

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**MİKROENJEKSİYON ve PİEZO ELEKTRİK UYGULANMIŞ İNSAN
OOSİTLERİNDE DNA HASARININ BELİRLENMESİ VE ÖSTROJEN
RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMLERİNİN FERTİLİZASYONA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Özge Üner Ayvaz

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Abdullah EKMEKÇİ

ANKARA
Ekim 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**MİKROENJEKSİYON ve PİEZO ELEKTRİK UYGULANMIŞ İNSAN
OOSİTLERİNDE DNA HASARININ BELİRLENMESİ VE ÖSTROJEN
RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMLERİNİN FERTİLİZASYONA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Özge Üner Ayvaz

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Abdullah EKMEKÇİ

Bu tez, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-89 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Ekim 2008

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Resimler, Grafikler	VII
Tablolar	X
Semboller, Kısaltmalar	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnsan oosit hücresi	4
2.1.1.Oogenez	4
2.1.2.Oosit olgunlaşması	6
2.2. İnsan in vitro Fertilizasyon Uygulamalarının Tarihçesi	7
2.3. IVF Yöntemine Genel Bakış ve Uygulanan Yardımcı Teknikler	8
2.3.1. İnfertilite (kısırlık)	9
2.3.2. Ovulasyon İndüksiyonu ve Oosit Toplama	9
2.3.3. Oosit Toplama	10

2.3.4. Sperm Hazırlama	10
2.3.5. Mikroenjeksiyon	11
2.3.6. Piezo Elektirik Yöntemi ile Oosit Aktivasyonu	12
2.3.7. Embriyo Kültürü	13
2.3.8. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi ve Embriyo Transferi	14
2.4. Tek hücrede DNA hasarını Belirleme: Komet Tekniği	15
2.4.1. Komet Tekniğinin Kullanım Alanları	18
2.4.2. Komet Tekniğinin Uygulanabildiği Hücreler	19
2.5. Kadınlarda Östrojen Hormonunun İşlevi	20
2.5.1. Östrojen Üretimi	21
2.5.2. Östrojenlerin Etki Mekanizması	21
2.5.3 Östrojen Reseptör Proteini Alfa'nın Yapısı	23
2.5.4 ÖR α 'nın Aktivasyonu	25
2.5.5. Östrojen Reseptör Geni	26
2.5.6. Östrojen Reseptör Gen Polimorfizmleri	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Araç ve Gereçler	32

3.1.1.Cihazlar	32
3.1.2. Kimyasal Maddeler	33
3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı	34
3.2.1. 5X TBE Çözeltisi Hazırlanışı	34
3.2.2. 1X TBE Çözeltisi Hazırlanışı	34
3.2.3. Orange G Jel Yükleme Boyası Hazırlanışı	35
3.2.4. Stok Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı	35
3.2.5. 3X Sodyum asetat (NaOAc) Çözeltisi Hazırlanışı	35
3.2.6. 1M Tris-HCl (pH 7.5) Hazırlanışı	35
3.2.7. Komet Lizis Solüsyonunun Hazırlanışı	35
3.2.8. Akridin Oranj Solüsyonunun Hazırlanışı	36
3.3. Agaroz Jel Hazırlanışı	36
3.4. Yöntemler	36
3.4.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler	36
3.4.2. Oositlere Komet Tekniğinin Uygulanması	38
3.4.3. Genomik DNA Saflaştırılması	39
3.4.4. ÖR-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgelerinin PZT ile Çoğaltılması	40

3.4.4.1. ÖR-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgenin PZT Tepkime Karışımı	42
3.4.4.2. ÖR-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgenin PZT Programı	43
3.4.4.3. ÖR-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgeye Ait PZT Ürünlerinin Analizi	43
3.4.5. ÖR-1 c.454-397 T>C Polimorfizminin Belirlenmesi için PZT Ürünlerinin <i>PvuII</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	44
3.4.5.1. Deneyin Yapılışı	44
3.4.6 ÖR-1 c.454-351 A>G Polimorfizminin Belirlenmesi için PZT Ürünlerinin <i>XbaI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	45
3.4.6.1. Deneyin Yapılışı	45
3.4.7.Döngüsel DNA Analizi Yöntemi ile c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerinin PZT-RFLP Sonuçlarının Doğrulanması	46
3.4.8. Saflaştırılan PZT Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Analizi	46
3.4.9. Döngüsel DNA Dizi Analizi Tepkime Karışımı	47
3.4.10. ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarları İçeren Bölgenin PZT ile Çoğaltılması	48
3.4.10.1. ÖR Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarı İçeren Bölgenin Tepkime Karışımı	50

3.4.10.2. ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarını İçeren Bölgenin PZT Programı	51
3.4.10.3. ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarlarını İçeren PZT Ürünlerinin Analizi	52
3.4.10.4. ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarlarının Analizi	52
3.4.10.5. Döngüsel DNA Analizi Yöntemi ile ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrar Sayılarının Doğrulanması	53
3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	54
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ	101
7. ÖZET	106
8. SUMMARY	108
9. KAYNAKLAR	110
10. EKLER	132
11. ÖZGEÇMİŞ	134

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER

	Sayfa No
Grafik 1. İnfertilite nedenleri ve çok merkezli verilere göre görülme sıklıkları.	9
Şekil 1: Preembrioların gelişim evreleri.	14
Şekil 2: İnsan Östrojen reseptör α (ÖR α) proteininin işlevsel bölgeleri.	23
Şekil 3: İnsan östrojen reseptör 1 geni intron ve ekson bölgeleri.	26
Şekil 4: İnsan östrojen reseptör 1 geni 1. intronunda yer alan PvuII (c.454-397T>C) ve XbaI (c.454-351A>G) polimorfizmlerinin yerleşimi	30
Şekil 5: ÖR-1 genine ait 1300 bç'lik bölümünü çoğaltan primerler, bölgenin genomdaki yerleşimi ve c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmleri için kullanılan restriksiyon enzimleri ve kesim yerleri	41
Şekil 6: ÖR-1 geninin kontrol bölgesinde TA dinükleotit tekrarlarını içine alan bölgeyi çoğaltan primerler ve bölgenin genomdaki yerleşimi	49
Şekil 7: Hasarsız ve hasarlı birer oosit hücresi	57
Şekil 8: Bs200ProP programı ile belirlenen hücre sınırları ve piksel yoğunluğu ve çapları ölçümleri	58
Grafik 2: Komet ölçümlerinden çap uzunluğuna göre oosit gruplarının karşılaştırılması	61

Şekil 9: c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmlerini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının jel görüntüsü	63
Şekil 10: c.454-397 T>C polimorfimi için PZT sonrası ürünlerin kesim sonuçları için elde edilen jel görüntüsü	64
Şekil 11: c.454-351 A>G polimorfimi için PZT sonrası ürünlerin kesim sonuçları için elde edilen jel görüntüsü	65
Şekil 12: ÖR-1 geni c.454-397 T>C polimorfizmi için CT ve c.454-351 A>G polimorfizmi için GA genotipine sahip bireyin dizi analizi görüntüsü.	66
Şekil 13: TA tekrar polimorfizmini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının jel görüntüsü	69
Şekil 14: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 12/12 (TA) tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.	70
Şekil 15: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 12/13 (TA) tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.	70
Şekil 16: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/13 (TA) tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.	71
Şekil 17: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/14 (TA) tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.	71
Şekil 18: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/15 (TA) tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.	71
Şekil 19: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/20 (TA) tekrar sayısına	72

sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.

Şekil 20: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/21 (TA) tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü. 72

Şekil 21: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/22 (TA) tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü. 72

Şekil 22: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/23 (TA) tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü. 73

Şekil 23: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 14/14 (TA) tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü. 73

Şekil 24: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 14/21 (TA) tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü. 73

Şekil 25: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 14/22 (TA) tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü. 74

Şekil 26: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/13 (TA) tekrar sayısına sahip sahip bireyin dizi analizi görüntüsü. 74

Şekil 27: İnfertil ve kontrol grubundaki ÖR-1 geni (TA) mikrosatellit tekrarları için allel dağılımı 75

Şekil 28: ÖR-1 geninde tanımlanan genomdaki yerleşim sıralarıyla TA, c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmleri arasındaki bağlantı yüzdeleri. 77

TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 1: Komet yöntemiyle farklı pH' larda belirlenebilen DNA hasar tipleri	17
Tablo 2: ÖR-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgenin PZT Tepkime Karışımı	42
Tablo 3 : DNA Dizi Analizi Amplifikasyon Karışımı	47
Tablo 4: PZT Ürünlerinin Uzunlukları ve Tekrar Sayıları	50
Tablo 5: ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarını İçeren Bölgenin Tepkime Karışımı	51
Tablo 6: ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarlarına Ait Fragment Analizi Karışımı	52
Tablo-7 : DNA dizi Analizi Amplifikasyon Karışımı	53
Tablo 8. Çalışma grupları için komet analizi sonuçları	59
Tablo 9: Komet ölçümlerinin matürasyon oranları ile kıyaslanması	62
Tablo 10: Komet ölçümlerinin fertilizasyon oranları ile kıyaslanması	62
Tablo 11: İnfertil kadınlarda ve kontrollerde ÖR-1 geninin c.454-397 T>C polimorfizminin genotip ve allel dağılımı	67
Tablo 12: İnfertil kadınlarda ve kontrollerde ÖR-1 geninin c.454-	69

351 A>G polimorfizminin genotip ve allel dağılımı

Tablo 13. İnfertil kadınlarda ve kontrollerde ÖR-1 geninin (TA) dinükleotit tekrarı mikrosatellit polimorfizminin dağılımı	76
Tablo 14 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmlerinin kontrol ve hasta grubundaki haplotip sıklıkları	77
Tablo 15: İnfertil grubundaki c.454-397T>C polimorfizmine ait östrojen reseptör genotiplerinin IVF parametreleri ile karşılaştırılması	79
Tablo 16: İnfertil grubundaki c.454-351A>G polimorfizmine ait östrojen reseptör genotiplerinin IVF parametreleri ile karşılaştırılması	81
Tablo 17: İnfertil grubundaki (TA) dinükleotit tekrar polimorfizmine ait ÖR genotiplerinin IVF parametreleri ile karşılaştırılması	82

SEMBOLLER KISALTMALAR

A	: Adenin
AF-1	: Aktivasyon İşlevi 1
ATP	: Adenozin trifosfat
α	: Alfa
bç	: Baz çifti
β	: Beta
C	: Sitozin
$^{\circ}\text{C}$	: Derece Santigrad
Ca	: Kalsiyum
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
cm	: Santimetre
CSF	: Sitostatik faktör
dH₂O	: Distile Su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleozidtrifosfat
E₁	: Östrone
E₂	: Östradiol
E₃	: Östriol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit

ESHRE	: Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Birliği
FSH	: Folikül stimule edici hormon
G	: Guanin
g	: Gram
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
HSA	: İnsan Serum Albümini
Hsp	: Heat Shock Protein
ICSI	: Sitoplazma içine sperm enjeksiyonu
IVF	: In vitro fertilizasyon
kb	: Kilobaz
kDa	: KiloDalton
KOH	: Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon
LH	: Luteal hormon
M	: Molar
M II	: Metafaz II
mg	: Mili gram
MgSO₄	: Magnezyum Sülfat
ml	: Mili litre
MPF	: Matürasyonu tetikleyen faktör
mRNA	: Haberci ribonükleik asit
mIU	: Mili uluslararası ünite
µm	: Mikro metre
µsn	: Mikro saniye

µl	: Mikro litre
µM	: Mikro molar
nm	: Nanometre
OMI	: Oosit olgunlaşma inhibitörü
OPU	: Oocyte Pick Up (Yumurta Toplama)
ÖR	: Östrojen reseptörü
pmol	: Pikomol
PZT	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sn	: Saniye
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
T	: Timin
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris Boric Acid (Tris Borik asit EDTA)
U	: Urasil
UV	: Ultraviole
V	: Volt
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

In vitro fertilizasyon (IVF), 1978 yılında ilk tüp bebeğin dünyaya geldiği tarihten itibaren uygulanmakta olup, bu zamana kadar çok hızlı gelişmeler gösteren ve hala gelişmekte olan uygulamalı bir bilim alanıdır. IVF laboratuvarlarının öncelikli amacı, gebelik elde etmekte güçlük çeken ya da sağlıklı çocuk sahibi olmakla ilgili risk taşıyan eşlerin sağlıklı bebek sahibi olmalarına yardımcı olmaktır. IVF'te uygulanan temel aşamalar, gamet hücrelerinden embriyo elde etmek ve bu embriyoların laboratuvar koşullarında kültür edilip gelişimlerini takip ederek anne rahmine transferi işlemlerinden oluşmaktadır. İnsan üremesinde fertilizasyon, oldukça karmaşık ve tam olarak mekanizması ortaya konulamamış bir olaydır. Tüp bebek tedavilerinde gebelik şansını arttırmak üzere fertilizasyon oranlarının yüksek olması oldukça önemlidir. IVF'te elde edilen embriyoların yalnızca 2 ya da 3 tanesi hastaya transfer edilir. Döllenen oosit ve takip edilen embriyo sayısının fazla olması, transfer için daha geniş bir havuzdan en kaliteli embriyoların seçilmesi açısından yararlıdır. Özellikle, nedeni açıklanamayan infertilite olgularında çiftlerin yaklaşık %25'inde tüp bebek uygulanmasında spermden veya oositte kaynaklanan bir fertilizasyon bozukluğu görülmektedir. Fertilizasyon bozukluğuna gamet hücrelerinde DNA hasarının neden olabileceği olasılığından yola çıkarak bugüne kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Ancak bu konu üzerinde sadece sperm DNA bütünlüğü araştırılmış ve aksi görüşlerin yanı sıra birçok çalışma, spermde DNA hasarının fertilizasyon üzerine etkisinin bulunmadığı sonucuna varmıştır. Oositte DNA hasarının fertilizasyon üzerine etkisi ise henüz araştırılmamış bir konudur.

İnfertilite olguları için tüp bebek tedavisi şüphesiz en etkin tedavi yöntemidir. Tüp bebek tedavisinde gebelik şansını belirleyen bir diğer önemli

faktör de kontrollü overyan hiperstimulasyonudur (KOH). Bu yöntemle çok sayıda folikül, folikül stimule edici hormon (FSH) verilerek olgunlaştırılır. Toplanan oosit sayısı ve oositlerin kalitesi bu noktada belirgin rol oynamaktadır.

Yardımcı üreme tekniklerinde, östrojen reseptör polimorfizmlerinin gelişen folikül sayısı, oosit kalitesi ve olgunlaşması, fertilizasyon ve gebelik oranlarına etkisi incelenmiştir. Bu incelemeler, östrojen reseptör geninin ilgili bölgelerinde yer alan polimorfizmlerin, ovaryumların uyarılması sonucu foliküllerin kalitesine ve dolayısıyla implantasyona etkili olabileceğine dikkat çekmektedir. Diğer taraftan östrojen hormonunun işlevinin oosit sitoplazmasının ve oolemmının olgunlaşması için gerekli olduğu ve östrojen reseptör polimorfizmlerinin oosit olgunlaşmasına etkisi olduğu belirlenmiştir. Olgun oositlerde fertilizasyon oranının yüksek olduğu ve östrojenden yoksun foliküllerde düşük kalitede oositler elde edilmesi gibi bulgular da literatürde yer almaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı; daha çok lenfosit ve sperm hücreleri gibi süspansiyon numunelerde rahatlıkla sonuç veren ancak tek hücre incelemelerinde uygulama zorlukları olan komet tekniğini oositlerde DNA fragmentasyonu ve hasarını belirlemede kullanmaktır. Bu sayede tüp bebek tedavisinde en sık kullanılan ve “mekanik” bir işlem olan mikroenjeksiyonun ve yanı sıra füzyon, klonlama ve kök hücre çalışmalarının temelini oluşturan piezo elektrik tekniğinin oosit hücrelerinde yarattığı olası DNA hasarını belirlemektir. Diğer taraftan oositte DNA hasarının IVF tekniklerinde oositlerin olgunlaşması ve fertilizasyonu üzerine etkileri sorgulanacaktır. Çalışmamızın ikinci bölümünde östrojen reseptör geni polimorfizmlerinin tüp bebek parametreleri üzerinde etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır. Bu polimorfizmler ile IVF parametreleri

arasında bir ilişkinin belirtilmesi durumunda, ileride kadınların infertil olma olasılıkları ve riskleri hesaplanabilecek ve bu polimorfizmleri taşıyan infertil kadınların tüp bebek tedavilerinde elde edilebilecek klinik parametreler öngörülerek, genotiplere uygun farklı tedavi protokolleri uygulanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan oosit hücresi

Oosit hücresi insan organizmasının en büyük hücresi olup olgun oositinin çapı 110-115 µm dolayındadır. Oolemma adı verilen plazma zarı ile çevrilidir. Oosit-oolemma 'yı çevreleyen glikoprotein zarfa zona pelusida adı verilir. Zona pelusida 15-20 µm kalınlığında olup oositi transport ve fertilizasyon sırasında korur. Oolemma ve zona pelusida arasında sıvı ile dolu perivitellin boşluk yer alır. Oosit sitoplazmasının (ooplazma) ana organelleri arasında mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi sistemi yer alır. Ovulasyon öncesi oositin kendisini çevreleyen perivitellin boşluk ve zona pelusida ile birlikte çapı 150 µm' yi geçmektedir ¹.

Oositler mayozun Metafaz II (MII) aşamasında gelişimlerini durdurarak fertilizasyona elverişli hale gelirler. Çekirdek olgunlaşması ise oositin genel olgunlaşması ile bağlantılı olup ooplazmada organellerin dağılık olarak yerleşiminin artması ile karakterizedir. Birinci kutup cisimciğın oluşumu oositin bu aşamaya ulaştığının belirtisidir ².

2.1.1.Oogeneze

Primordial üreme hücreleri, genetik olarak dişi olan gonada ulaştıklarında oogonyumlara farklırlar. Oogonyumlar peşpeşe mitoz bölünme geçirirler. Oogonyumların çoğunluğu mitozla bölünmeyi sürdürürken bir bölümü mayoz bölünmenin profaz aşamasında bölünmesini durdurarak primer oositlere farklırlar. Primer oosite çevresindeki yassı epitel hücreler ile birlikte primordial folikül adı verilir. Primer oositler doğuma yakın dönemde birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde olurlar ve puberteye kadar bu

aşamada kalırlar. Bu süreçte oositin olgunlaşmasını engelleyen bir madde oosit olgunlaşma inhibitörü (OMI, oocyte maturation inhibitor) tarafından baskılanır. Puberteye ulaşıldığında dişi gonad artık primordial foliküllerden beslenen bir folikül havuzuna sahiptir ve bu dönemden sonra her overyan döngüde bu havuzun içinden seçilen 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordial folikül 3 aşamadan geçerek olgunlaşmaya başlayacaktır. Bu aşamalar 1) primer (preantral) 2) sekonder (antral) 3) preovulatuvar evredir^{3,4}.

Diploten evresinde istirahat halinde olan primer oosit büyümeye başladığında, oositi çevreleyen yassı epitel hücrelerinin önce kübikleşip sonra çoğalması ile çok sıralı bir epitel tabaka oluşur. Bu hücrelere granüloza hücreleri adı verilmektedir. Granüloza hücreleri ve oosit tarafından salgılanan glikoprotein yapısındaki bir madde oositin çevresindeki zona pellusida tabakasını oluşturur. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri bozulmadan kalarak kümulus ooforusu oluştururlar^{3,4}.

