini, L., Wilson, C., Lower, A., Al-Shawaf, T., and Grudzinskas, J. G. (1999, December). Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 72(6), 1027–1034.

141. de Bruin, J. P., Dorland, M., Spek, E. R., Posthuma, G., van Haaften, M., Looman, C. W., and te Velde, E. R. (2002, April). Ultrastructure of the resting ovarian follicle pool in healthy young women. *Biology of Reproduction*, 66(4), 1151-1160.
142. Ray, S. D., Lam, T. S., Rotollo, J. A., Phadke, S., Patel, C., Dontabhaktuni, A., Mohammad, S., Lee, H., Strika, S., Dobrogowska, A., Bruculeri, C., Chou, A., Patel, S., Patel, R., Manolas, T., and Stohs, S. (2004). Oxidative stress is the master operator of drug and chemically-induced programmed and unprogrammed cell death: Implications of natural antioxidants *in vivo*. *Biofactors*, 21(1-4), 223-232.
143. Bedaiwy, M. A., and Falcone, T. (2003, August). Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications. *Minerva Obstetrics and Gynecology*, 55(4), 333-345.
144. Choi, H. K., Choi, B. C., Lee, S. H., Kim, J. W., Cha, K. Y., and Baek, K. H. (2003, September). Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Molecular Reproduction and Development*, 66(1), 24-31.
145. Oner-Iyidogan, Y., Kocak, H., Gurdol, F., Korkmaz, D., and Buyru, F. (2004). Indices of oxidative stress in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 57(4), 214-217.
146. Mier-Cabrera, M., Jimenez-Zamudio, L., Garcia-Latorre, E., Cruz-Orozco, O., and Hernandez-Guerrero, C. (2010, January). Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 118(1), 6-16.
147. Mansour, G., Abdelrazik, H., Sharma, R. K., Radwan, E., Falcone, T., and Agarwal, A. (2009, May). L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 91(5), 2079-2086.
148. Zhao, H., Zhao, Y., Li, T., Li, M., Li, J., Li, R., Liu, P., Yu, Y., and Qiao, J. (2015, September). Metabolism alteration in follicular niche: the nexus among intermediary metabolism, mitochondrial function, and classic polycystic ovary syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 86, 295-307.
149. Victor, V. M., Rocha, M., Banuls, C., Alvarez, A., de Pablo, C., Sanchez-Serrano, M., Gomez, M., and Hernandez-Mijares, A. (2011, October). Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(10), 3115-3122.
150. Yilmaz, M., Biri, A., Karakoc, A., Törüner, F., Bingöl, B., Cakir, N., Tiras, B., Ayvaz, G., and Arslan, M. (2005, December). The effects of rosiglitazone and metformin on insulin resistance and serum androgen levels in obese and lean patients with polycystic ovary syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, 28(11), 1003-1008.

151. Gonzalez, F., Rote, N. S., Minium, J., and Kirwan, J. P. (2006, January). Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(1), 336–340.
152. Palacio, J. R., Iborra, A., Ulcova-Gallova, Z., Badia, R., and Martínez, P. (2006, May). The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 144(2), 217–222.
153. Dinger, Y., Akcay, T., Erdem, T., Saygılı E. İ., and Gündoğdu, A. S. (2005). DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione level in women with polycystic ovary syndrome. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 65(8), 721–728.
154. Polak, G., Koziol-Montewka, M., Tarkowski, R., and Kotarski, J. (2001, December). Peritoneal fluid and plasma 4-hydroxynonenal and malonyldialdehyde concentrations in infertile women. *Ginekologia Polska*, 72(12A), 1316–1320.
155. Agarwal, A., Gupta, S., Sekhon, L., and Shah, R. (2008, August). Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(8), 1375–1403.
156. Poston, L., and Raijmakers, M. T. (2004, April). Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome--a review. *Placenta*, 25, 72–78.
157. Burton, G. J., Hempstock, J., and Jauniaux, E. (2003, January-February). Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(1), 84–96.
158. Gupta, S., Agarwal, A., Banerjee, J., and Alvarez, J. G. (2007, May). The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 62(5), 335–347.
159. El-Far, M., El-Sayed, I. H., El-Motwally, Ael, G., Hashem, I. A., and Bakry, N. (2007). Tumor necrosis factor-alpha and oxidant status are essential participating factors in unexplained recurrent spontaneous abortions. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(7), 879–883.
160. Quenby, S., Nik, H., Innes, B., Lash, G., Turner, M., Drury, J., and Bulmer, J. (2009, January). Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Human Reproduction*, 24(1), 45–54.
161. Nakamura, M., Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Okazaki, S., Farina, A., Wibowo, N., Shimizu, H., and Okai, T. (2009, July). Cellular mRNA expressions of anti-oxidant factors in the blood of preeclamptic women. *Prenatal Diagnosis*, 29(7), 691–696.
162. Dechend, R., Viedt, C., Muller, D. N., Ugele, B., Brandes, R. P., Wallukat, G., Park, J. K., Janke, J., Barta, P., Theuer, J., Fiebeler, A., Homuth, V., Dietz, R., Haller, H., Kreuzer, J., and Luft, F. C. (2003, April). AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation*, 107(12), 1632–1639.