Her overyan döngüde bir grup folikül gelişmeye başlasa da bunlardan ancak bir tanesi tam anlamıyla olgunlaşır. Diğerleri dejenere olur. Luteal hormonun (LH) etkisi ile preovulatuvar evreye girilir ve birinci mayoz bölünme tamamlanır. Bunun sonucunda büyüklükleri birbirinden farklı ancak her biri 23 çift yapıllı kromozom içeren iki yavru hücre oluşturur. Bu hücrelerden biri sitoplazmanın tümüne yakınına alarak sekonder oosit, diğeri ise hemen hiç sitoplazma içermeyen birinci kutup cisimciği haline gelir. Kutup cisimciği oositin plazma zarı ve zona pellusida arasındaki perivitellin boşlukta yer alır. Sekonder oosit bundan sonra II. mayoz bölünmeye girer ancak ovulasyondan birkaç saat öncesinde metafaz aşamasında duraklar. İkinci mayoz bölünme ancak oosit sperm ile döllendikten sonra devam eder. Eğer

fertilizasyon gerçekleşmez ise oosit ovulasyondan yaklaşık 24 saat sonra dejenere olur ^{3,4}.

2.1.2.Oosit olgunlaşması

Oosit olgunlaşması; mayotik olgunlaşma, sitoplazma olgunlaşması ve moleküler olgunlaşma olmak üzere üç başlıkta incelenebilir.

Mayotik olgunlaşma, LH yükselmesi veya oositin foliküler ortamından salınması sonucu tetiklenen çekirdek olayların bir sonucudur. Bu süreçte siklin B1 ve P32cdc2 'den oluşan bir kompleks olan olgunlaşmayı tetikleyen faktör (MPF) sentezlenir ya da aktive olur. Hücre döngüsü mekanizmasının aktivasyonu ile birlikte oosit birinci metafaz aşamasına girer ve birinci kutup cisimciği oluşur. İkinci metafaz aşamasında sitostatik faktörün (CSF) etkisi ile döngü durdurulur ⁵.

Sitoplazmik olgunlaşma, oositlerin ovulasyon sinyalini bekledikleri ve LH yükselmesinden önceki birkaç gün içerisinde mikroskop ile ayrıntılı yapısal inceleme sonucunda tanımlanmaktadır. Bu süreçte ilk basamak RNA ve protein sentezinin yer aldığı hazırlık aşamasından çıkması, transkripsiyon ve translasyon mekanizmasının değişmesi ile çekirdekçik olgunlaşması ve ribozom artışının gerçekleşmesidir ⁶. LH salınımına yakın bir zamanda ikinci seri değişimler gerçekleşir. Hücre metafaz aşamasına ilerledikçe mitokondri ve kortikal granül gibi organeller yeniden dağılım gösterir ⁷. Sitoplazmik olgunlaşmanın en önemli diğer aşaması ise fertilizasyon sonrası olaylar için oositi hazırlayan tanımlanamayan bazı özgül moleküllerin toplanmasıdır. Oosit kapasitasyonu olarak nitelendirilen bu olay şimdilerde moleküler olgunlaşma olarak adlandırılmaktadır⁸.

Moleküler olgunlaşma oosit olgunlaşma tiplerinin arasında en zor tanımlanandır. Gelişen oositlerin çoğunluğu normal mayotik ve sitoplazmik olgunlaşmayı tamamlarken içlerinden sadece çok az bir kısmı blastokist aşamasına kadar gelişebilmektedir⁹. Oositin gelişimsel kapasitesinin temelde foliküllerin farklılaşma evresi ile ilişkili olabileceği, oositin gelişimsel kapasitesinin mikroskop altında her zaman fark edilemeyeceği ve özgül mRNA ve bazı proteinlerin sentezlenip ovulasyondan kısa süre önce oosit içindeki stoklara eklendiği düşünülmektedir⁵.

2.2. İnsan in vitro Fertilizasyon Uygulamalarının Tarihçesi

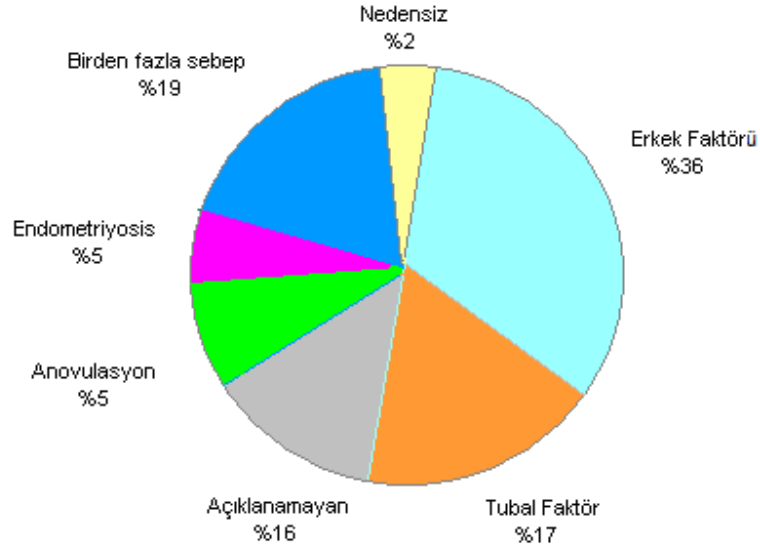
IVF, oositlerin ovaryumlardan aspire edildikten sonra sperm hücreleri ile laboratuvar ortamında birleştirilmesi sonucu oluşan embriyoların uterusu transferi işlemlerini içeren üremeye yardımcı bir yöntemdir¹⁰. İlk tüp bebeğin dünyaya gelişinden yirmi yıl önce Ruth Fowler ve Robert Edwards'ın olgun dişi farelerin süperovulasyonu üzerine olan çalışmaları ile insan IVF'ine yolculuk başlamıştır. Daha sonra Robert Edwards 1965 yıllarında *in vitro* da insan oosit olgunlaşma aşamalarını tanımlayan makaleyi yayınlamıştır¹¹. Bu yıllarda Edwards, John Paul ve Robin Cole ile birlikte *in vitro* olarak farklılaşabilen veya ölümsüz kök hücre dizilerini oluşturabilen ilk embriyonik kök hücreleri dünyaya tanıtmışlardır¹². Yine Edwards, Richard Gardner ile birlikte tavşanlarda preimplantasyon genetik tanıyı, blastokist enjeksiyonuyla elde edilmiş kimerik fareleri ve Barry Bavister ile *in vitro* olgunlaşma sağlanmış insan oositlerinde ilk fertilizasyonu göstermişlerdir¹³. Bu çalışmalar, insan IVF'i başta olmak üzere embriyo tanısıyla ilgili diğer modern dallar ve insan embriyonik kök hücrelerinin potansiyel kullanımını hedefleyen öncü çalışmalar olmuş ve yardımcı üreme tekniklerinde çığır açmıştır.

Robert Edwards'ın 1968 yılında Dr. Patrick Steptoe'nin fallopian ampulla laparoskopisi uygulamaları ile ilgili Lancet'te yer alan bir makalesini okuyup kendisiyle irtibata geçmesi, insan in vitro fertilizasyonu ile ilgili çalışmalarını oldukça hızlandırmıştır ¹⁴. Edwards ve Steptoe'nin işbirliği içinde çalışması dahilinde ilk uygulamalarını Lesley ve John Brown çifti üzerinde gerçekleştirmişlerdir ve Steptoe öncelikle Lesley'den oositlerini laparoskopik yöntemle almıştır. Edwards oositleri laboratuvar ortamında eşinin spermi ile dölleyerek embriyo elde etmiş ve bu embriyoları 64 hücre civarında (yaklaşık dört veya beşinci günde) uterusu yerleştirerek gebelik elde etmiştir. 25 Temmuz 1978 ilk tüp bebek Louise Joy Brown'ın doğum günü olup insan IVF tarihinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir ¹⁵.

2.3. IVF Yöntemine Genel Bakış ve Uygulanan Yardımcı Teknikler

İlk tüp bebeğin doğumunun ardından geçen 30 yıl içerisinde IVF'te çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir. İlk başta tubal faktörün üstesinden gelmek için dizayn edilen IVF şimdilerde açıklanamayan infertilite, erkek infertilitesi, endometriyozis, overyan yetmezlik gibi problemlerin çözümünde de kullanılır hale gelmiştir ^{16,17}.

Dünyanın önde gelen bazı IVF merkezlerinin sonuçları değerlendirilerek elde edilen genel IVF endikasyonları ve görülme oranları Grafik 1'de gösterilmiştir ¹⁸.



Grafik 1: İnfertilite nedenleri ve çok merkezli verilere göre görülme sıklıkları.

2.3.1. İnfertilite (kısırlık)

Çiftlerin çocuk sahibi olmayı istemelerine ve düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen en az bir yıl süreyle gebelik elde edememeleri olarak tanımlanır. Bu durumda infertilite nedeni ortaya koyulmalı ve probleme dayalı tedavi uygulanmalıdır. Yukarıda belirtilen nedenlerin çözümü IVF tedavisi olup bu bölümde genel anlamda IVF tedavisinin aşamaları ve kullanılan teknikler açıklanacaktır.

2.3.2. Ovulasyon İndüksiyonu ve Oosit Toplama

IVF'te amaç; ovaryumlardan olabildiğince çok sayıda ve iyi kalitede oosit elde etmektir. Bunun için tedaviye alınan kadının yaş, kilo ve hormon düzeylerine bağlı olarak ovulasyon indüksiyonu protokolü düzenlenir. Kontrollü overyan hiperstimulasyonu denilen bu uygulama sırasında

kullanılan ilaçların dozunun ayarlanması hem yeterli ve iyi kalitede oosit elde etmek hem de kişiye sistemik bir zarar vermemek açısından çok önemlidir. Bu nedenle takip sırasında ultrason sonuçları ve hormonların artış durumuna göre ilaçların dozu değiştirilip ayarlanmaktadır.

Bu tedavi sırasında; doğum kontrol hapları, GnRH analogları (Lucrin/Decapeptyl) enjeksiyonları, gonadotropin (Follegon/ Puregon/ Menagon/ Gonal-F) enjeksiyonları uygulanmakta ve seri olarak hormon ve rahim içi ultrason tetkikleri yapılmaktadır. Bazen tedaviye kortizon ve metformin gibi ilaçlar da eklenebilmektedir. Uygun ultrason sonuçları ve hormon şartları elde edildiğinde hCG (Pregnyl/ Profasi) enjeksiyonu yapıp 35,5-39 saat sonra oosit toplama (OPU = oocyte pick up) işlemi yapılmaktadır
19, 20, 21

2.3.3. Oosit Toplama

Oosit toplama işlemi transvajinal ultrason eşliğinde yapılır. Bu işlem için vajina arka duvarından ovaryumların içine doğru bir iğne sokularak ultrason eşliğinde foliküldeki sıvı, oositleri elde etmek için bir test tüpüne aspire edilir. Stereo mikroskop altında oositler follikül sıvılarından ayıklanarak toplanır ve uygun koşullarda (37°C, %5-6 CO₂) iki saat süre ile inkübe edilir

13

2.3.4. Sperm Hazırlama

Semendeki sperm konsantrasyonu, hareketlilik oranı ve morfolojisine bağlı olarak sperm gradiyent ya da swim up tekniklerinden biriyle hazırlanmaktadır. Gradyent yöntemi temel olarak yoğunluk farklılığı esasına dayanmaktadır. Normal morfolojiye sahip olan sperm hücresi semen

içerisinde yoğunluğu en yüksek olandır. Sperm hücresinin kromozomları son derece kondanse bir yapı gösterdiğinden normal morfolojili ve olgun sperm hücrelerinin yoğunluğu daha yüksek olacaktır. Bir semende düşük hareketliliğin, lökosperrinin ve artık sperm hücrelerinin ayrıca antisperm antikolların olması gradiyent yönteminin kullanılmasını gerekli kılar. Sperm sayısı 20 milyon, hareketlilik oranının %50 ve progresif hareketli sperm oranının %30'un altında olması gradiyent yönteminin tercih edilmesinin nedenidir. Daha iyi parametrelere sahip semen örnekleri için swim up tekniği uygulanabilmektedir. Bu teknikte, doğrudan konsantre edilen semende sperm hücrelerinin uygun bir solusyona doğru yüzüp oradan toplanmaları ile kaliteli sperm hücreleri elde edilebilmektedir ^{13, 22}.

2.3.5. Mikroenjeksiyon

Mikroenjeksiyon ya da Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) ilk olarak 1992 yılında Belçika'da Brussel Free University'de Palermo ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. ICSI laboratuvar koşullarında iyi hareketli ve kaliteli tek bir spermin seçilerek bir oositin içine enjekte edilmesi temeline dayanır. ICSI uygulaması yapılacak oosit birinci polar cisimciğini atmış yani metafaz II aşamasında olmalıdır. ICSI yapılacak oositler bu işlemde önce hyaluronidaz enzimi aracılığıyla kümülüs hücrelerinden arındırılır. Bu sayede hem oositin manipulasyonu kolaylaştırılır hem de polar cisimciğin atılıp atılmadığı net bir şekilde gözlenebilmiş olur²². Erkek kaynaklı infertilite tedavisi ve önceki tüp bebek denemelerinde fertilizasyon başarısızlığı ile karşılaşan çiftler için ICSI yöntemi dünyadaki en başarılı yardımcı üreme tekniği ve tedavisidir.

Her yeni teknikte olduğu gibi tüp bebek ve özellikle mikroenjeksiyon için teorik bazı risklerin olduğu yöntemin ilk uygulanmaya

başladığı andan itibaren tartışılmaya başlanmış ve aradan geçen 15 yıla karşın halen tartışılmaktadır. Özellikle mikroenjeksiyonun yeterli hayvan deneyi olmadan insan üzerinde uygulanması bu konudaki tartışmaların daha yoğun olmasına neden olmuştur. 1992 yılından beri uygulanan mikroenjeksiyon işlemi sonucunda oluşan gebeliklerde bazı teorik risklere rastlandığı açıklanmıştır ²³.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda mikroenjeksiyon işleminin riskleri ile ilgili olarak mikroenjeksiyon uygulaması sonrası doğan bebeklerin doğum kilosunun daha az olduğu, konjenital malformasyonlarda hafif bir artış görüldüğü ancak nörolojik gelişimde önemli bir farklılık bulunmadığı rapor edilmiştir ^{24,25}.

Çocukların doğum sonrası gelişimleri konusunda birçok yayın bulunmasına karşın bu konuda kesin bir yargıya varmak için henüz erken olduğu ve zamana gereksinim olduğu belirtilmektedir ²⁶.

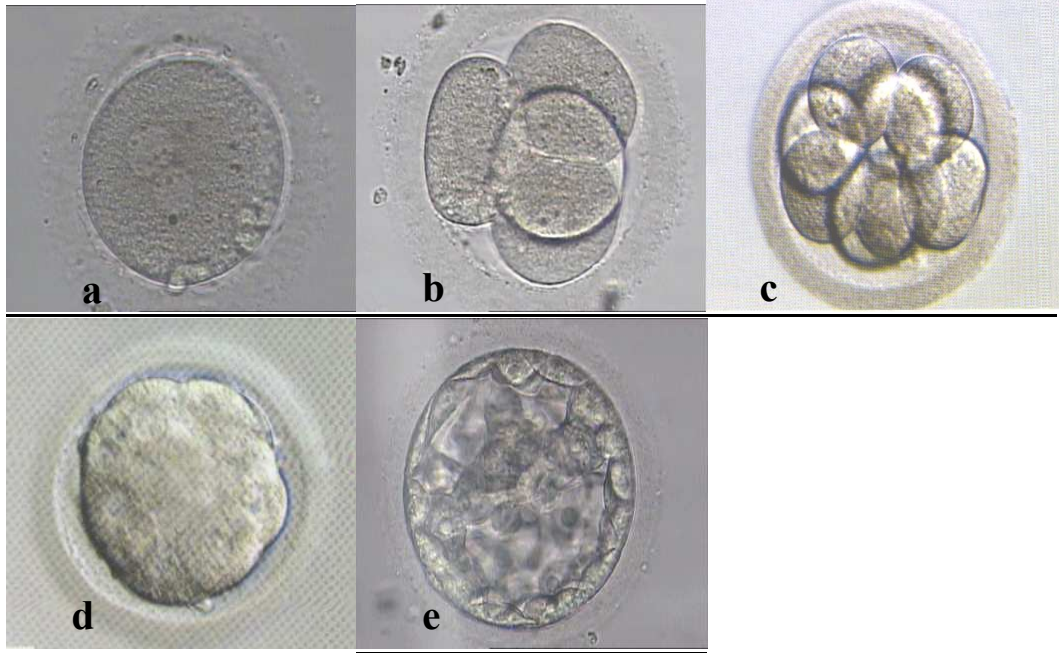
2.3.6. Piezo Elektrik Yöntemi ile Oosit Aktivasyonu

Piezo elektrik yöntemi, çok çeşitli füzyon uygulamalarında, hücre çekirdek aktarımı ve klonlama çalışmalarında ve kök hücre deneylerinde kullanılan etkin bir tekniktir. Önceki tüp bebek denemelerinde hiç fertilizasyon elde edilemeyen olgularda, mikroenjeksiyon işleminden 30 dk sonra oositlere piezo elektrik verilmesi ile fertilizasyon elde edilmektedir. Bu işlemde oositler “mikrotabak” adı verilen cam kaplar içerisinde 0.5mm aralıklarla paralel iki elektrod arasında özel hazırlanmış tampon çözelti (0.3M Mannitol, 0.1mM MgSO₄, 0.2mM CaCl₂, 0.05mg/ml HSA, 0.05mM Hepes) içerisine konulur ve “Elektro Hücre Manipulatör” cihazı ile hücrelere belirli düzeyde akım (10µsn, 1.5kV/cm) verilir. Elektrik akımı, bu tip hücrelerde

sitoplazmada Ca^{+2} oskilasyonunu arttırarak oositin aktivasyonunu uyarıp fertilizasyonu kolaylaştırmaktadır²⁷. Piezo elektrik, pratikte oldukça başarılı bir teknik olmasına rağmen literatürde teorik olarak başarısı kanıtlanmamıştır. Uygulamadan sonra oositlerde dejenerasyon olmaması, düzenli embriyo gelişiminin olması ve sağlıklı gebelik ve doğumlar elde edilmesi bu yöntemin güvenilirliğini işaret etse de oosit hücrelerinde DNA hasarına neden olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

2.3.7. Embriyo Kültürü

Embriyo kültürünün ilk aşaması fertilizasyon kontrolü olup bu değerlendirme ICSI işleminden 12-18 saat sonrasında yapılır ve bu gün embriyo kültüründe 1. gün olarak adlandırılır. Bu evrede incelenen oositler ya normal olarak fertilize olmakta veya fertilizasyon yokluğu ya da anormal fertilizasyon göstermektedirler. Kesin olarak ayrı iki pronükleusun varlığı normal fertilizasyonu gösterir (Şekil 1.a). Embriyonun bölünmeye başladığı gün 2. gün olarak adlandırılır ve bu evrede embriyolar 2-4 blastomerli evrededir (Şekil 1.b). Embriyo kültürünün 3. gününde 6-8 blastomerli olan embriyo (Şekil 1.c) 4. günde morula - kompaktlaşma (Şekil 1.d) evresinde olmaktadır. Kültürün 5. gününde blastokist evresindeki (Şekil 2.2.e) embriyolar gelişmektedir.



Şekil 1: Preembriyoların gelişim evreleri. a) pronükleer aşama b) 4 blastomerli evre c) 8 blastomerli evre d) kompakt evre e) blastokist evresi.

2.3.8. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi ve Embriyo Transferi

İnsan fetusunun erken kaybı oldukça yaygın bir olaydır. Doğal tekiz fetusların yaklaşık %73'ü 6. haftaya ulaşmadan kayba uğramakta ve kalanların %90'ı doğumla sonuçlanmaktadır²⁸. Genellikle gelişen embriyolardan 2-3 tanesi morfolojik özellikler göz önünde bulundurularak seçilip transfer edilir. Ancak seçilen embriyoların implantasyon potansiyelinin olup olmadığı sadece morfolojik değerlendirme ile anlaşılamayabilir. Öncelikle genetik sağlamlık, implantasyonun gerçekleşmesi ve sağlıklı çocuk sahibi olmada kesin bir gerekliliktir. Pek çok düşük kalite embriyo, normal ve sağlıklı fetuslar geliştirse de fragmentli ve gelişimi durmuş (arrest) embriyolarda sayısal ve kromozomal anomalilerin daha sık olduğu görülmektedir²⁹. Bu durum, morfolojik sınıflandırma sisteminin transfer için en iyi embriyoyu

seçmede faydalı olduğunu ancak gelişimsel olarak normal olan embriyoların seçiminde sınırlamalar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle transfer edilecek embriyonun seçimi en azından şimdiki koşullarda bazı küçük testlerle yapılmaya çalışılmaktadır.

Pek çok genetik bozukluğu olan embriyonun gelişimi erken dönemde durmaktadır. Pronükleer gelişimin ardından genetik bozukluğu olan embriyoların hızlı kaybı, sekiz hücre aşamasındaki embriyonun transfer için seçimini uygun kılmaktadır³⁰. Değişik morfolojik kalitelerdeki preembriyolar sitogenetik açıdan incelendiğinde araştırmacılar, pronükleer aşamadaki anomali oranını %65, 2-4 hücre aşamasında %55 ve 5-8 hücre aşamasında ise %27 olarak saptanmıştır.

Oositlerin gelişimi sırasında kaderinin önceden belirlenebilmesi transfer için en iyi embriyoların seçimine yardımcı olabilir ancak ekstrasitoplazmik ve intrasitoplazmik morfolojilerine bakılarak yapılan bu non-invasive seçimin belirleyiciliği çok zayıftır. Son dönemde foliküler vaskülarizasyonun oositin gelişimsel kaderini öngörmeye belirleyici olduğu öne sürülmektedir³¹.

2.4. Tek hücrede DNA Hasarını Belirleme: Komet Tekniği

Tek hücre elektroforezi olarak da bilinen komet tekniği, oldukça hızlı ve hassas bir floresan mikroskop yöntemi olup tek hücre düzeyinde DNA hasar ve onarımının belirlenmesinde kullanılır³². Bu teknik, yaşlanma ve klinik araştırmalardan genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyoloji gibi toksikolojinin pek çok alanında önemli uygulama alanlarına sahiptir³³. DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi için Östling ve Johanson tarafından 1984 yılında izole edilmiş hücrelerde DNA hasarını ölçmek için Mikrojel Elektroforez

Tekniği adı altında bir teknik geliştirilmiştir³⁴. Bu teknikte hücreler mikroskop lamında agara gömdürüldükten sonra deterjan ve tuz ile lizise uğratılmış ve DNA, nötral şartlarda elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi düşük elektrik akımında (5 V/cm) 5 dk süreyle yapılmış ve lamalar akrinin oranj ile boyanmıştır. Elektrik akımı sonucunda hasarlı DNA çekirdekten anoda doğru sürüklenmiş ve baş ve kuyruğu ile bir kuyruklu yıldız (Komet) görüntüsünün oluşmasına neden olmuştur. Ostling ve Johanson'ın geliştirdikleri teknikte kullanılan lizis şartları nötral pH' da olduğu için DNA baz çiftleri ayrılmadığından sadece çift DNA sarmal kırıklarının belirlenmesi mümkündür. Teknik daha sonra Singh ve arkadaşları tarafından lizis işlemi bazik koşullarda yapılarak değiştirilmiş ve sadece sarmal kırıklarının değil bazik koşullarda belirlenebilen hasarların, DNA çapraz bağlarının ve tamamlanmamış kesip-çıkarma onarımının gerçekleştiği bölgelerin belirlenmesine de olanak sağlamıştır³⁵. Singh ve arkadaşlarının geliştirdikleri bu yöntem, şu anda bazı basamaklarda yapılan değişikliklerle beraber en çok kullanılan yöntemdir. Tablo- 1' de komet yöntemiyle farklı pH' larda belirlenebilen DNA hasar tipleri gösterilmektedir.

DNA sarmal kırıklarını ölçmeye yarayan yöntemler, genellikle sarmal kırığına neden olan ajanların DNA molekülünün büyüklüğünü azaltması ilkesine dayanır. DNA tek ve çift sarmal kırıkları, kromatin yapısında değişikliklere neden olabilir. DNA tek sarmal kırığını ölçen tekniklerde DNA çift sarmalının açılması gereklidir. Denatürasyon, çift sarmalın çözülmesi ve tek sarmal kırıklarının yanında sadece bazik ortamda oluşan kırıkların belirlenmesi için de yüksek pH' dan yararlanılmaktadır³⁶.

Tablo 1: Komet yöntemiyle farklı pH' larda belirlenebilen DNA hasar tipleri

pH: 7-8	pH: 10-12	pH>12
Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları
Çapraz bağlar	Tek sarmal kırıkları	Tek sarmal kırıkları
	Kesip-çıkarma onarım bölgeleri	Kesip-çıkarma onarım bölgeleri
	Çapraz bağlar	Çapraz bağlar
		Bazik ortamda açığa çıkan hasarlar

Komet tekniğinde ilk aşamada deterjan ve yüksek tuz konsantrasyonları ile hücrelerin zarları patlatılır, protein bağları çözülür ve DNA açığa çıkarılır. Böylece DNA'nın negatif yüklü kırık uçları hasarlı DNA elektroforez sırasında pozitif yüklü uca yani anoda doğru göç ederler. Bunun sonucunda da kuyruklu yıldız görünümü (Komet) oluşur. Hasarsız DNA' ya sahip hücreler değişmeden kalır. Elektroforez işlemi, düşük elektrik akımında (5V/cm) 5 dk süreyle yapılır ve lamalar akridin oranj ile boyanır. Floresan boyama sonucunda hasarlı, az hasarlı ve hasarsız DNA'ya sahip hücreler, baş bölgesinde hare ile floresan boyanmanın çapına göre değerlendirilir. DNA göçü hem DNA'nın büyüklüğüne hem de DNA'daki kırık sayısına bağlıdır. Kuyruk uzunluğu hasara bağlı olarak artar ancak elektroforez şartlarına bağlı olarak en yüksek düzeye ulaşır. Düşük hasar düzeylerinde DNA'da göçten çok yayılma görülürken, kırık sayısının artmasıyla DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı hücrelerde (apoptotik) baş ve kuyruk tamamen ayrılmıştır³⁷.

Kuyruktaki floresan şiddetinin hücrenin baş tarafına göre karşılaştırılmasıyla sarmal kırıkların sayısı hakkında bilgi edinilebilir³⁸.

Hasarsız hücrelerde çekirdek parlaktır ve floresan şiddeti baş tarafta yoğunudur, ancak DNA'da kırıklar söz konusu olduğunda floresan çekirdekten anoda doğru yayılarak kuyrukta şiddetlenir. Komet tekniği, hasarlı hücrelerde floresanın baş taraftan kuyruğa geçişini yansıttığından DNA hasarının kantitatif olarak belirlenmesinde kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu önemli parametrelerdir ³⁹.

2.4.1. Komet Tekniğinin Kullanım Alanları

1988 yılında bazik komet tekniğinin ilk defa uygulanmasından bu yana DNA hasarı (tek ve çift zincir kırıkları, oksidatif DNA baz hasarları, DNA-DNA / DNA-protein / DNA-ilaç bağlantılarında) ve ökaryotik hücrelerdeki DNA onarımının belirlenmesinde pek çok alanda başarı ile uygulanmaktadır⁴⁰. Şimdilerde komet tekniği, duyarlılığı ve DNA hasarını tek hücre düzeyinde ölçmeye olanak sağlaması nedeniyle genotoksisite testlerinde, insan biyomonitorizasyonu, ekogenotoksikoloji ve moleküler epidemiyolojide kullanılan temel ve standart tekniklerden biridir. Bu teknik; basit, hızlı, hassas, ekonomik ve çok yönlü olması nedeniyle tercih edilerek kullanılmaktadır^{41,42}. Komet tekniği, aynı zamanda DNA onarımının belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Bu amaçla Gedik C.M. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hücreler önce DNA hasarı oluşturan kimyasalla muamele edilmiş daha sonra da onarım basamağını baskılayarak onarım kapasitesi hakkında bilgi edinilmiştir⁴³.

Komet tekniği, bazı patolojik şartların veya kimyasallara terapötik olarak maruziyet sonucunda oluşan sonuçların araştırılması amacıyla pek çok klinik çalışmada uygulanmıştır. Bunun sonucunda kötü beslenme, parazitik enfeksiyon, diyabet, mesane kanseri, düşük gibi etkenlerin anlamlı olarak DNA hasarını arttırdığı bulunmuştur ^{44,45,46}. Ayrıca radyoterapi

ve/veya kemoterapi alan hastalarda, anestezi ilaçlarının etkisinde kalanlarda, siklofosfamid ve sisplatin alan meme kanseri hastalarında Komet tekniği ile anlamlı olarak artmış DNA hasarı belirlenmiştir ⁴⁷.

2.4.2. Komet Tekniğinin Uygulanabildiği Hücreler

DNA hasarının indüklendiği çalışmalar, komet yöntemi ile çeşitli hücre tiplerinde ve hedef organlarından alınan hücrelerde yapılabilmektedir. Komet tekniğiyle yapılan klinik çalışmalar sadece somatik hücrelerle sınırlı kalmamış, kısır olan ve olmayan erkeklerin spermalarında DNA hasarı araştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır^{38,48}. Komet tekniği daha çok süspansiyon halindeki, sayıları milyonlara varan hücrelere (örneğin sperm ya da lenfosit süspansiyonu gibi) uygulanan bir yöntemdir.

Özellikle nedeni açıklanamayan infertilite olgularında çiftlerin yaklaşık %25'inde tüp bebek uygulanmasında spermden veya oositte kaynaklanan bir fertilizasyon bozukluğu görülmektedir ⁴⁹. Bugüne kadar bu konu üzerinde sadece sperm DNA bütünlüğü araştırılmış ve aksi görüşlerin^{50,51,52} yanı sıra birçok çalışma spermden DNA hasarının fertilizasyon üzerine etkisinin bulunmadığı sonucuna varmıştır^{33,53,54,55}. Oositte DNA hasarının fertilizasyon üzerine etkisi ise henüz araştırılmamış bir konudur. Ancak kümulus hücrelerinde DNA hasarının belirlenmesi ile bu konu irdelenmiştir ^{56,57}.

Komet tekniğinin oositlerde uygulanabilmesi için tek bir hücrenin jel içerisinde DNA'sının yürütülüp mikroskopta gözlenebilmesi oldukça güçtür. Bu sebeple literatürde komet tekniği ile çalışılmamıştır. Ancak 2001 yılında Chan ve arkadaşlarının dondurulmuş çözölmüş hamster oositlerin yine aynı yıl Jebelli ve arkadaşlarının yardımcı üreme tedavileri sonucu gebe kalan ve

kalamayan hastaların serumunda bekletilen hamster oositlerinde, komet benzeri bir yöntem geliştirerek DNA hasarını belirlemeleri, literatürde bu konuda yer alan çalışmalardır^{58,59}. Oosit komet tekniği olarak nitelendirdikleri bu teknikte oosit, elektroforezde yürütölme öncesi fikse edilmekte ve işaretlenen bu bölgede oositin yeri floresan mikroskop altında belirlenebilmektedir⁵⁹.

2.5. Kadınlarda Östrojen Hormonunun İşlevi

Östrojen, ovaryumlardan salgılanan iki önemli cinsiyet steroid hormonlarından biridir. Östrojenler hem erkeklerde hem de kadınlarda bulunmakla beraber, üreme yaşındaki kadınlarda düzeyleri çok daha yüksektir. Embriyonik ve fetal gelişimde önemli bir role sahip olan östrojen hormonu, kadınların sekonder seksüel karakterizasyonu, üreme döngüsü, fertilite ve gebeliğin devamlılığı üzerine etkileri vardır. Bunun yanı sıra endometrial hücre büyümesinde ve farklılaşmasında düzenleyici göreve sahiptir⁶⁰. Doğal olarak oluşan östrojenler, kolesterolden türeyen C₁₈ steroidlerdir ve bunlar 17 β -östradiol (E₂), östrone (E₁), and östriol (E₃) olmak üzere üç tiptir⁶¹. Kadınlarda bulunan bu hormonlar arasında östradiol en baskın olanıdır. Menarş ile menopoz arasında başlıca östrojen östradioldür. Östron, östradioldan daha zayıf etkili olup menopoz sonrası kadınlarda östradiol ile karşılaştırıldığında daha yüksek düzeylerde bulunur. Östrojen hormonunun temel kaynakları ovaryumlar ve plasentadır. Foliküllerin oluşumu ve oositlerin olgunlaşması LH, FSH ve östrojenin karşılıklı etkileşiminin gerekli olduğu karmaşık olaylardır⁶².

Vücutta bunlar enzim reaksiyonları sonucu androjenlerden sentezlenir. Östradiol testosterondan, östron da androstenedion'dan sentezlenir.

2.5.1. Östrojen Üretimi

Östrojenler esas olarak ovaryum ve testislerde sentezlenirler ancak, periferel dokularda androjenlerin aromatzasyonu ile de sentezlenmektedirler^{63,64}. Kadınlarda östrojen hormonu, temel olarak ovaryumlarda gelişen foliküller, korpus luteum ve plasenta tarafından üretilir. FSH ve LH, yumurtlayan kadınlarda ovaryumlarda östrojen üretimini düzenlerler. Bazı östrojenler aynı zamanda düşük düzeylerde karaciğer, adrenal bezler ve memede sentezlenirler. Östrojenin bu ikincil kaynakları özellikle post menapozal kadınlar için önemlidir.

Östrojenin sentezi ovaryumlarda teka interna hücrelerinde kolesterolden androstenedonun senteziyle başlar. Bu bileşik, bazal membrandan çevredeki granuloza hücrelerine geçerek burada doğrudan veya testosteron üzerinden östron veya östradiol e çevrilir. Testosterondan östradiol e ve androstenediondan östron a dönüşümü aromataz enzimi sağlar. Östradiol düzeyleri menstrual döngü boyunca farklılık göstermekte olup ovulasyon öncesi oldukça yüksek seyreder⁶⁵.

2.5.2. Östrojenlerin Etki Mekanizması

Hormonların hedef hücrelerine ulaştıklarında etkilerini gösterebilmesi için özgül reseptörlerine bağlanması gerekir. Hormonlar ya membran reseptörleri ile ya da çekirdek reseptörlerine bağlanarak biyolojik aktivitelerini gösterirler. Östrojenler etkilerini ligand ile aktive olan ve östrojen reseptörü (ÖR) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleri aracılığı ile göstermektedir^{63,66}. Östrojen reseptörleri ayrıca hücre içi ikincil habercilerin ve zarla ilişkili olan sinyal komplekslerinin aktivitesine de aracılık etmektedir^{63,67}.

Östrojen reseptörleri hücre içi reseptörlerin çekirdek hormon ailesinin bir üyesi olup 17β - östradiol hormonu ile aktive edilirler⁶⁵. Östrojen, çekirdek reseptör proteine bağlanarak doku ve organa özgül fizyolojik cevapları tetikler. Çekirdek reseptörleri, hormona bağlanma, transkripsiyonda görev alan DNA'ya bağlanma ve diğer protein faktörleri ile etkileşen düzenleyici bölgelerden oluşur⁶⁸.

Östrojen reseptörünün alfa ($\text{ÖR}\alpha$) ve Östrojen reseptörü beta ($\text{ÖR}\beta$) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. İki reseptör proteininin de DNA bağlanma bölgesi oldukça benzer olmasına rağmen, molekülün genelindeki amino asit benzerliği düşüktür. Örneğin ligand bağlanma bölgesinde %55 oranında homoloji vardır. Bunun sonucu olarak da farklı ligandlar her iki reseptör proteinine farklı bağlanma ilgisi göstermektedir. Reseptör proteinlerinin dağılımı bazı dokularda çakışmakla birlikte farklılıklar göstermektedir⁶¹.

Kandaki serbest östrojen hormonu hücreye zardan hızlı difüzyon ile girer, özgül reseptörlere bağlanır, dimer oluşumu gerçekleşir ve reseptör hormon mesajını çekirdekte kromatine iletir. Bunun ardından protein sentezi ve hormonun karakteristik hücresel yanıtına neden olan mRNA yapımı oluşur.

Östrojen reseptörlerinin yarı ömrü 2-4 saat olup yaklaşık olarak 6 saatte bağlanma kapasiteleri azalır. Bu nedenle östrojen etkisinin devamlılık gösterebilmesi için östrojen varlığının devamlı olması gerekmektedir⁶⁸.

2.5.3 Östrojen Reseptör Proteini Alfa'nın (ÖR α) Yapısı

ÖR α ilk olarak 1958 yılında Elwood Jensen tarafından tanımlanmış, 1986 yılında ilk kez uterustan klonlanmıştır^{66,69}. Bugüne kadar östrojen reseptörleri oositte⁷⁰, granuloza hücrelerinde⁷¹ ve overyan epitel hücrelerinde⁷² tanımlanmıştır. ÖR α 595 amino asit içerir ve 66 kDa ağırlığındadır⁷³.

ÖR α proteini amino ucundan karboksil ucuna doğru A'dan F'ye kadar isimlendirilen 6 bölgeye sahiptir⁷⁴ (Şekil 2).



Şekil 2: İnsan Östrojen reseptör α (ÖR α) proteininin işlevsel bölgeleri. AF-1; Aktivasyon işlevi 1, AF-2; Aktivasyon işlevi 2

A ve B bölgeleri; çekirdek reseptör ailesi içinde oldukça değişken bir bölge olup sahip olduğu Aktivasyon İşlevi 1 (AF-1) yoluyla bir genin ifadenmesini hücreye özgün şekilde düzenlemektedir⁷⁴. Bu sayede ÖR α merkez transkripsiyon aygıtının bileşenleri ile doğrudan etkileşerek hedef genleri aktive eder ya da diğer proteinlere sinyal iletiminde rol oynayan koaktivatör proteinlerle doğrudan ilişki kurar. AF-1 bölgesi, hücre tipi ve kontrol bölgesi içerik özgünlüğüne sahip olmakla birlikte ÖR β ' da bulunmamaktadır⁷⁵.

C Bölgesi; ÖR α proteininin DNA bağlanma bölgesidir. Hedef genlerin Östrojen Cevap Elementlerine bağlanmasından sorumlu olup reseptör dimerizasyonunda görev alır^{63,76}.