163. Costa, L. G., Vitalone, A., Cole, T. B., and Furlong, C. E. (2005, February). Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology*, 69(4), 541–550
164. Baker, A. M., Klein, R. L., Haeri, S., Moss, K. L., and Boggess, K.A. (2010). Association of Midgestational Paraoxonase 1 activity with pregnancies complicated by preeclampsia. *American Journal of Perinatology*, 27(3), 205–210.
165. Kumru, S., Aydin, S., Gursu, M. F., and Ozcan, Z. (2004, June). Changes of serum paraoxonase (an HDL-cholesterol-associated lipophilic antioxidant) and arylesterase activities in severe preeclamptic women. *European Journal of Obstetrics ve Gynecology and Reproductive Biology*, 114(2), 177–181.
166. Uzun, H., Benian, A., Madazli, R., Topcuoglu, M. A., Aydin, S., and Albayrak, M. (2005). Circulating oxidized low-density lipoprotein and paraoxonase activity in preeclampsia. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 60(4), 195–200.
167. Khan, R. N., Matharoo-Ball, B., and Shaw, R. W. (2010, January). Antioxidant enzyme expression, lipid peroxidation, and protein oxidation in human myometrium with parturition. *Reproductive Sciences*, 17, 78–84.
168. Mustafa, M. D., Pathak, R., Ahmed, T., Ahmed, R. S., Tripathi, A. K., Guleria, K., and Banerjee, B. D. (2010, September). Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress markers in preterm labor. *Clinical Biochemistry*, 43(13-14), 1124–1128.
169. Luke, B., Brown, M. B., Stern, J. E., Missmer, S. A., Fujimoto, V. Y., Leach, R., and SART Writing Group. (2011, January). Female obesity adversely affects assisted reproductive technology (ART) pregnancy and live birth rates. *Human Reproduction*, 26(1), 245–252.
170. Marquard, K. L., Stephens, S. M., Jungheim, E. S., Ratts, V. S., Odem, R. R., Lanzendorf S., and Moley, K. H. (2011, May). Polycystic ovary syndrome and maternal obesity affect oocyte size in *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*, 95(6), 2146–2149.
171. Machtinger, R., Combelles, C. M., Missmer, S. A., Correia, K. F., Fox J. H., and Racowsky, C. (2012, November). The association between severe obesity and characteristics of failed fertilized oocytes. *Human Reproduction*, 27(11), 3198–3207.
172. Wu, L. L.-Y., Dunning, K. R., Yang, X., Russell, D. L., Lane, M., Norman, R. J., and Robker, R. L. (2010, November). Highfat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology*, 151(11), 5438–5445.
173. Minge, C. E., Bennett, B. D., Norman, R. J., and Robker, R. L. (2008, May). Peroxisome proliferator– activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. *Endocrinology*, 149(5), 2646–2656.