D Bölgesi; DNA bağlanma bölgesini ligand bağlanma bölgesi ile ayıran 40-50 amino asitlik bir bölgedir. Reseptör proteininin dimerizasyonunda görev alır aynı zamanda korepressör proteinler ile etkileşmektedir^{74,77}.

E Bölgesi; Ligand bağlanma bölgesini ve Aktivasyon İşlevi 2'yi (AF-2) içermektedir. Aynı zamanda dimerizasyon ve reseptör proteinin çekirdek yerleşiminden de sorumludur. E bölgesinin C ucunda yer alan ve çekirdek reseptör süper ailesi içinde oldukça korunmuş bir yapı olan AF-2, çeşitli koaktivatörler tarafından tanınmakta olup bazı korepressörler için bir tutunma yeri görevi üstlenmektedir⁷⁴.

F bölgesi; Karboksil uçta yer alan bu bölge, ÖR α proteininin gen aktivasyon kapasitesine katkıda bulunmakta ve proteininin dimerizasyonu ve kofaktör bağlanmasında da etki göstermektedir⁷³.

2.5.4 ÖR α ' nın Aktivasyonu

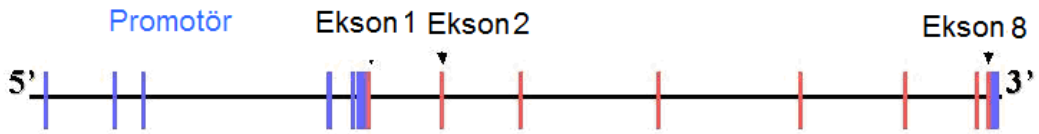
ÖR α ' nın aktivasyonu ligand (östrojen) bağımlı ve ligandtan bağımsız olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Östrojen bağımlı aktivasyon durumunda reseptör proteini, DNA bağlanma bölgesini kapatan ve reseptörü inaktif bir pozisyonda tutan şaperonlar ile bağlıdır. Reseptöre östrojen bağlanması durumunda reseptör proteini Hsp 90, Hsp 70 ve diğer proteinlerden ayrılıp konformasyonel değişiklikler geçirerek dimerizasyon oluşur ve bu şekilde sitoplazmadan çekirdeğe yol alır^{61,75}. Reseptörün ligand bağlanması ile aktive olmasını reseptörün inaktif durumunda bağlı olduğu Hsp 90 şaperonunun ATP'yi hidrolize etmesi tetiklemektedir. Bu durumda östrojen reseptör dimeri DNA üzerindeki Östrojen Yanıt Elementi ile etkileşime girer ve hücresel transkripsiyon kompleksi diğer bileşenleri ile etkileşir⁷⁸. Amino uçta yer alan AF-1 ve ligand bağlanma bölgesinde yer alan AF-2'nin birbirleriyle etkileşimleri sonucu doku, hücre ve kontrol bölgesine özgü olan yardımcı düzenleyici kompleksler hedef gen bölgesine toplanarak hedef genlerin aktivasyonu veya baskılanması yönünde etkilerini gösterirler^{75,78}.

ÖR α ' yı da içeren tüm steroid reseptör proteinleri kendilerine özgü ligandların bağlanmasından sonra fosforile edilirler. Steroid hormon reseptörlerinin fosforilasyonu reseptörün gendeki kendi yanıt elementine bağlanmasında ve bundan sonra gerçekleşen transkripsiyonun aktivasyonunda önemli bir rol oynar⁷⁹. Genel olarak AF-1 bölgesindeki serin amino asitlerinin fosforilasyonu koaktivatör toplanmasını arttırmakta ve ÖR α aracılı transkripsiyonun artışıyla sonuçlanmaktadır. Serin 236 fosforilasyonu, reseptör dimerizasyonunda ve DNA' ya bağlanmada rol oynamaktadır⁸⁰.

ÖR α ' nün ligand bağımsız aktivasyonu ise hücrel kinaz ve fosfatazların aktivitelerini değiştiren moleküler yollarla gerçekleşmektedir⁶⁹. Östrojen yokluğunda farklı sinyallerle aktifleşen kinazların aktive olması ile östrojen reseptörü geri dönüşümlü olarak fosforile edilip aktivasyonu sağlanır⁷⁸. Bu mekanizma özellikle büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler gibi hücre dışı sinyal moleküllerinin yerel konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda ve erkeklerde veya menapoz sonrası kadınlarda olduğu gibi serum östrojen konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda etkili olabilmektedir⁸¹.

2.5.5. Östrojen Reseptör Geni

ÖR- α ve ÖR- β sırasıyla ÖR-1 ve ÖR-2 genlerinden ifadelenmektedir^{63,82}. ÖR-2 geni 14. kromozomda (14q23.2) 40 kb'lık bir bölgeyi içermektedir. ÖR-1 geni, 6. kromozomda (6q24-27) 140 kb'lık bir bölgeyi kapsar ve 8 ekson içermektedir (Şekil 3). Eksonlar sırasıyla 684, 191, 117, 336, 139, 134, 184 ve 4537 bp (toplam 6322 bp) büyüklüğündedir^{62,83,84}.



Şekil 3: İnsan östrojen reseptör 1 geni intron ve ekson bölgeleri.

ÖR α geninin transkripsiyonu karmaşıktır ve bir kaç tane kontrol bölgesinin aktivitesi rol almaktadır⁸⁵. ÖR α ' nın da yer aldığı çekirdek reseptör ailesinin diğer üyelerinden elde edilen bulgular, çoklu kontrol bölgelerinin, steroid hormon reseptörlerinin ortak bir özelliği olduğunu göstermektedir. İnsan ÖR α geninin en az 7 kontrol bölgesinden çoklu mRNA' lara

transkripsiyonu yapılmaktadır ve bu kontrol bölgelerinin bazıları reseptörün ligandı olan östrojenle düzenlenmektedir. Çoklu kontrol bölgelerinin en önemli olası işlevi, kontrol bölgelerinin dokuya özgün düzenlenmesi ve dokulardaki farklı mRNA varyantlarının ifadenmesinin düzenlenmesinde iş görebileceğidir. Örneğin normal meme ve uterin dokusunda kontrol bölgesi A, kontrol bölgesi B' ye oranla daha az kullanılmaktadır. Farklı kontrol bölgeleri gelişimin farklı aşamalarında kullanılabilmektedir. Sıçan embriyonik gelişiminde ÖR α mRNA varyantlarının düzeylerinde farklılıkların olduğu belirlenmiştir⁸⁶.

Çoklu kontrol bölgesi mekanizmasının diğer bir işlevi de farklı kontrol bölgelerinden üretilen mRNA' ların farklı alternatif intron çıkartılması ve ekson birleştirilmesi işlemine (alternatif splicing) uğrayabileceği ve bununla çeşitli protein izoformlarını kodlayan mRNA' larla sonuçlanabileceğidir. Bu sayede ÖR α ' nın farklı mRNA işlenmesine uğramış formları tanımlanmıştır⁸⁶.

2.5.6. Östrojen Reseptör Gen Polimorfizmleri

Polimorfizm, bir toplumda farklı allellere bağlı olarak genetik açıdan belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir⁸⁷. Eğer toplumda herhangi bir lokusta en az iki tane yaygın bulunan allel varsa bu lokusun polimorfizm sergilediği söylenir ve bir allelin toplumdaki sıklığı %1' den fazla olursa bu allel polimorfik olarak adlandırılır^{88,89}.

Östrojen reseptör genleri IVF sonucunu etkileyebilecek ve belli infertilite ile ilgili jinekolojik bozukluklar için risk oluşturabilecek çeşitli DNA dizi varyasyonlarını barındırmaktadır⁹⁰. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda meme kanseri olan, tekrarlayan düşüklere sahip, osteoporozlu veya anti-östrojen

tedavisi gören hasta gruplarında pek çok ÖR-1 gen polimorfizmleri ve mutasyonları incelenmiştir. ÖR-1 geninin 1. intronunda, tek nükleotid polimorfizmleri olan (SNPler) *PvuII* (T/C) ve *XbaI* (A/G) restriksiyon bölgelerinde yer almaktadır. ÖR-1 *PvuII* polimorfizminin endometriozise yatkınlık⁹¹ ve IVF'in KOH/gebelik sonuçları^{62,92} ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *PvuII* ve *BstUI* polimorfizmlerinin meme kanseri ve tekrarlayan düşükler ile ilişkili olduğu saptanmıştır^{84,93}. Buna ek olarak, ÖR-1 kontrol bölgesi bölgesinde yer alan TA dinükleotid tekrarı polimorfizminin prematüre overyan bozukluğu⁹⁴ ve endometriozis⁹² riskini arttırdığı belirlenmiştir. Prematüre overyan bozukluğu olan kadınlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında uzun TA tekrarının daha sık olduğu gözlenmiştir⁹⁵. Aynı çalışmada TA tekrarının c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G ile bağıntılı olduğu ve uzun TA tekrarına sahip kadınların çoğunlukla -397C ve -351G haplotipine sahip oldukları belirtilmiştir. Farklı bir çalışma TA tekrarının ÖR-1 gen ifade edilmesine veya işlevine etkisi olduğuna dikkat çekmektedir⁸⁶.

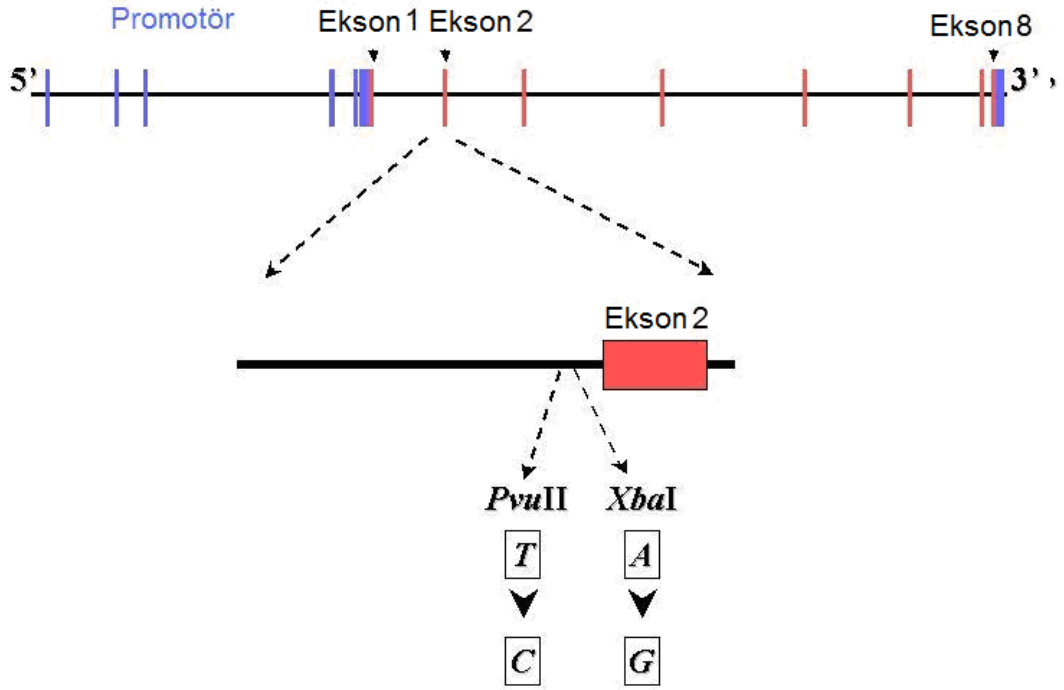
ÖR-1 genindeki polimorfizmler ve çeşitli klinik fenotipler arasındaki ilişkileri araştıran bu çalışmalar *PvuII*, *XbaI* ve kontrol bölgesindeki TA tekrar polimorfizmleri üzerine yoğunlaşmıştır⁹⁶.

PvuII polimorfizmi, intron 1' de timin nükleotidinin sitozine dönüşümü (T>C) sonucu oluşur ve bu dönüşümün belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enziminden yola çıkarak bu polimorfizme *PvuII* polimorfizmi denilmektedir. Bu polimorfizm ayrıca IVS1-397 T/C, c.454-397T>C ve rs2234693 olarak da adlandırılmakta olup bu tez çalışmasında c.454-397T>C isimlendirmesi kullanılacaktır. Bu isimlendirmede, 454 ÖR-1 geninin cDNA dizisinde polimorfik bölgeden sonra protein kodlayan en yakın eksonun başlangıç nükleotidini belirtmektedir. -397 ise polimorfik bölgenin DNA dizisinde kendisinden sonra gelen ilk eksondan kaç baz önce bulunduğunu

belirtmektedir. Dolayısıyla, T>C dönüşümü 2. eksonun başlangıcından 397 nükleotid yukarısında gerçekleşmektedir ⁹⁷. *PvuII* enziminin kesim bölgesinin olması p alleli ya da T alleli (yaban tip) olarak adlandırılmaktadır. Enzimin kesim bölgesinin olmaması ise P alleli veya C alleli (polimorfik) olarak isimlendirilmektedir.

c.454-397T>C polimorfizminin ÖR-1 mRNA'sında intronların çıkması ve eksonların birleşmesine (splicing) etki ettiği ve meydana gelen T>C dönüşümünün protein sentezinde bir değişime yol açtığı düşünülmektedir⁹⁸. C allelinin myb ailesi transkripsiyon faktörleri için bir bağlanma bölgesi oluşturduğu gösterilmiş ve bu bağlanmanın ÖR α proteininin sentezini etkileyeceği sonucuna varılmıştır ⁹⁹.

XbaI polimorfizmi, intron 1' de adenin nükleotidinin guanine dönüşümü (A>G) sonucunda oluşmaktadır. Bu dönüşümün belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enziminden yola çıkarak bu polimorfizm *XbaI* polimorfizmi olarak adlandırılmaktadır. Bu polimorfizm ayrıca IVS1-351 A/G, c.454-351A>G ve rs9340799 olarak da adlandırılmakta olup bu tez çalışmasında c.454-351A>G isimlendirmesi kullanılacaktır. Bu ifadede 454; ÖR-1 geninin cDNA dizisinde, polimorfik bölgeden sonra protein kodlayan en yakın eksonun başlangıç nükleotidini belirtmektedir. -351 ise polimorfik bölgenin DNA dizisinde kendisinden sonra gelen ilk eksondan kaç baz önce bulunduğunu belirtmektedir. Dolayısıyla A>G değişimi 2. eksonun başlangıcından 351 nükleotid önce gerçekleşmektedir. *XbaI* polimorfizmine neden olan A>G değişimi, *PvuII* polimorfik bölgesinden yaklaşık 50 baz aşağı kısımda yer almaktadır ⁹⁸ (Şekil 4). *XbaI* enziminin kesim bölgesinin olması x alleli ya da A alleli (yaban tip) olarak adlandırılmaktadır. Enzimin kesim bölgesinin olmaması ise X alleli veya G alleli (polimorfik) olarak isimlendirilmektedir.



Şekil 4: İnsan östrojen reseptör 1 geni 1. intronunda yer alan PvuII (c.454-397T>C) ve XbaI (c.454-351A>G) polimorfizmlerinin yerleşimi

ÖR-1 geninin kontrol bölgesinde yer alan TA tekrar sayısına bağlı olarak oluşan **TA tekrar polimorfizmi** birinci eksonun 1kb'lık üst bölgesinde yer almaktadır. ÖR-1 gen kontrol bölgesi alternatif eksonlar ve farklı gen transkriptlerinin ifade edilmesi ile sonuçlanan alternatif kesim bölgeleri içeren çoklu kontrol bölgelerine sahip oldukça karmaşık bir genomik organizasyona sahiptir⁸⁶. Kos ve arkadaşlarının literatürde isimlendirmesine göre TA tekrar polimorfizmi ekson C ve B arasında 1.5 kb'lık bir bölgede bulunmaktadır. TA dinükleotid tekrar uzunluğunun, alternatif kontrol bölgesi kullanımını etkileyerek belirli dokularda farklı ÖR-1 ifadenmesine yol açtığı bildirilmiştir¹⁰⁰. Diğer taraftan steroid yanıt elementi gibi davranabilecek bir düzenleyici elementinin TA tekrarının yaklaşık 200 bç aşağısında yer aldığı belirlenmiştir¹⁰¹. Her ne kadar bu enhancer'ın rolü belirlenememiş olsa da

polimorfik tekrar bölgesine yakınlığı onu TA tekrar büyüklüğünün işlevsel etkileri için potansiyel bir hedef yapmaktadır.

Blastokist ve 2 hücre aşamasındaki embriolarda ÖR-1 mRNA'sının ifade edilmesi östrojenin erken embriyonik gelişimde rol oynama olasılığını güçlendirmektedir⁶². Literatürde yer alan bulguların ışığında belirli östrojen reseptör gen polimorfizmlerinin araştırılması infertilite tedavisinde önemli bir adım olabilecektir.

Biz bu çalışmada öncelikle farklı hücre gruplarına uygulanmakta olan komet tekniğini insan oosit hücreleri için uyarlamayı ve bu tekniğin optimizasyonunu sağlamayı daha sonra infertil çiftlerin başvurduğu yardımcı üreme tekniklerinde uygulanan bazı tekniklerin insan oosit DNA'sı üzerine etkilerini araştırmayı planladık. Çalışmamızın ikinci bölümünde ise daha önce pek çok patolojik hastalıklar üzerine etkisi kanıtlanmış östrojen reseptör polimorfizmlerinden c.454-397T>C, c.454-351A>G ve TA dinükleotid tekrar polimorfizmlerinin öncelikle infertilite daha sonra başta fertilizasyon olmak üzere yardımcı üreme tedavilerinde elde edilen klinik parametrelere olan etkilerini belirlemeyi amaçladık.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1.Cihazlar

- Floresan mikroskop (Olympus, ABD)
- Mikromanipulator (Eppendorf, Almanya)
- Elektromanipulator (BTX, ABD)
- Uygulamalı İmaj Sistemi (Cytovision version 2.7, England)
- İnkübatör (Heraus, Almanya)
- Masaüstü mini santrifüj (Hettich Mikro 22, Almanya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Spin vortex (Biosan FV-2400, Rusya)
- Mikropipetler (CLP Bt10, Bt100, Bt1000 Beta pipetor, ABD)
- Thermal cycler (Otomatik ısı döngü cihazı) (Eppendorf, Almanya)
- Thermal cycler (Otomatik ısı döngü cihazı) (Cetus, Almanya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan TDB-120, Rusya)
- Mikrodalga fırın (Arçelik MD533, Türkiye)
- Derin dondurucu (-86⁰C) (Sanyo MDF-U53865, Japonya)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo EC250-90, ABD)
- Elektroforez tankı (Thermo Midicell Primo EC330, ABD)
- UV transiluminator (LKB 2011, ABD)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic 100, ABD)
- Otomatik DNA dizi analizi sistemi (ABI 310, ABD)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- G-MOPS, tamponlu embriyo manipulasyon solusyonu (Vitrolife, İsveç)
- G-Fert, embriyo fertilizasyon solüsyonu (Vitrolife, İsveç)
- G1, embriyo kültür solüsyonu 1 (Vitrolife, İsveç)
- G2, embriyo kültür solüsyonu 2 (Vitrolife, İsveç)
- ICSI, sperm manipulasyon solüsyonu (Vitrolife, İsveç)
- Hyaluronidaz enzimi (Vitrolife, İsveç)
- Ovoil (Vitrolife, İsveç)
- %1 N-lauroylsarcosine (Sigma, ABD)
- NaOH (Sigma, ABD)
- Merkaptoetanol (Sigma, ABD)
- Akridin oranj (Sigma, ABD)
- Hidrojen peroksit (Sigma, ABD)
- DNA saflaştırma kiti (Roche, Almanya)
- Primer sentezleri (Metabion, Almanya)
- PZT tamponu (Fermantas, Litvanya)
- Agaroz (ONBIO Inc., Kanada)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat) (Sigma, ABD)
- *PvuII* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ve tamponları (Fermantas, Litvanya)
- dNTP karışımı (Fermantas, Litvanya)
- Taq DNA polimeraz (Fermantas, Litvanya)
- $MgCl_2$ (Fermantas, ABD)
- Trizma baz (Sigma, ABD)
- Gliserol (Sigma, ABD)
- Orange G (Sigma, ABD)

- Sodyum asetat (Sigma, ABD)
- Etidyum Bromür (Sigma, ABD)
- 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci (Fermantas, Litvanya)
- ϕ X174 moleküler ağırlık belirteci (Fermantas, Litvanya)
- BigDye® terminator V3.1 dizi analizi kiti (ABI, ABD)
- Invisorb PZT sonrası saflaştırma kiti (Invitek, Almanya)
- GeneScan-500 ROX size standard (ABI, ABD)
- POP-4 Polimer (ABI, ABD)
- POP-6 Polimer (ABI, ABD)

3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. 5X TBE Çözeltisi Hazırlanışı

Trizma Baz	54 g
Borik Asit	27.5 g
0.5 M EDTA (pH: 8)	20 ml

Kimyasallar çözüldükten sonra 1 litre olacak şekilde üzerine distile su eklendi.

3.2.2. 1X TBE Çözeltisi Hazırlanışı

200 ml 5X TBE, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.2.3. Orange G Jel Yükleme Boyası Hazırlanışı

Gliserol	55 ml
Orange G	100 mg
1X TBE çözeltisi	45 ml

Karıştırılarak çözülür.

3.2.4. Stok Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı

10 mg etidyum bromür 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.2.5. 3X Sodyum asetat (NaOAc) Çözeltisi Hazırlanışı

NaOAc $\cdot$ 3H ₂ O	0.04 g
---------------------------------	--------

80 ml distile suda çözüldükten sonra, glasial asetik asit ile (pH:4.6)'ya ayarlanarak hacim 100 ml'ye tamamlanır.

3.2.6. 1M Tris-HCl (pH 7.5) Hazırlanışı

6.05 g Tris Base dH₂O ile 250 ml' ye tamamladı. HCl ekleyerek pH 7.5'a ayarlandı.

3.2.7. Komet Lizis Solüsyonunun Hazırlanışı

%1 N-lauroylsarcosine	0.1 g
0.5M EDTA	7.4 g

1M Tris HCl 50ml

NaOH pelletleri ile pH>10 a ayarlandı. Lizis solusyonundan 5ml alınıp 100µl merkaptotanol eklendi.

3.2.8. Akridin Oranj Solüsyonunun Hazırlanışı

0.001g akridin oranj 5ml saf suda çözülerek hazırlandı.

3.3. Agaroz Jel Hazırlanışı

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 g agaroz hassas terazide tartıldı. 1X TBE çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırın kullanılarak kaynatıldı. Agarozun homojen bir şekilde erimesinden ve sıcaklık 60°C' ye düştükten sonra 3 µl etidyum bromür eklendi. Hazırlanan karışım elektroforez tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE çözeltisinden eklendi.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler

Bu prospektif çalışmaya Gen-Art Kadın Sağlığı, Tüp Bebek ve Üreme Biyoteknolojisi Merkezi'ne çocuk sahibi olma isteği ile başvuran 104 kadın ve kontrol grubu olarak en az 1 çocuk sahibi olan fertil olduğu belirlenmiş 107 kadın dahil edildi. Polikistik over sendromu, endometriozis gibi patolojileri bulunmayan, açıklanamayan infertilite teşhisi konmuş kadınların yaşlarının 28-35 arasında olması ve menstrual döngünün 2.

gününde FSH düzeylerinin ≤ 8 mIU/ml olması şartı ile grup oluşturuldu. Eşlerinin sperm parametrelerinin normal olması (normospermi) dikkate alınarak erkek infertilitesi olguları çalışma grubu dışında bırakıldı. Normospermi tanısını koymak için, sperm konsantrasyonunun en az 20×10^6 /ml olması, progresif sperm hareketliliğinin en az %40 oranında olması, normal sperm morfolojisinin ise en az %14 oranında olması gibi Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterleri kullanıldı. Kontrol grubu ise yine aynı yaş grubundan en az bir çocuk sahibi olmuş ve infertilite problemi olmayan kadınlardan oluşturuldu. İnfertil kadınlar 4 gruba ayrıldı ve toplanılan oositleri farklı işlemlere maruz bırakılarak Komet tekniği ile oluşan DNA hasarı belirlendi. Her birinde 26 kadının ve oositlerinin bulunduğu bu gruplar aşağıdaki gibi planlandı.

- Grup 1: mikroyenjeksiyon öncesi oositlerine komet uygulanan kadınlar
- Grup 2: mikroyenjeksiyon sonucu fertilize olmayan oositlerine komet uygulanan kadınlar
- Grup 3: piezo elektrik uygulanmış oositlerine komet uygulanan kadınlar
- Grup 4: hidrojen peroksit ilave edilen solüsyonda 1.5 saat bekletilen oositlerine komet uygulanan kadınlar (pozitif kontrol)

Oosit toplama işleminin ardından her bir grup için ayrılan oositler eş zamanlı olarak komet işlemine kadar embriyoloji laboratuvarında özel inkübatörler (Heraus, Almanya) içerisinde kültür solüsyonlarında (G-IVF, Vitrolife, İsveç) bekletildi. Oositlerin foliküllerden aspire edilmesi ve komet tekniğinin uygulanması arasında geçen zaman her grup için eşit tutuldu.

Oositlerin olgunlaşması ve fertilizasyonu ile DNA hasarının ilişkisini incelemek amaçlı 100 adet infertil kadının metafaz II aşamasındaki oositlerinden 1-2 tanesine komet tekniği uygulandı. Kadınların takip edilen

diğer oositlerinden elde edilen olgunlaşma oranları ile aynı oositlerin ICSI yöntemi ile spermle birleştirilmesiyle elde edilen fertilizasyon oranları kaydedilerek komet sonuçları ile karşılaştırıldı.

Oositleri toplanan 104 kadından ve kontrol grubunda yer alan 107 kadından 0.5M EDTA' lı tüpe 2 ml kan örnekleri alındı. Hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireyler çalışma konusunda bilgilendirildi ve tüm olgulardan çalışma ile ilgili "aydınlatılmış onamları" alındı.

3.4.2. Oositlere Komet Tekniğinin Uygulanması

1. Lamların altı elmas kalemi ile daire şeklinde çizildi.
2. Dairenin içine en fazla 2 oosit konularak hava ile kurutuldu.
3. Metanol solüsyonu ile 15 sn fikse edildi ve hava ile kurutuldu.
4. Fikse olmuş oositler taze olarak hazırlanan akrinin oranj solüsyonunda 5 dk bekletilerek boyandı.
5. Lamlar arka plan boyayı uzaklaştırmak üzere su ile yıkandı ve hava ile kurutuldu.
6. %0.8'lik agaroz hazırlandı.
7. Hazırlanan agaroz her bir lamın yüzeyine 20° açı ile pipet kullanılarak damlatıldı ve fazla gelen agarozun köşelerden süzülmesine izin verildi.
8. Her lam masa üzerine yatay şekilde konuldu.
9. Agaroz katılaştığında plastik bir kutuya yerleştirildi ve 4°C'de alkali lizis tamponu agaroz yüzeyine pipet ile damlatıldı. (lizis tamponu: %1'lik N-lauroylsarcosine, 1M Tris-HCl pH:7.5, 0.5 EDTA, 0.3M merkapttoethanol, NaOH; pH>10)

10. Lamlar hücrelerin DNA'sının serbest kalıp çözünmesi amaçlı 30 dk karanlıkta bekletildi.

11. Lamlar saf su ile yıkandı ve elektroforez tankınındaki 1X TBE solüsyonu içine daldırılarak 5-10 dk dengeye ulaşması için bekletildi.

12. 50 volt sabit voltajda 40 dk yürütüldü.

13. Vakit geçirmeden lamlar, UV floresan mikroskopunda 20X büyütme ile analiz edildi.

14. Her bir oositin ortalama piksel yoğunluğu ve çap uzunluğu Bs200ProP software programı ile ölçülerek komet analizi yapıldı.

3.4.3. Genomik DNA Saflaştırılması

Kan örneklerinden genomik DNA saflaştırma işlemi aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1- 1.5 ml'lik ependorf tüpüne; 200 µl bağlanma tamponu, 200 µl kan örneği ve 40 µl Proteinaz K eklendi.

2- Hemen karıştırılarak 70°C' da 10 dk inkübe edildi.

3- Karışıma 100 µl izopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

4. Yeni bir ependorf tüpünün içine filtreli tüp yerleştirildi ve karışım bu tübe aktarıldı. 1 dk 10000 rpm'de santrifüj edildi.

5. Ependorf tüpün içinde biriken sıvı döküldü. Filtreli tüpte kalan çökelti üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklendi.

6. 1 dk 10000 rpm'de santrifüj edildi. Ependorf tüpün içinde biriken sıvı döküldü. Filtreli tüpte kalan çökelti üzerine 500 µl yıkama tamponu eklendi.

7. 1 dk 10000 rpm'de santrifüj edildi. Ependorf tüpün içinde biriken sıvı döküldü. Filtreli tüpte kalan çökelti üzerine 500 µl yıkama tamponu eklendi.

8. 1 dk 10000 rpm'de santrifüj edildi. Ependorf tüpün içinde biriken sıvı döküldü.
9. 10 sn 15000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Ependorf tüp yenisi ile değiştirildi tüplere 200 µl elution tamponu (70°C) ilave edildi.
11. 1 dk 10000 rpm'de santrifüj edildi.
12. Filtreli tüp atıldı. Ependorf tüpte genomik DNA kullanıma hazır hale geldi.

3.4.4. ÖR-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgelerinin PZT ile Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen özgül primerler kullanılarak polimorfizmleri içeren bölge PZT yöntemi ile çoğaltıldı. ÖR-1 geninin 1300 bç'lik bölgesini çoğaltmak üzere seçilen primerler Şekil 5 ve tepkime karışımları Tablo 2'de verilmiştir.

İleri Primer (forward primer) 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC
CTA TTC TCC- 3'

Geri Primer (reverse Primer) 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG
ATT ATC TGA-3'

5' CTGCCACCCTA

35641 AGTCTCTTCATTCTAAAAAATTCATTTTCTGGGTCTTATATCTTCAGCTGCCACCCTA

TCTGTATCTTTTCTATTCTCC 3'

35701 TCTGTATCTTTTCTATTCTCCTCCAAGTTCCTCAAAGGAATGCTTCCTCATTTCATC

35761 TCCTTACATTCCATCTGCTGAATTTGGCTTGTGCCTGTACCTGTCTAAGGAACTOCTT

35821 GCTAAGAGTCTGCTTTGTGAGGTCTGAATTCACCTAACCACTCTTTGCTTTGTTGACTT

35881 CTCTGCCCATTTTGOCATTCTTGATCATCTCTCCATAAACCTTTCTACTTAAAGCATT

35941 TACTTCCTTAATTTCTGGTTTTCTAGAAATCTOCTTACTGTTCAATTTTCAGCTTCCTT

36001 CTGTGTTCTCTCTCTTCTACATTTTTTTTTAGCTTTCTACTTTCTTAAAGCATTTTA

36061 CTTCCTTAATTTCTGGTTTTCTAGAAATTTCTTACTGTTCAATTTTCAGTTTCCTTCT

36121 GTGTTCTCTGATTGTCTCTCTTTCTACATTTTTTTTTCTGTGTTCTCTGATTTCAC

36181 GCAGTCTGGAGTTGTCTATGATCAATCATAGCCTACTGCAGCTCGACATCCTAGGCTCAA

36241 GTGATTCTOCCACCTCAGCCTTACAAGTAGCTAGGACTACAGTCACACATCACCATTCTC

36301 AGCTAATTTTTTAAGAAGCATTTTTATAGAGATGGAGTCTTGCTATATTGTGCAGGCTG

36361 GGCTCAAACCTACAGGGCTTAAACAATCTCTGCTTTGGCCTCCCAAAGTCTGGGATTCT

36421 CAGGCATGAACCCCATGCTCAGTCTCTACATGTTCTTAAAGAGGAGTTTGAATATGA

36481 AGAACAGTATTTTCAAATTACATTATTCAAGTTATAAAAACTGATATCCAGGGTTATGTG

36541 GCAATGACGTAAAAATTGAATTGTTATTTTTTTGACACATGTTCTGTGTTGTCCATCAG

c.454-397 T>C

36601 TTCATCTGAGTTCCAAATGTCCAG*CTGTTTTATGCTTTGTCTCTGTTTCCAGAGACCC

c.454-351 A>G

PvuII

36661 TGAGTGTGGT*CTGAGTTGGGATGAGCATTGGTCTCTAATGGTTCTGAAATAATTGTATA

XbaI

36721 TTCTGCAAAAACATTAACTCTATTAGAAAACAGCTAATTCATTTTGTCAATTTTATAG

36781 GTAACATATTCTGGTGCAGGTAGTATGTTTTTAAACAAGTTTGAATAAACAATTTCCC

36841 CTCAAGGTTAATAATAGGCAACACCTTTTCTGCAACAGACGGCAAGAGGTAATGAAA

36901 GATTAGCTTACATTATGATTCAATTATTCAAATGTGAGGATAAAGTGGATCTGCTGCAT

36961 CTCCAGAGAGTGCATGTTTGTCTTTCTAATGTTAATGGATTACTGTTTTTTTCCCC

37021 CAGGCCAAATTCAGATAATCGACGCCAGGTTGGCAGAGAAAGATTGGCCAGTACCAATGA

3' AGTCTATTAGCTGCGGTCCACCGTCTCTTTCT 5'

Şekil 5: ÖR-1 genine ait 1300 bp'lık bölümünü çoğaltan primerler, bölgenin genomdaki yerleşimi ve c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmleri için kullanılan restriksiyon enzimleri ve kesim yerleri. Referans: ENSG00000091831 giriş no'lu dizi.

3.4.4.1. Ör-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgenin PZT Tepkime Karışımı

Hedef DNA bölgesini çoğaltmak için tepkime esnasında son konsantrasyonları 1xPZT tamponu, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, her iki primerden 0.6 µM, 1.5 U / 50 µl Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde stok çözeltilerden Tablo 2' de belirtilen miktarda mikropipet yardımı ile çekildi. Tepkime karışımı 0.5 ml' lik tüplere dağıtıldı ve üzerine saflaştırılan genomik DNA eklendi. Son olarak tepkime esnasında buharlaşmayı önlemek için karışım üzerine mineral yağ damlatıldı. Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı. Ardından otomatik ısı döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi.

Tablo 2: Ör-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgenin PZT Tepkime Karışımı

	Stok	Son konsantrasyon	Toplam Hacim : 50µl
Steril dH ₂ O	-	-	34.1 µl
Tampon Çözeltisi	10x	1x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTP'ler	10 mM	0,2 mM	1 µl
İleri primer	100 µM	0.6 µM	0.3 µl
Geri primer	100 µM	0,6 µM	0.3 µl
Taq DNA polimeraz	5000 U/ml	1.5 U / 50 µl	0.3 µl
DNA	-	-	5 µl

3.4.4.2. ÖR-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgenin PZT Programı

Başlangıç ayrılma işlemi için 94°C'de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 30 döngü ve son uzama için ise 72°C'de 5 dk bir döngü olacak şekilde PZT tepkimesi gerçekleştirildi.

Ayrılma	94°C'de 30 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	62°C'de 1 dk	
Uzama	72°C'de 1.5 dk	

Program sonunda hedef DNA bölgesi çoğaltılmış oldu.

3.4.4.3. ÖR-1 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerini İçeren Bölgeye Ait PZT Ürünlerinin Analizi

PZT ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi için hazırlanan kimyasal karışımların içerikleri belirtilmiştir. Bu bölge için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Agoroz jele PZT ürününden 10 µl alınarak, 3 µl orange G jel yükleme boyasıyla mikropipet yardımı ile karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Aynı zamanda kuyulardan birine de ϕ X174 DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenip 25 dk 150 volt sabit akımda yürütüldü. Mor ötesi ışık kaynağı altında, moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırılarak 1300 baz çiftlik büyüklüğe denk gelen bant aranarak sonuçlar değerlendirildi. Jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip fotoğrafı çekildi.

3.4.5. ÖR-1 c.454-397 T>C Polimorfizminin Belirlenmesi için PZT Ürünlerinin *PvuII* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

PvuII, *Proteus vulgaris* 'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA' yı

5'-CAG ↓ CTG-3'

3'-GTC ↑ GAC-5'

dizisinden tanıyarak küt uçlu kesim yapmaktadır. PZT ile elde edilen 1300 bç'lik hedef gen bölgesi *PvuII* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede timin içeren allel *PvuII* kesim noktası taşımaktadır. Timinden → sitozine (T→C) bir nükleotid değişimi olması halinde *PvuII* enziminin tanıdığı bölge ortadan kalkmaktadır. Bu nükleotid değişimi olmayan (PP genotipli) bireylerde 850 ve 450 bç'lik iki bant, heterozigot bireylerde (Pp genotipli) 1300, 850 ve 450 bç'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (pp genotipli) 1300 bç'lik tek bant görülecektir.

3.4.5.1. Deneyin Yapılışı

- 1- 0.5 ml' lik ependorf tüpünün içine 15 µl PZT ürünü eklendi.
- 2- 17 µl son hacim içerisinde 10 U/µl *PvuII* enzimi ve 10X Buffer G tamponu (10 mM Tris-HCl (pH 7.5; 37°C), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA) eklendi.
- 3- 37°C'de bir gece kuru ısıtıcı blokta inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon sonrası tüplerden alınan 17 µl kesim ürünü ile 5 µl orange G ile karıştırılarak %2' lik agoroz jele yüklendi.
- 5- %2' lik agoroz jelde φX174 DNA moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 40 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.4.6 ÖR-1 c.454-351 A>G Polimorfizminin Belirlenmesi için PZT Ürünlerinin Xbal Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Xbal, *Xanthomonas badrii* 'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı

5'-T ↓ CTAGA-3'

3'-AGATC ↑ T-5'

dizisinden tanıyarak yapışkan uçlu kesim yapmaktadır. PZT tepkimesi sonrası 1300 bp'lik PZT ürünü *Xbal* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede adenin içeren allel nükleotid kesim noktası taşımaktadır. Adeninden→ Guanine (A →G) bir nükleotid değişimi olması halinde *Xbal* enziminin tanıdığı bölge ortadan kalmaktadır. Bu nükleotid değişimi olmayan (XX genotipli) bireylerde 900 ve 400 bp'lik çift bant, heterozigot bireylerde (Xx genotipli) 1300, 900 ve 400 bp'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (xx genotipli) 1300 bp'lik bant görülecektir.