174. Luzzo, K. M., Wang, Q., Purcell, S. H., Chi, M., Jimenez, P. T., Grindler, N., Schedl, T., and Moley, K. H. (2012, November). High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects. *PLoS One*, 7(11), e49217.
175. Jungheim, E. S., Schoeller, E. L., Marquard, K. L., Loudon, E. D., Schaffer, J. E., and Moley, K. H. (2010, August). Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. *Endocrinology*, 151(8), 4039–4046.
176. Bloomer, R. J., and Fisher-Wellman, K. H. (2009, January-March). Systemic oxidative stress is increased to a greater degree in young, obese women following consumption of a high fat meal. *Oxid Med Cell Longev*, 2(1), 19–25.
177. Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Kimura, M., Noma, K., Hara, K., Matsuura, H., Goto, C., Oshima, T., Chayama, K., and Yoshizumi, M. (2003, July). Low body mass index is a risk factor for impaired endothelium-dependent vasodilation in humans: role of nitric oxide and oxidative stress. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(2), 256–263.
178. Bernal, A. B., Vickers, M. H., Hampton, M. B., Poynton, R. A., and Sloboda, D. M. (2010, December). Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. *PLoS One*, 5(12), e15558.
179. Brewer, C. J., and Balen, A. H. (2010, September). The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction*, 140(3), 347–364.
180. Purcell, S. H., and Moley, K. H. (2011, June). The impact of obesity on egg quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(6), 517–524.
181. Paszkowski, T. Clarke, R. N. and Hornstein, M. D. (2002, April). Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Human Reproduction*, 17(4), 921–925.
182. Huang, J., Okuka, M., McLean, M., Keefe, D. L., and Liu, L. (2009, October). Effects of cigarette smoke on fertilization and embryo development *in vivo*. *Fertility and Sterility*, 92(4), 1456–1465.
183. Ornoy, A. (2007, July). Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reproductive Toxicology*, 24(1), 31–41.
184. Chelchowska, M., Ambroszkiewicz, J., Gajewska, J., Laskowska-Klita, T., and Leibschang, J. (2011, April). The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 155(2), 132–136.
185. Sun, A. Y., Ingelman-Sundberg, M., Neve, E., Matsumoto, H., Nishitani, Y., Minowa, Y., Fukui, Y., Bailey, S. M., Patel, V. B., Cunningham, C. C., Zima, T., Fialova, L., Mikulikova, L., Popov, P., Malbohan, I, Janebova, M., Nespor, K., and Sun, G. Y. (2001, May). Ethanol and oxidative stress. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25, 237S–243S.

186. Richardson, G. A., Day, N. L., and McGauhey, P. J. (1993, June). The impact of prenatal marijuana and cocaine use on the infant and child. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 36(2), 302–318.
187. Anderson, K., Nisenblat, V., and Norman, R. (2010, February). Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 50(1), 8–20.
188. Zimmerman, E. F., Potturi R. B., Resnick, E., and Fisher, J. E. (1994, March). Role of oxygen free radicals in cocaine-induced vascular disruption in mice. *Teratology*, 49(3), 192–201.
189. Hoyme, H. E., Jones, K. L., Dixon, S. D., Jewett, T., Hanson, J. W., Robinson, L. K., Msall, M. E., and Allanson, J. E. (1990, May). Prenatal cocaine exposure and fetal vascular disruption. *Pediatrics*, 85(5), 743–747.
190. Kovacic, P. (2005). Unifying mechanism for addiction and toxicity of abused drugs with application to dopamine and glutamate mediators: electron transfer and reactive oxygen species. *Medical Hypotheses*, 65(1), 90–96.
191. Sutton, P., Wallinga, D., Perron, J., Gottlieb, M., Sayre, L., and Woodruff, T. (2011, May). Reproductive health and the industrialized food system: a point of intervention for health policy. *Health Aff (Millwood)*, 30(5), 888–897.
192. Petrelli, G., Figa-Talamanca, I., Lauria, L., and Mantovani, A. (2003, July). Spontaneous abortion in spouses of greenhouse workers exposed to pesticides. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 8(3), 77–81.
193. Meeker, J. D., Maity, A., Missmer, S. A., Williams, P. L., Mahalingaiah, S., Ehrlich, S., Berry, K. F., Altshul, L., Perry, M. J., Cramer, D. W., and Hauser, R. (2011, July). Serum concentrations of polychlorinated biphenyls in relation to *in vitro* fertilization outcomes. *Environmental Health Perspectives*, 119(7), 1010–1016.
194. Aebi, H. (1974). Catalase. In: H. U. Bergmeyer (Ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. New York and London. Academic Press, pp.673-677.
195. Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974, November). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130– 7139.
196. Clement, E., Richter, R., Seidel, S., Costa, L., and Motulsky, A. (1989, August). Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Analytical Biochemistry*, 180(2), 242-247.
197. Van, Ye, T. M., Roza, A. M., Pieper, G. M., Henderson, J. Jr., Johnson, J. P., and Adams, M. B. (1993, November). Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphological damage. *Journal of Surgical Research*, 55(5), 553-558.
198. Oral, O., Kutlu, T., Aksoy, E., Fıçıcıoğlu, C., Uslu, H., and Tuğrul, S. (2006, February). The Effects of Oxidative Stress on Outcomes of Assisted Reproductive Techniques. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 23(2), 81–85.