3.4.6.1. Deneyin Yapılışı

- 1- 0.5 ml' lik ependorf tüpünün içine 15 µl PZT ürünü eklendi.
- 2- 17 µl son hacim içerisinde 10 U/µl *Xbal* enzimi ve 10X Buffer Tango tamponu 33 mM Tris-asetat (pH 7.9; 37°C), 10 mM magnezyum asetat, 66 mM potasyum asetat, 0.1 mg/ml BSA eklendi.
- 3- 37°C' de bir gece kuru ısıtıcı blokta inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon sonrası tüplerden alınan 17 µl kesim ürünü ile 5 µl orange G ile karıştırılarak %2' lik agoroz jele yüklendi.
- 5- %2' lik agoroz jelde φX174 DNA moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 40 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.4.7.Döngüsel DNA Analizi Yöntemi ile c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G Polimorfizmlerinin PZT-RFLP Sonuçlarının Doğrulanması

ÖR-1α geni, c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmlerinin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının doğrulanması amacıyla hasta ve kontrol grubundan rastgele seçilen 20 örneğe DNA dizi analizi tepkimesi uygulandı. Bölgeye ait PZT ürünleri Invisorb Spin PCRapid Kit kullanılarak saflaştırıldı.

1-2 ml'lik ependorf tüpüne filtre yerleştirdi.

2-PZT tüpüne 130 µl tampon fosfat eklendi. Karışım filtreye aktarılıp 1 dk bekletildi.

3-30 sn 10.000 x rpm de santrifüj edildi. Çökelti kısmı atıldı.

4-700 µl yıkama çözeltisi filtrenin üzerine eklenip, 30 sn 10.000 x rpm de santrifüj edildi.

5-Çökelti kısmı atıldı. Filtre aynı ependorf tüpüne tekrar yerleştirilip, 3 dk 14.000 x rpm de kalan yıkama çözeltisi uzaklaştırılması için santrifüj edildi.

6-Filtre yeni 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. 20 µl örnek seyrelti çözeltisi filtreye yüklendi. 3 dk oda sıcaklığında bekletildi.

7-1 dk 10.000 x rpm de santrifüj edildi. Filtre atıldı. Böylelikle çökeltideki PZT ürünü kontrol amaçlı saf halde elde edildi.

3.4.8. Saflaştırılan PZT Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Analizi

Saflaştırılan PZT ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. %2'lik agaroz jele örneklerden 5 µl yüklenerek PZT ürünleri kontrol edildi.

3.4.9. Döngüsel DNA Dizi Analizi Tepkime Karışımı

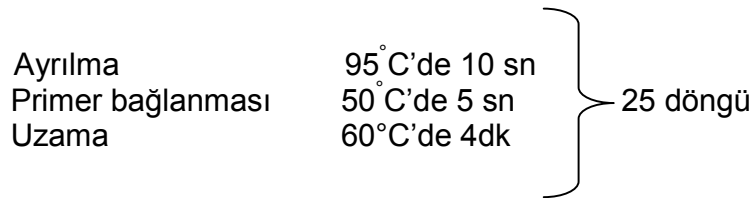
ÖR-1 geni, c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmlerini içeren gen bölgelerinin döngüsel dizi analizi tepkimesi BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ve ona ait protokol kullanılarak gerçekleştirildi. DNA dizi analizi tepkimesi için yeni dizayn ettiğimiz primer dizisi (Kont-ÖR olarak isimlendirildi) aşağıda gösterilmiştir. DNA dizi analizi amplifikasyon karışımı Tablo 3’de verildi.

Kont-ÖR: 5'-TTACCTCTTGCCGTCTGTTG-3'

Tablo 3 : DNA Dizi Analizi Amplifikasyon Karışımı

H ₂ O	7.5 µl
Dizi Analizi kit karışımı	8 µl
Primer Kont-ÖR (10 pmol/µl)	0.5 µl
Saflaştırılmış PZT ürünü	4 µl

Isı 94 °C’ye geldikten sonra tüpler otomatik ısı döngü cihazına yerleştirildi. Başlangıç ayrılma işlemi için 95°C’de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 25 döngü olacak şekilde PZT tepkimesi gerçekleştirildi.



Döngüler tamamlandıktan sonra, DNA dizi analizi tepkimesi sonrası saflaştırma işlemi aşağıda yazılı protokole göre yapıldı:

- 1-Döngüsel dizi analizi tepkimesi sonrası PZT tüpünün üzerine 2 µl (3mM pH:4.6) NaOAc dan eklendi.
- 2-Üzerine 50 µl % 96'lık etil alkol eklendi.
- 3-Karışım 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı, hafifçe vurularak karıştırıldı.
- 4-Buz üzerinde 15 dk bekletildi.
- 5-Süre sonunda beklemeden 20 dk 13.000 x rpm de santrifüj edildi.
- 6-Üstte kalan kısım pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- 7-Geriye kalan çökelti oda ısısında kurumaya bırakıldı.
- 8-Üzerine 20 µl formamid eklenerek 0.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
- 9-94 °C' de denatürasyon işlemi yapıldıktan sonra -20 °C' de 2 dk bekletildi.
- 10-Tüpler Otomatik DNA dizi analizi sistemine yerleştirilerek örnekler okutularak analiz edildi.

3.4.10. ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarları İçeren Bölgenin PZT ile Çoğaltılması

ÖR-1 geninin kontrol bölgesinde tanımlanan ikili tekrarların sayılarını belirlemek üzere aşağıda tanımlı floresan işaretli primer seti kullanılarak ilgili bölge PZT yöntemi ile çoğaltıldı (Şekil-6). ÖR-1 gen bölgesi 8624. ve 8906. nükleotidleri arasındaki TA tekrarlarına ait 158-192 baz çiftlik bölgeyi çoğaltmak üzere seçilen primerler (TAÖR olarak isimlendirildi):

FAM işaretli TAÖR-F: 5' GACGCATGATATACTTCACC 3'
TAÖR-R: 5' GCAGAATCAAATATCCAGATG 3'

```
          5' GACGC ATGATATACT TCACC
901 CTATCCAAGA TTATAGACGC ATGATATACT TCACCTATTT TTTGTCTCCT TAATATGTAT
          *
961 ATATATATAT ATATATATAT ATATACACAT ATATGTGTGT GTGTATGTGC GTGTGCAIGT
          * * * * *
1021 TTAACTTTTA ATTCAGTTAA AAACTTTTTT CTATTTGTTT TTCATCTGGA TATTTGATTC
          3' GTAGACCT ATAAACTAAG
1081 TGCATATCCT AGCCCAAGTG AACCGAGAAG ATCGAGTTGT AGGACTAAAAG ATAGACATG
          ACG 5'
```

Şekil 6: ÖR-1 geninin kontrol bölgesinde TA dinükleotid tekrarlarını içine alan bölgeyi çoğaltan primerler ve bölgenin genomdaki yerleşimi

Amplifikasyon sonucu eldesi beklenen ürünlerin uzunlukları ve tekrar sayıları Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4: PZT Ürünlerinin Uzunlukları ve Tekrar Sayıları

<i>Amplifikasyon uzunluğu (bp)</i>	<i>Tekrar sayısı</i>
158	8
160	9
162	10
164	11
166	12
168	13
170	14
172	15
174	16
176	17
178	18
180	19
182	20
184	21
186	22
188	23
190	24
192	25

3.4.10.1. ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarı İçeren Bölgenin Tepkime Karışımı

PZT tepkimesi karışımını hazırlamak için 1.5 mM MgCl₂, 20 µM dNTP, 20 pmol/µl her primerden, 1.0 U/µl Taq DNA polimeraz enzimi ve PZT tamponu kullanıldı. PZT karışımı ince çeperli 0.2'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan genomik DNA eklendi. PZT tüpünde son hacim 25 µl olup içeriği Tablo 5'de gösterildi.

Tablo 5: ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarını İçeren Bölgenin Tepkime Karışımı

Karışım	Stok	Final konsantrasyon	Toplam : 25µl
dH ₂ O	-	-	17.2 µl
PZT tamponu	10x	1x	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 Mm	1.5 µl
dNTP	10 mM	20 µM	0.2 µl
TAOR-F	100 pmol/µl	20 pmol/µl	0.2 µl
TAOR-R	100 pmol/µl	20 pmol/µl	0.2 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	1.0 U/µl	0.2 µl
DNA	-	-	3 µl

3.4.10.2. ÖR Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarını İçeren Bölgenin PZT Programı

Başlangıç ayrılma işlemi için 94°C'de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 30 döngü ve son uzama için ise 72°C'de 5 dk bir döngü olacak şekilde PZT tepkimesi gerçekleştirildi.

Ayrılma	94°C'de 30 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	62°C' de 1dk	
Uzama	72°C'de 1dk	

Program sonunda hedef DNA bölgesi çoğaltılmış oldu.

3.4.10.3. ÖR Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarlarını İçeren PZT Ürünlerinin Analizi

PZT ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi için hazırlanan kimyasal karışımların içerikleri belirtildi. Bu bölge için %2'lik agaroz jel hazırlandı.

3.4.10.4. ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarlarının Analizi

Herbir örnek için aşağıda belirtilen oranlarda fragment karışımı ayrı ayrı hazırlandı. Fragment uzunluklarının belirlenmesinde internal standard olarak GeneScan-500 ROX kullanıldı. Bu karışım uzunlukları 35 ve 500 arasında değişen (35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, 500) 16 adet ROX işaretli tek zincirli DNA fragmanını içermektedir. Sıcaklık 80°C' ye geldikten sonra tüpler PZT cihazına yerleştirildi. 5 dk denatüre edildikten sonra -20°C' de 2 dk bekletildi. Tüpler otomatik DNA dizi analizi sistemine yerleştirildi. Tablo 6 fragment analiz karışımı ve miktarları gösterildi.

Tablo 6: ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrarlarına Ait Fragment Analizi Karışımı

Karışım	Toplam: 21.5 µl
Formamid	20 µl
ROX işaretli size Standard	0.5 µl
FAM işaretli PZT ürünü	1 µl

Örnekler 32 dk 60°C'de yürütüldükten sonra, GENESCAN v.3.0 programı kullanılarak analiz edildi.

3.4.10.5. Döngüsel DNA Analizi Yöntemi ile ÖR-1 Geni Kontrol Bölgesi TA Tekrar Sayılarının Doğrulanması

Fragment analizi yöntemi ile TA tekrar sayıları belirlenen örneklerden her iki allelinde de tekrar sayıları eşit olanlar, sonuçların doğrulanması amacıyla DNA dizi analizine tepkimesine alındı. Döngüsel dizi analizi tepkimesi BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ve ona ait protokol kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo-7 : DNA dizi Analizi Amplifikasyon Karışımı

H ₂ O	7.5 µl
Dizi Analizi kit karışımı	8 µl
TAÖR-R (10 pmol/µl)	0.5 µl
Saflaştırılmış PZT ürünü	4 µl

Isı 94 °C'ye geldikten sonra tüpler otomatik ısı döngü cihazına yerleştirildi. Başlangıç ayrılma işlemi için 95°C'de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 25 döngü olacak şekilde PZT tepkimesi gerçekleştirildi.

Ayrılma	95°C'de 10 sn	} 25 döngü
Primer bağlanması	50°C'de 5 sn	
Uzama	60°C'de 4dk	

Döngüler tamamlandıktan sonra, DNA dizi analizi tepkimesi sonrası saflaştırma işlemi aşağıda yazılı protokole göre yapıldı:

1-Döngüsel dizi analizi tepkimesi sonrası PZT tüpünün üzerine 2 µl (3mM pH:4.6) NaAc dan eklendi.

2-Üzerine 50 µl % 96'lık etil alkol eklendi.

3-Karışım 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı, hafifçe vurularak karıştırıldı.

4-Buz üzerinde 15 dk bekletildi.

5-Süre sonunda beklemeden 20 dk 13.000 x rpm de santrifüj edildi.

6-Üstte kalan kısım pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

7-Geriye kalan çökelti oda ısısında kurumaya bırakıldı.

8-Üzerine 20 µl formamid eklenerek 0.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.

9-94 °C' de denatürasyon işlemi yapıldıktan sonra -20 °C' de 2 dk bekletildi.

10-Tüpler Otomatik DNA dizi analizi sistemine yerleştirilerek örnekler okutularak analiz edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Verilerin analizi SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, United States) paket programında yapıldı. Sürekli ölçümlü değişkenlerin dağılımının normale uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile araştırıldı. Varyansların homojenliği ise Levene testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ölçümlü değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca (25-75) yüzdeler şeklinde, nominal değişkenler ise olgu sayısı ve (%) olarak gösterildi.

Genotipler ve uygulanan protokoller arasında normal dağılan sürekli ölçümlü değişkenler yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile normal dağılmayan sürekli ölçümlü değişkenler yönünden farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testiyle değerlendirildi. ANOVA veya Kruskal Wallis test

istatistiği sonucunun önemli bulunduğu durumlarda anlamlı farka neden olan grup veya grupları tespit etmek amacıyla sırasıyla; post hoc Tukey veya Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Maturasyon ve dölleme oranı yönünden oluşturulan gruplar arasında piksel yoğunluğu ortalamaları Student's t testi ile çap uzunluğu ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı.

Nominal değişkenler Pearson'un Ki-Kare testi ile kıyaslandı. Referans genotipe göre mutant ve heterozigot gruplarının hastalık riski üzerindeki etkileri Tek Değişkenli Lojistik Regresyon analizi ile değerlendirildi. Referans kategorilere göre riskli kategorilere ilişkin Odds oranı ve %95 Güven Aralıkları hesaplandı. $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Hasta ve kontrol grubunda, gözlenen genotiplerden expectation-maximization algoritmi (EM) ile tahmini haplotip sıklıkları, HAP (Haplotype Resolution version 3.0) programı ile hesaplandı. (Halperin E, Eskin E, 2004).

4. BULGULAR

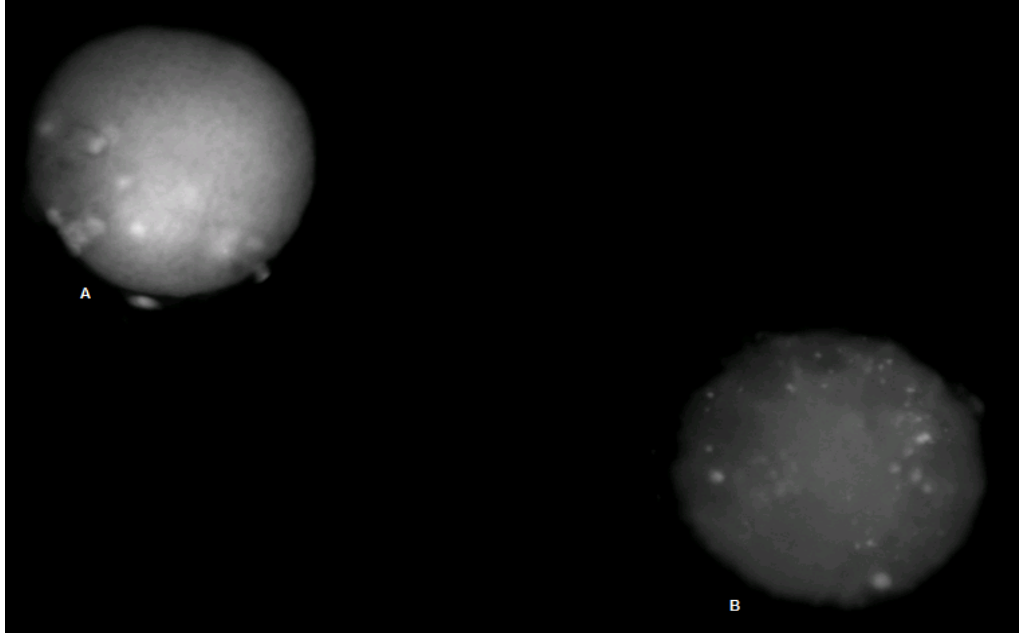
Çalışmamıza Gen-Art Kadın Sağlığı, Tüp Bebek ve Üreme Biyoteknolojisi Merkezi'ne çocuk sahibi olma isteği ile açıklanamayan infertilite öyküsü ile başvuran 104 infertil kadın dahil edildi. İnfertil kadınların eşlerinin sperm parametrelerin normal olması (normospermi), yaşlarının 28-35 arasında olması, menstrual döngünün 2. gününde FSH düzeylerinin ≤ 8 mIU/ml olması şartı ile grup oluşturuldu. Kontrol grubu ise yine aynı yaş grubundan en az bir çocuk sahibi olmuş ve infertilite problemi olmayan 107 kadından oluşturuldu. Her iki gruba da sigara kullanmayan ve herhangi bir ilaç bağımlısı olmayan kadınlar dahil edildi. Çalışmanın ilk bölümünde infertil kadınlardan elde edilen metafaz II aşamasındaki oositler her birinde 26 kadının bulunduğu 4 grupta farklı işlemlere maruz bırakılarak Komet tekniği ile DNA hasarı yönünden incelendi. Diğer taraftan 100 kadından toplanan metafaz II aşamasındaki oositlerden alınan komet ölçümleri ile kadınların IVF siklusunda elde edilen olgunlaşma ve fertilizasyon oranları karşılaştırıldı. Oositlerde komet yöntemi ile DNA hasarı, piksel yoğunluğu ve hücre çapı ölçümleri ile BAB Bs200ProP Image System yazılım programı ile analiz edildi.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise infertil ve kontrol grubundaki kadınlardan 0.5 M EDTA'lı tüpe 2 ml kan örnekleri alındı. Örneklerden özgül primerler kullanılarak, ÖR-1 geninin c.454-397 T>C, c.454-351 A>G polimorfizmlerini ve genin kontrol bölgesindeki TA tekrarlarını içeren bölgeler çoğaltıldı. c.454-397 T>C, c.454-351 A>G polimorfizmlerini içeren bölge *PvuII* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek nükleotid değişiminin olup olmadığı %2'lik agaroz jelde görüntülenerek belirlendi. Polimorfizmlerinin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının doğrulanması amacıyla hasta ve kontrol grubundan rastgele seçilen 20 örneğe DNA dizi analizi tepkimesi uygulandı. ÖR-1 geni kontrol bölgesindeki TA tekrar sayısını belirlemek üzere fragment analizi

tekniki uygulandı. Tekrar sayılarının doğrulanması amacıyla hasta ve kontrol grubundan rastgele seçilen 5 örneğe DNA dizi analizi tepkimesi uygulandı. Tanımlanan polimorfizmler arasında bağlantı yüzdeleri belirlendi. Gözlenen genotiplerden expectation-maximation algoritmi (EM) ile tahmini haplotip sıklıkları hesaplandı.

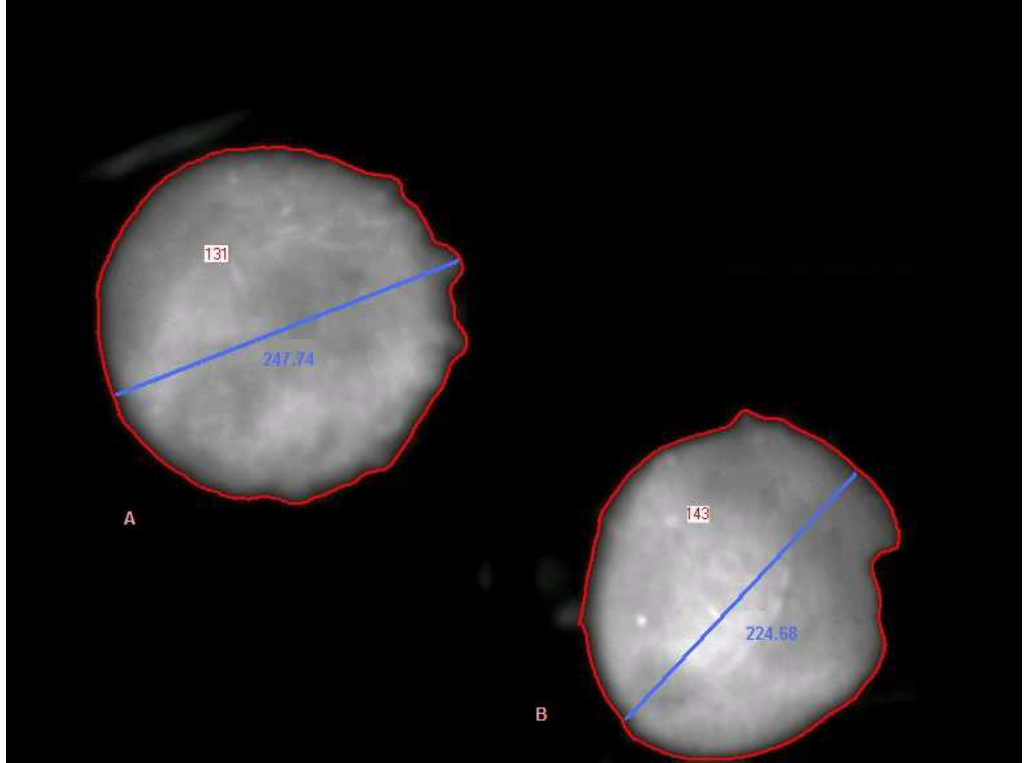
Mikroenjeksiyon ve Piezo Elektrik Uygulanmış İnsan Oositlerinde DNA Hasarının Belirlenmesi

Çalışmamızın ilk bölümünde komet tekniği uygulanarak lizis işlemi ve elektroforez sonrası lamalar UV floresan mikroskopunda 20X büyütme ile analiz edildi. Mikroskopta elde edilen görüntü BMP (Bitmap) formatında kaydedildi. Bs200ProP software programı ile bu görüntüler değerlendirildi (Şekil 7).



Şekil 7: A. Hasarsız bir oosit hücresinin çevresinde hare olmadığı, görüntünün daha keskin olduğu ve hücre çapının daha küçük olduğu görüldü. B. Hasarlı oosit hücresinde ise hare çapının çarpıcı şekilde arttığı gözlemlendi.

DNA hasarını belirlemede ölçüt olarak hücrelerin piksel yoğunluğu ve çap uzunluklarından faydalanıldı (Şekil 8).



Şekil 8: Bs200ProP programı ile hücrelerin sınırları belirlendi, piksel yoğunlukları ve çapları ölçüldü. A. Piksel yoğunluğu: 131; Çap uzunluğu: 247.74 mikron B. Piksel yoğunluğu: 143; Çap uzunluğu: 224.68 mikron.

Yardımcı üreme tekniklerinde kullanılan mikroyenjeksiyon ve piezo elektrik yöntemlerinin oosit hücreleri üzerinde yarattığı DNA hasarını belirlemek üzere çalışma gruplarına ait oositlerde komet analizi yapıldı. Belirlenen piksel yoğunluğu ve çap uzunluğu değerleri 4 grupta karşılaştırıldı (Tablo 8).

Tablo 8. Çalışma grupları için komet analizi sonuçları

	Grup 1 (Olgun oositler)*	Grup 2 (+ICSI)**	Grup 3 (+Piezo)***	Grup 4 (Pozitif kontrol)****	p değeri
Komet ort. değeri (Piksel yoğunluğu) (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	130.4$\pm$39.0^{a,b}	122.4$\pm$30.7^{c,d}	94.4$\pm$34.2^{a,c}	80.3$\pm$24.7^{b,d}	p<0.001^f
Komet ort. değeri (Çap uzunluğu) Ortanca (min-max)%	220.1 (197.90-246.94)	229.5 (222.50-245.08)	248.7 (230.76-257.28)	250.6 (244.63-261.20)	p=0.127 ^e

^a 1.gruba ait oositler ile 3. gruba ait oositlerde ölçülen komet ortalama piksel değeri arasında anlamlı fark bulundu p<0.001

^b 1.gruba ait oositler ile 4. gruba ait oositlerde ölçülen komet ortalama piksel değeri arasında anlamlı fark bulundu p<0.001

^c 2.gruba ait oositler ile 3. gruba ait oositlerde ölçülen komet ortalama piksel değeri arasında anlamlı fark bulundu p=0.014

^d 2.gruba ait oositler ile 4. gruba ait oositlerde ölçülen komet ortalama piksel değeri arasında anlamlı fark bulundu p<0.001

^e Grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

^f Grupların karşılaştırılmasında Anova testi kullanılmıştır.

*Grup1: Metafaz II aşamasında olgun oositlerden oluşmaktadır.

**Grup2: ICSI işlemi uygulanmış oositlerden oluşmaktadır.

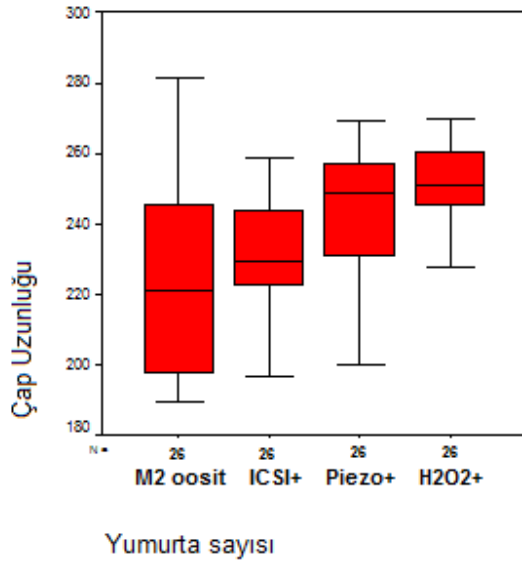
***Grup3: Piezo işlemi uygulanmış oositlerden oluşmaktadır.

****Grup4: Hidrojen peroksit maruz bırakılan oositlerden oluşmaktadır.

Çalışmada komet tekniği ile oosit hasarı belirlemede kriter olarak piksel yoğunluğu ve çap uzunluğu ölçümleri değerlendirildi. Verilere göre ortalama piksel yoğunluğu normal bir dağılım göstermekte olup çap uzunluğu ile paralel sonuçlar sergilemektedir. Çalışma gruplarına ait oositlerde çap uzunluğu cinsinden fark belirlenmedi ancak piksel yoğunlukları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşıldı. Foliküllerden aspirasyon edilmesinden sonra herhangi bir işleme tabi tutulmayan oositlerde (Grup 1) DNA fragmentasyonunun daha az olduğu, diğer gruplara göre yüksek piksel yoğunluğu ve düşük çap uzunluğunun olması ile göze çarpmaktadır. İstatistiksel olarak da 1. grubu oluşturan olgun oositlerde elde edilen yüksek komet piksel yoğunluğu değeri ile Grup 3 ve Grup 4 oositlerinde belirlenen düşük komet değerleri arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

Yine aynı ölçümler göz önünde bulundurulduğunda, Grup 1 ile karşılaştırıldığında mikroyenjeksiyon yapılan oositlerde (Grup 2) daha az olmak üzere piezo elektrik uygulanan oositlerde (Grup 3) daha fazla DNA fragmentasyonunun olduğu belirlendi. Beklenildiği gibi 100µM hidrojen peroksit maruz bırakılan oositlerde (Grup 4) diğer üç gruba oranla belirgin derecede yüksek DNA fragmentasyonuna rastlandı. İzlenilen bu farkların bir kısmı istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. Mikroyenjeksiyon yapılan oositler ile (Grup 2) ve piezo elektrik uygulanmış oositlerde (Grup 3) ölçülen komet ortalama piksel yoğunlukları arasında fark olduğu belirlendi ($p=0.014$). Grup 3 ve pozitif kontrol olarak kullanılan ve hidrojen peroksit maruz bırakılmış oosit grubunda da (Grup 4) komet ortalama piksel yoğunlukları cinsinden fark elde edildi ($p<0.001$).

DNA hasarı belirlemede ikinci bir kriter olarak ele alınan çap uzunluğu ölçümlerinde istatistiksel olarak bir anlam elde edilemese de Grafik 2’de gösterildiği gibi bir bağlantı gözlenmektedir. Buna göre olgun oositler ve ICSI yapılmış oositler birlikte bir grup, piezo elektrik uygulanmış oositler ile pozitif kontrol oositleri ise diğer bir grup gibi dağılım göstermişlerdir. Bu iki grup birbirlerine üstünlük sağlamaktadır.



Grafik 2: Komet ölçümlerinden çap uzunluğuna göre oosit gruplarının karşılaştırılması

Oosit hücrelerinde DNA fragmentasyonunun IVF’te fertilizasyon oranlarına etkisini incelemek amacıyla Metafaz II aşamasındaki oositlere komet analizi yapıldı. Çalışmanın 1 grubunda yer alan kadınlar ile birlikte toplam 100 infertil kadından toplanan Metafaz II aşamasında olan oositlerinden 1 veya 2’şer tanesi çalışmanın bu bölümü için ayrıldı. Bu oositlere komet tekniği uygulandı. Oosit komet ölçümleri ile kadınların tüp bebek siklusunda elde edilen olgunlaşma ve fertilizasyon oranları kıyaslandı (Tablo 9 ve Tablo 10). Bu oranlar değerlendirilirken kontrol olarak aynı yaş grubu ve IVF endikasyonu için literatürde yer alan olgunlaşma ve fertilizasyon

oranları kullanıldı. Buna göre metafaz II aşamasına ulaşmış oositlerin toplam oosit sayısına oranı yaklaşık %81 olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, fertilizasyon oranı da yaklaşık %71 olarak bildirilmiştir ¹⁰².

Tablo 9: Komet ölçümlerinin olgunlaşma oranları ile kıyaslanması

	%81>	%81≤	<i>p değeri</i>
Komet ortalama piksel yoğunluğu (Ortalama ±Std Sapma)	114.7±33.0	120.1±27.2	0.378 ^a
Komet ortalama çap uzunluğu (Ortanca (min-max)%)	228.8 (209.06-251.28)	228.4 (200.86-250.08)	0.678 ^b

^a Grupların karşılaştırılmasında Student *t* testi kullanılmıştır.

^b Grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Tablo 10: Komet ölçümlerinin fertilizasyon oranları ile kıyaslanması

	%71>	%71≤	<i>p değeri</i>
Komet ortalama piksel yoğunluğu (Ortalama ±Std Sapma)	111.4±34.1	121,3±26.5	0.120 ^a
Komet ortalama çap uzunluğu (Ortanca (min-max)%)	237.7 (217.96-251.28)	223.2 (200.45-250.08)	0.131 ^b

^a Grupların karşılaştırılmasında Student *t* testi kullanılmıştır.

^b Grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

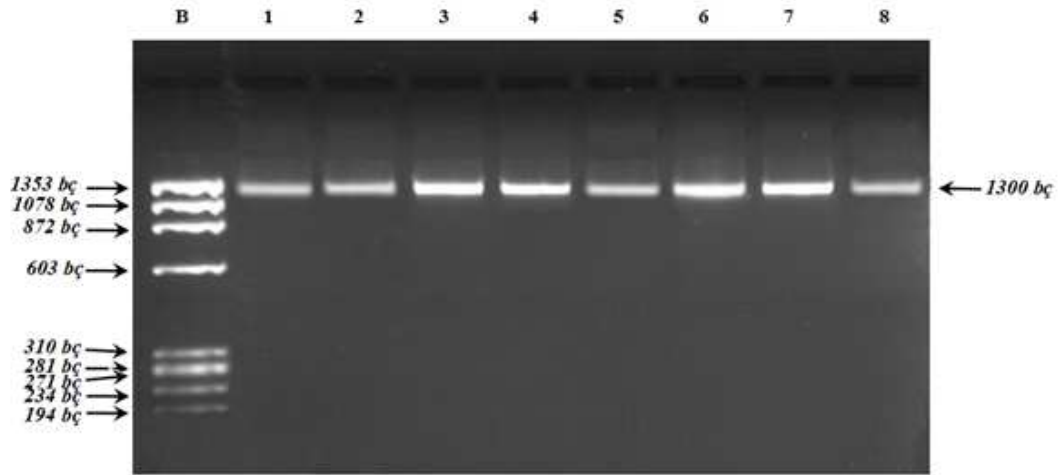
Bu oranlar referans olarak alındığında ve oositlerde belirlenen hasar ölçüm değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir

sonuç elde edilememiştir. Ancak olgunlaşma ve fertilizasyon oranları referans değerlerinin üzerinde olan gruplarda düşük çap uzunluğunun ve yüksek piksel yoğunluğunun olması dikkat çekmektedir.

Östrojen Reseptör Gen Polimorfizmlerinin Fertilizasyon Üzerine Etkisi

Çalışmamızın ikinci bölümünü, östrojen reseptör polimorfizmlerinin infertil ve fertil grupları arasındaki karşılaştırması ve klinik parametreler üzerine etkisi ile ilgili edilen bulgular oluşturmaktadır.

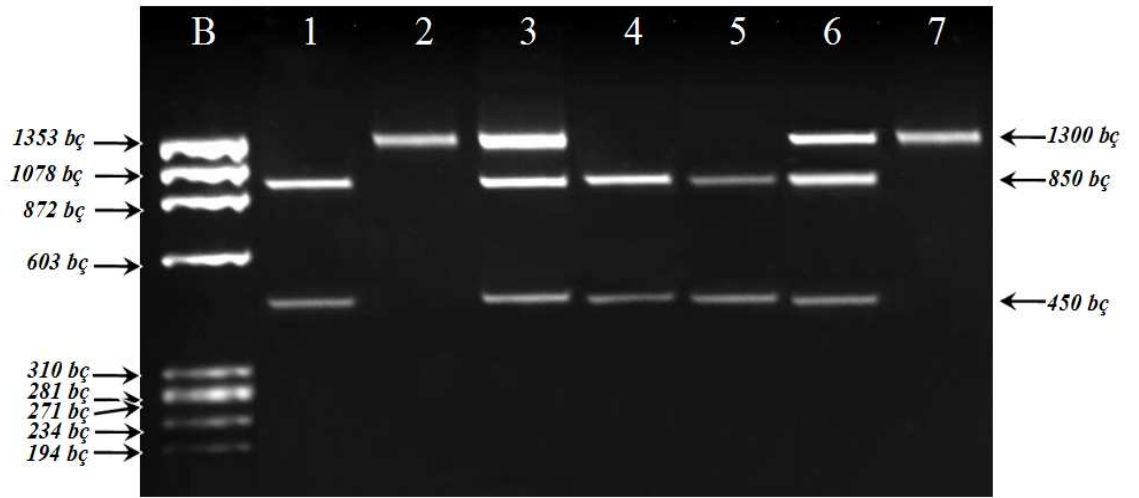
104 infertil ve 107 kontrole ait PZT ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmlerini içeren 1300 baz çifti uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 9).



Şekil 9: c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmlerini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1300 bp'lik bantlar gözlenmektedir) B: ϕ X174 moleküler ağırlık belirteci, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 no'lu kuyular - PZT ürünleri.

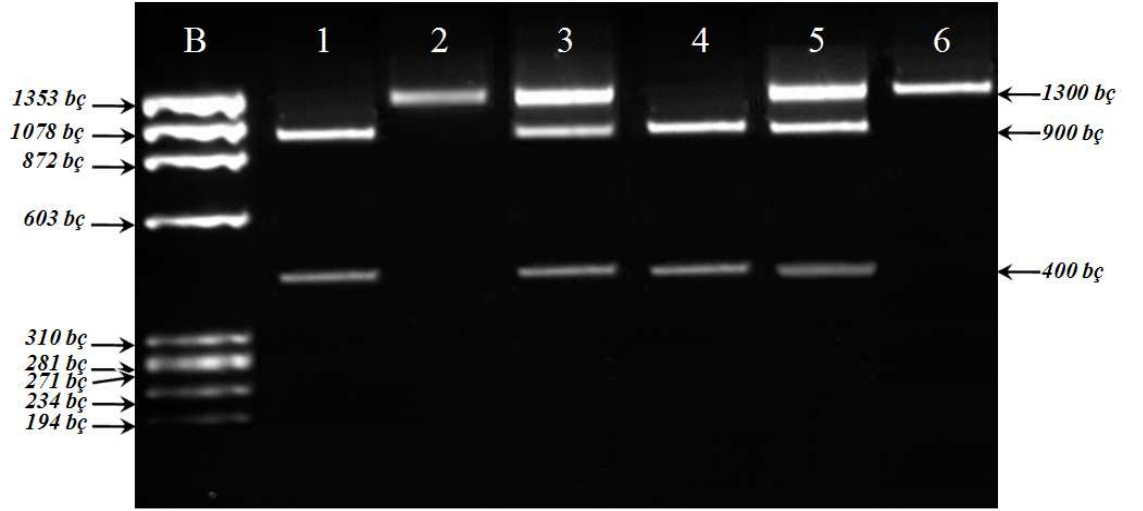
c.454-397 T>C polimorfizmini ve bireylerin bu polimorfizmler yönünden genotiplerini belirlemek için PZT ürünleri *PvuII* restriksiyon enzimi

ile kesime bırakıldı. Kesim ürünleri %2' lik agaroz jelde ϕ X174 moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 40 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü ve Şekil 10' daki jel görüntüleri elde edildi.