199. Elsharkawy, S. S., Abdrabo, M. S., khalil, M. H., and Mannaa, H. F. (2020, January). Evaluation of Oxidative Stress Markers in Serum and Follicular Fluid of Women with Infertility Related to Endometriosis. *Journal of Clinical Obstetrics, Gynecology & Infertility*, 4(1), 1045.
200. Orprayoon, N., Thuwanut, P., Sereepapong, W., Rungsiwiwut, R., and Sirayapiwat, P. (2020). Antioxidative enzyme-related gene expression levels in cumulus cells during *in vitro* fertilization: A comparison between normal and poor ovarian responders.
201. Kala, M., Shaikh, M. V., and Nivsarkar, M. (2017, December). Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(1), 28–35.
202. Atmaca, E., ve Aksoy, A. (2009). Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 79–83.
203. Nuñez-Calonge, R., Cortés, S., Gutierrez, Gonzalez, L. M., Kireev, R., Vara, E., Ortega, L., Caballero, P., Rancan, L., and Tresguerres, J. (2016, April). Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reproductive BioMedicine Online*, 32(4), 446–456.
204. Gupta, S., Choi, A., Yu, H. Y., Czerniak, S. M., Holick, E. A., Paoletta, L. J., Agarwal, A., and Combelles, C. M. H. (2011, December). Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity, and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(5), 673–680.
205. Carbone, M. C., Tatone, C., Delle, Monache, S., Marci, R., Caserta, D., Colonna, R., and Amicarelli, F. (2003, November). Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: Characterization and age-dependent changes. *Molecular Human Reproduction*, 9(11), 639–643.
206. Ito, M., Muraki, M., Takahashi, Y., Imai, M., Tsukui, T., Yamakawa, N., Nakagawa, K., Ohgi, S., Horikawa, T., Iwasaki, W., Iida, A., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H., Miyado, K., Kono, T., Hosoi, Y., and Saito, H. (2008, October). Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1026-1035.
207. Mihalas, B. P. , Redgrove, K. A. , McLaughlin, E. A. , and Nixon, B. (2017). Molecular mechanisms responsible for increased vulnerability of the ageing oocyte to oxidative damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 4015874
208. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., and Remacle, J. (1994, September). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/ZnSOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 235–248.
209. El-Shahat, K.H., and Kandil, M. (2012, May). Antioxidant capacity of follicular fluid in relation to follicular size and stage of estrous cycle in buffaloes. *Theriogenology*, 77(8), 1513-1518.

210. Núñez Calonge, R., Lisa, R., Susana, C., Elena, V., Carolina, A., Pedro, C., and Jesús, F.T. (2019, January). Apoptotic markers and antioxidant enzymes have altered expression in cumulus and granulosa cells of young women with poor response to ovarian stimulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1).
211. Chowdary, H., Koli, R., Gupta, S., Sharma, R., Combelles, C., and Agarwal, A. Dynamic changes in the catalase activity of bovine follicular fluid: Correlation with the stages of antral folliculogenesis and follicle dominance. *Fertility and Sterility [Abstract]*, 88(1), (S300).
212. Behl, R. and Pandey, R. S. (2002, April). FSH induced stimulation of catalase activity in goat granulosa cells *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 70(3-4), 215–221,
213. Meijide, S., Hernández, M. L., Navarro, R., Larreategui, Z., Ferrando, M., Ruiz-Sanz, J. I., and Ruiz-Larrea, M. B. (2014, October). Glutathione S-transferase activity in follicular fluid from women undergoing ovarian stimulation: role in maturation. *Free Radical Biology & Medicine*, 75(1), S41.
214. Kumar, S., Mishra, V., Thaker, R., Gor, M., Perumal, S., Joshi, P., Sheth, H., Shaikh, I., Gautam, A. K. and Verma, Y. (2018, December). Role of environmental factors & oxidative stress with respect to *in vitro* fertilization outcome. *Indian Journal of Medical Research*, 148(1), 125-133.
215. Karakaya, C., Kavutcu, M., Gumuslu, S., Oktem, M., Erdem, A., and Canbolat, O. (2011, September). Evaluation of follicular fluid antioxidant-oxidant status in high, normo, and poor responder patients undergoing assisted reproductive techniques. *Fertility and Sterility [Abstract]*.
216. Angelucci, S., Ciavardelli, D., Di Giuseppe, F., Eleuterio, E., Sulpizio, M., Tiboni, G. M., Giampietro, F., Palumbo, P., and Di Ilio, C. (2006, November). Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764(11), 1775–1785.
217. Meijide, S., Pérez-Ruiz, I., Hernández, M. L., Navarro, R. N, Ferrando, M., Larreategui, Z., Ruiz-Sanz, J.-I., and Ruiz-Larrea, M. B. (2017, October). Paraoxonase activities in human follicular fluid: role in follicular maturation. *Reproductive Biomedicine Online*, 35(4), 351–362.
218. Ubaldi, F., Vaiarelli A., D’Anna, R., and Rienzi, L. (2014, July). Management of poor responders in IVF: Is there anything new? *BioMed Research International*, 10, 352098.
219. Padhy, N., Gupta, S., Mahla, A., Latha, M., and Varma, T. (2010, May). Demographic characteristics and clinical profile of poor responders in IVF / ICSI: A comparative study. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 3(2), 91–94.



Ek-1. Gazi üniversitesi klinik araştırmalar etik kurulu değerlendirme formu

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU									
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI		Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu						
	AÇIK ADRES								
	TELEFON								
	FAKS								
	E-POSTA								
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Tüp bebek tedavisine devam eden hastaların kümülsüz hücrelerinde ve folikül sıvılarında kemik morfolojik protein-15 (BMP-15), büyüme farklılaşma faktörü-9 (GDF-9), 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHG) ve oksidan /antioksidan sistem düzeylerinin araştırılması						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI SOYADI		Doç. Dr. Cengiz KARAKAYA						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI/UZMANLIK ALANI BULUNDUĞU MERKEZ		Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı / G.Ü.T.F.						
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)								
	YARDIMCI ARAŞTIRMALAR		Prof.Dr.Onur Karabacak, Prof.Dr.Mehmet Erdem, Prof.Dr.Mustafa Kavutçu, Doktora ögr.Rabia Tural, Araş.Gör.Duygu Dayanır						
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ		Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji kolleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Antropometrik ölçümlere dayalı olarak yapılan araştırmalar - Doktora tezi						
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı		Tarihi	Ver.No	Dili				
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		06.12.2019	2	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐				
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU		06.12.2019	2	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐				
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı				Açıklama				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		☒						
	BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU		☐						
	DİĞER		☐						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 274		Toplantı tarihi:23.12.2019						
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.								
	KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU								
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. D. Berrin GÜNAYDIN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza			
Prof. Dr. D. Berrin GÜNAYDIN BAŞKAN	Anest. ve Rea. AD. Farmako. Bldr.	G.Ü.T.F.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐				

Ek-1. (devam) Gazi üniversitesi klinik araştırmalar etik kurulu değerlendirme formu

Prof. Dr. Gülten TAÇOY BAŞKAN YARD.	Kardiyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. İlyas OKUR BİLDİRİMDEN SORUMLU ÜYE	Çocuk Sağ. ve Hast AD Ç. Met. Bes BD	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nevzat YÜKSEL ÜYE	Psikiyatri AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN ÜYE	Tıbbi Genetik AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nuriye ÖZDEMİR ÜYE	İç Hast. AD. Tıbbi Onkoloji BD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL ÜYE	Tıbbi Biyokimya A.D.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Hasan BOSTANCI ÜYE	Genel Cerrahi AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Murat UÇAR ÜYE	Radyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Gökçe S. ÖZTÜRK FİNCAN ÜYE	Tıbbi Farmakoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr.Öğr.Üyesi A.Meltem SEVGİLİ ÜYE	Tıbbi Fizyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Uzm Dr. Emine AVCI ÜYE	Halk Sağlığı	Halk Sağlığı Genel Müd.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Araş.Gör.Dr. Fahri Erdem KAŞAK ÜYE	Hukukçu	Hacı Bayram Veli Üniv.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
İ. Nüket EKŞİ ÜYE	Sivil Temsilci	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TURAL, Rabia

Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyokimya	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyokimya	2014
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2004

İş Deneyimi,

Yıl	Çalıştığı Yer	İş Deneyimi
2016- devam ediyor	Sinop Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..