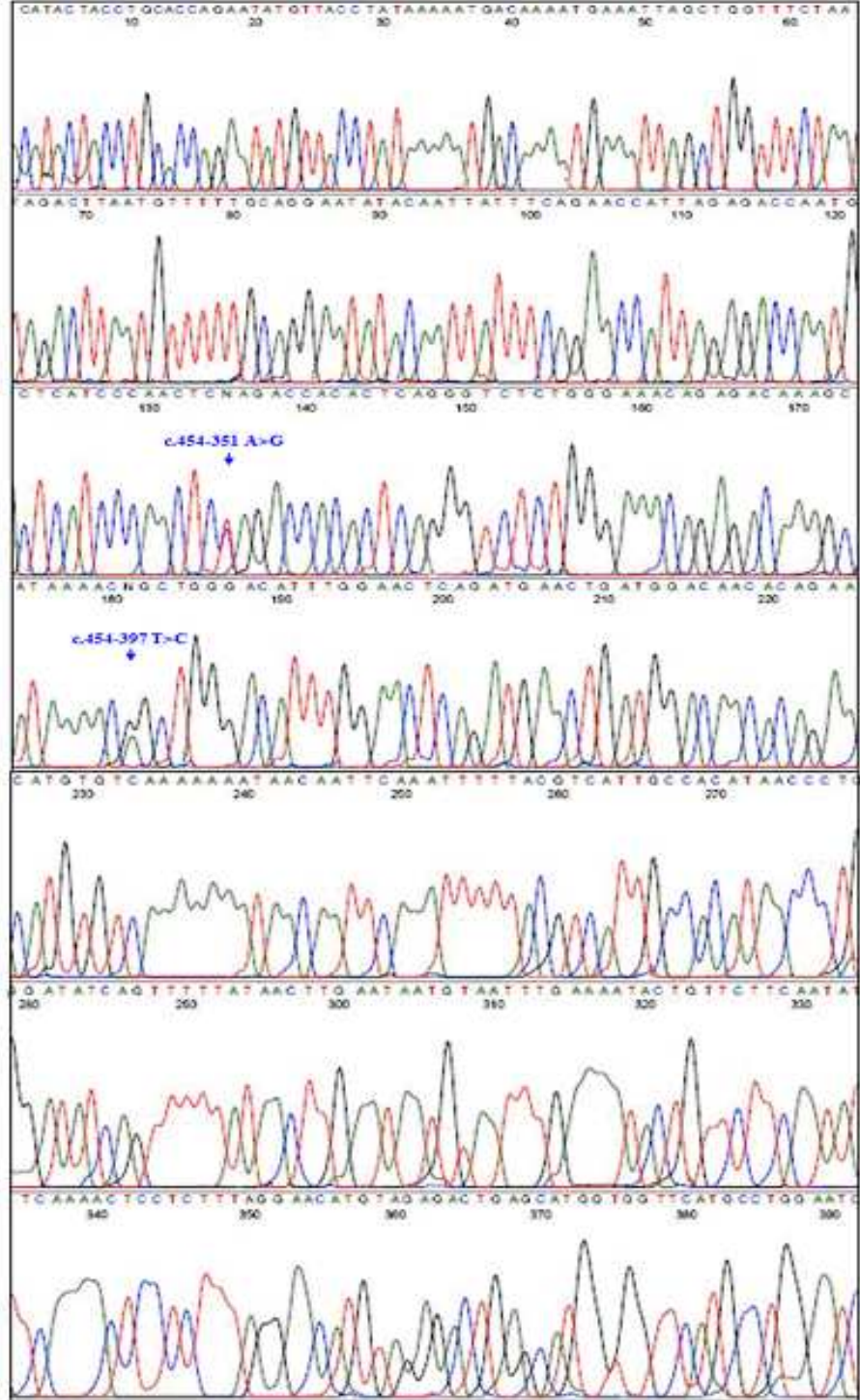
Şekil 10: c.454-397 T>C polimorfimi için PZT sonrası ürünlerin kesim sonuçları için elde edilen jel görüntüsü B: ϕ X174 moleküler ağırlık belirteci, 1, 4, 5. kuyular: pp genotipi, 3 ve 6. kuyular: Pp genotipi, 2. kuyu: PP genotipi, 7. kuyu: Kesim yapılmamış PZT ürünü

c.454-351 A>G polimorfizmini ve bireylerin bu polimorfizmler yönünden genotiplerini belirlemek için PZT ürünleri *Xba*I restriksiyon enzimi ile kesime bırakıldı. Kesim ürünleri %2' lik agaroz jelde ϕ X174 moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 40 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü ve Şekil 11' deki jel görüntüleri elde edildi.



Şekil 11: c.454-351 A>G polimorfimi için PZT sonrası ürünlerin kesim sonuçları için elde edilen jel görüntüsü B: ϕ X174 moleküler ağırlık belirteci, 1 ve 4. kuyular: xx genotipi, 3 ve 5. kuyular: Xx genotipi, 2. kuyu: XX genotipi, 6. kuyu: Kesim yapılmamış PZT ürünü

ÖR-1 geni, c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmlerinin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının doğrulanması amacıyla hasta ve kontrol grubundan rastgele seçilen 20 örneğe DNA dizi analizi tepkimesi uygulandı (Şekil 12).



Şekil 12: ÖR-1 geni c.454-397 T>C polimorfizmi için Pp ve c.454-351 A>G polimorfizmi için Xx genotipine sahip bireyin dizi analizi görüntüsü.

Çalışmamızda, ÖR-1 geninde tanımlanan c.454-397 T>C polimorfizmi incelendiğinde hasta ve kontrol grubu verilerinin Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu belirlenmiştir ($p > 0.05$). İnfertil grupta 28 bireyde PP genotipi (%26.9), 50 bireyde Pp genotipi (%48.1), 26 bireyde pp genotipi (%25) belirlenirken, kontrol grubunda 53 bireyde PP genotipi (%49.5), 42 bireyde Pp genotipi (%39.3), 12 bireyde pp genotipi (%11.2) olarak bulundu (Tablo 8). İnfertil grubunda P alleli görülme sıklığı %51, p alleli görülme sıklığı %49 iken, kontrol grubunda P alleli görülme sıklığı %69.2 ve p alleli görülme sıklığı %30.8 olarak belirlendi (Tablo 11).

Tablo 11: İnfertil kadınlarda ve kontrollerde ÖR-1 geninin c.454-397 T>C polimorfizminin genotip ve allel dağılımı

	Kontrol n= 107		İnfertil N=104		p değeri	OO (%95 GA)	p^a değeri
Genotipler	N	(%)	N	(%)			
<i>Pvull</i>					p<0.001		
PP	53	49.5	28	26.9		1 ^b	
Pp	42	39.3	50	48.1		2.25 (1.22-4.17)	0.010
pp	12	11.2	26	25		4.10 (1.80-9.34)	p<0.001
Alleller							
P	148	69.2	106	51.0		1 ^b	
p	66	30.8	102	49.0		2.16 (1.45-3.21)	p<0.001

OO, Olasılıklar Oranı; CI, Güvenlik Aralığı.

^a Grupların karşılaştırılmasında χ^2 testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar koyu renktedir.

^b Referans genotip/allel.

ÖR-1 geninin c.454-397 T>C polimorfizminin genotip dağılımları karşılaştırıldığında, infertil ve kontrol kadınları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark elde edilmiştir ($p < 0.001$). Buna göre söz konusu farka neden olan durumu p alleli yaratmaktadır ($p < 0.001$). PP genotipli bireyler ile karşılaştırıldığında Pp genotipli bireylerde 2 kat, pp genotipli bireylerde ise 4 kat risk artışı belirlenmiştir. Bununla beraber, ÖR-1 geninde tanımlanan

c.454-397 T>C polimorfizminde p alleleline sahip olanların infertilite riskinin P alleleline sahip olanlara göre 2 kat arttığı bulunmuştur (Tablo 11).

ÖR-1 geninde tanımlanan c.454-351 A>G polimorfizmi incelendiğinde, hasta ve kontrol grubu verilerinin Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu belirlenmiştir ($p > 0.05$). İnfertil grupta 36 bireyde XX genotipi (%34.6), 50 bireyde Xx genotipi (%48.1), 18 bireyde xx genotipi (%17.3) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 54 bireyde XX genotipi (%50.5), 49 bireyde Xx genotipi (%45.8), 4 bireyde xx genotipi (%3.7) olarak bulundu. İnfertil grubunda X alleli görülme sıklığı %58.7, x alleli görülme sıklığı %41.3 iken, kontrol grubunda X alleli görülme sıklığı %73.4 ve x alleli görülme sıklığı %26.6 olarak belirlendi (Tablo 12).

ÖR-1 geninin c.454-351 A>G polimorfizminin genotip dağılımları karşılaştırıldığında, infertil ve kontrol grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p=0.002$). Söz konusu farka neden olan allel x alleli olup ($p<0.001$), xx genotipinin belirgin bir şekilde fark oluşturduğu dikkat çekmektedir ($p<0.001$). Ayrıca, ÖR-1 geninde tanımlanan c.454-351 A>G polimorfizminde x alleleline sahip olanların infertilite riskinin X alleleline sahip olanlara göre yaklaşık 2 kat arttığı gözlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 12: İnfertil kadınlarda ve kontrollerde ÖR-1 geninin c.454-351 A>G polimorfizminin genotip ve allel dağılımı

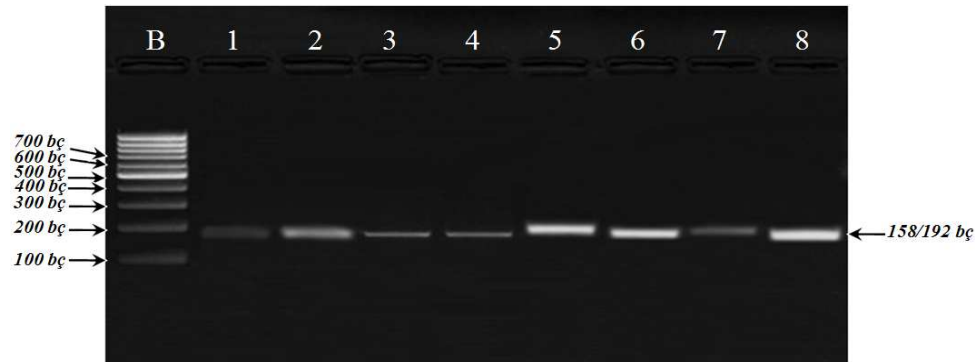
	Kontrol n= 107		İnfertil n=104		p değeri	OO (%95 GA)	p ^a değeri
Genotipler	N	(%)	N	(%)			
<i>Xba</i> I					0.002		
XX	54	50.5	36	34.6		1 ^b	
Xx	49	45.8	50	48.1		1.53 (0.86-2.73)	0.148
xx	4	3.7	18	17.3		6.75 (2.11-21.59)	p<0.001
Alleller							
X	157	73.4	122	58.7		1 ^b	
x	57	26.6	86	41.3		1.94 (1.29-2.93)	p<0.001

OO, Olasılıklar Oranı; CI, Güvenlik Aralığı.

^a Grupların karşılaştırılmasında χ^2 testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar koyu renktedir.

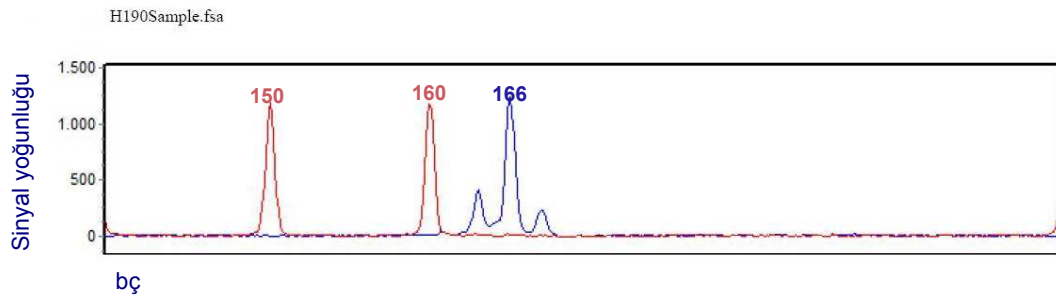
^b Referans genotip/allel.

ÖR-1 geni kontrol bölgesi TA dinükleotid tekrarlarının PZT sonuçlarını değerlendirme amaçlı 104 infertil ve 107 kontrole ait PZT ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. TA polimorfizmini içeren (158-192) baz çifti arasına karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 13).

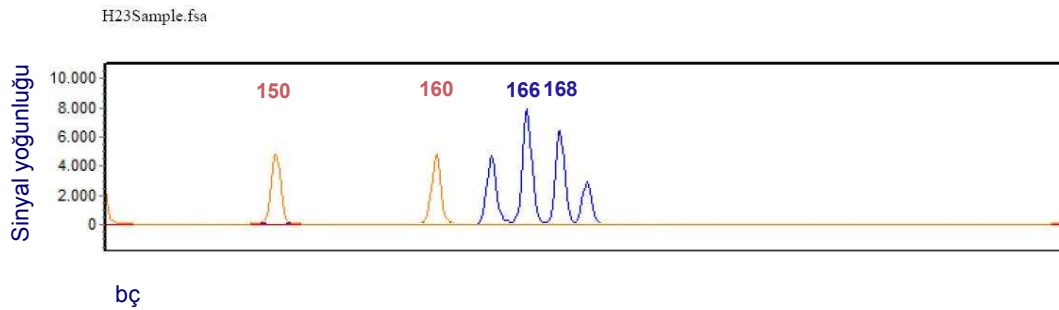


Şekil 13: TA tekrar polimorfizmini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (158-192 bp'lik bantlar gözlenmektedir) B: 100 bp'lik moleküler ağırlık belirteci, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 no'lu kuyular - PZT ürünleri.

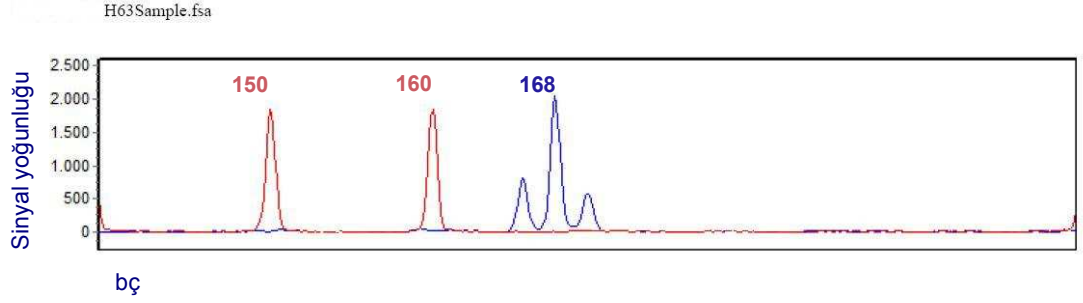
Fragment analizi yöntemi ile her bir bireye ait TA tekrar sayıları belirlendi. Hasta ve kontrol grubunda en fazla gözlenen genotipler örnek olarak seçilerek (Şekil 14-25) arasında gösterildi.



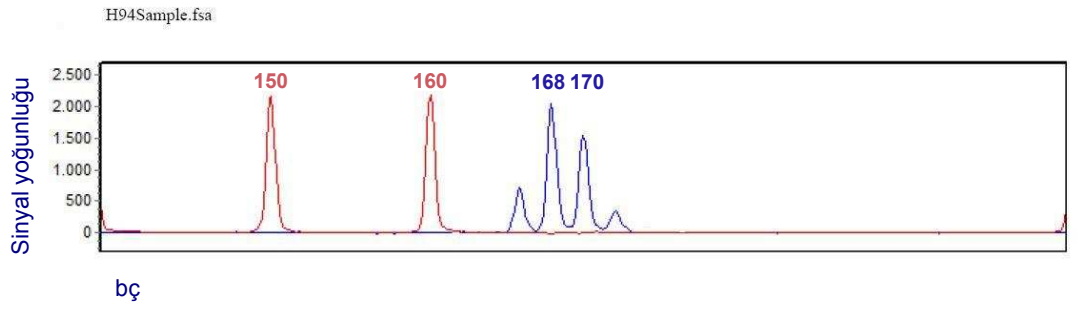
Şekil 14: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 12/12 TA tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



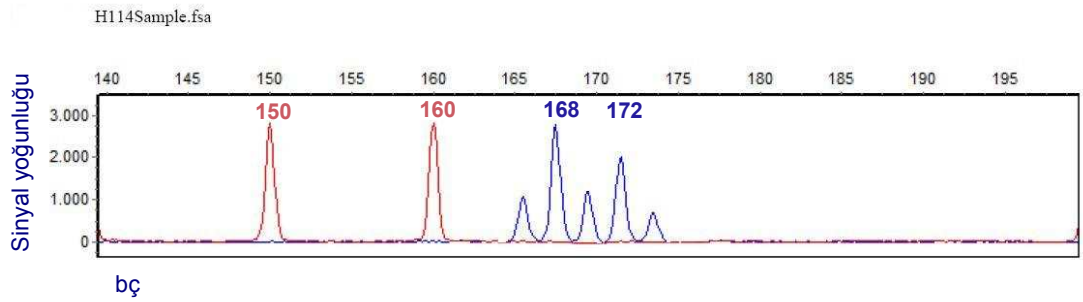
Şekil 15: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 12/13 TA tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



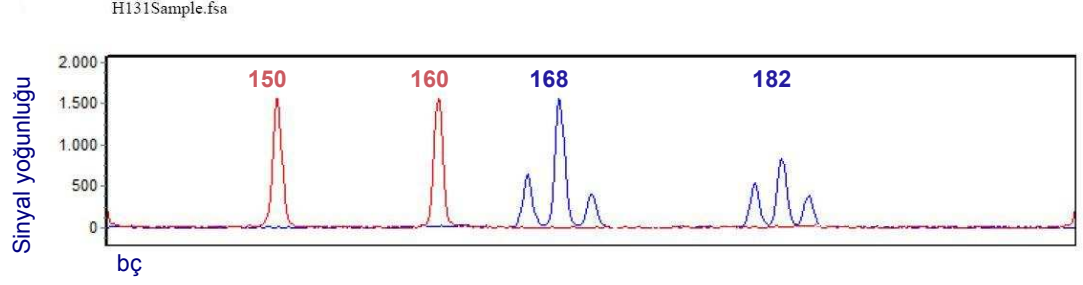
Şekil 16: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/13 TA tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



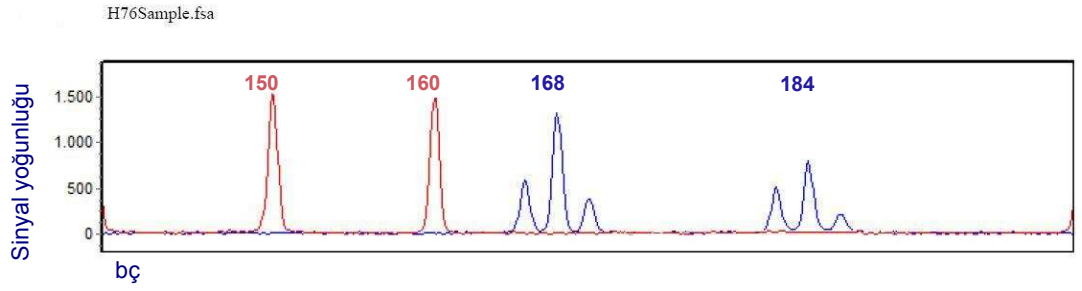
Şekil 17: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/14 TA tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



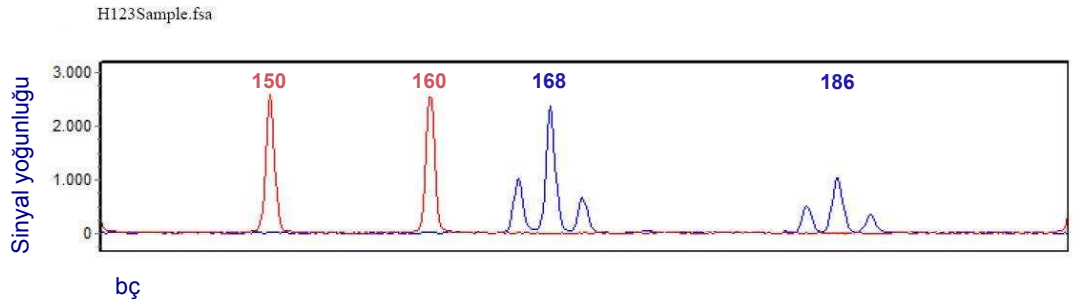
Şekil 18: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/15 TA tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



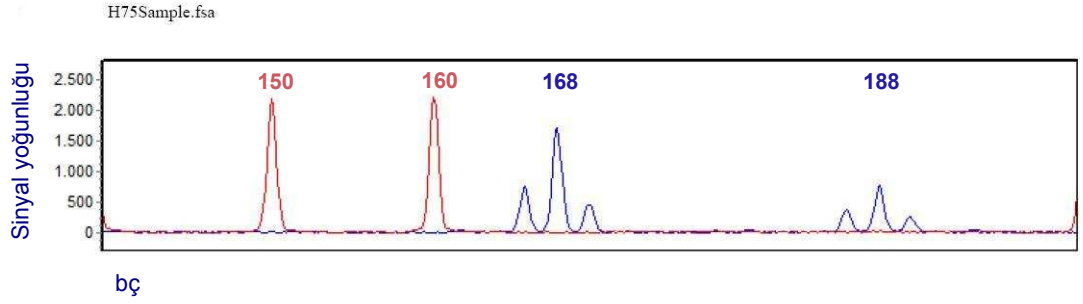
Şekil 19: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/20 TA tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



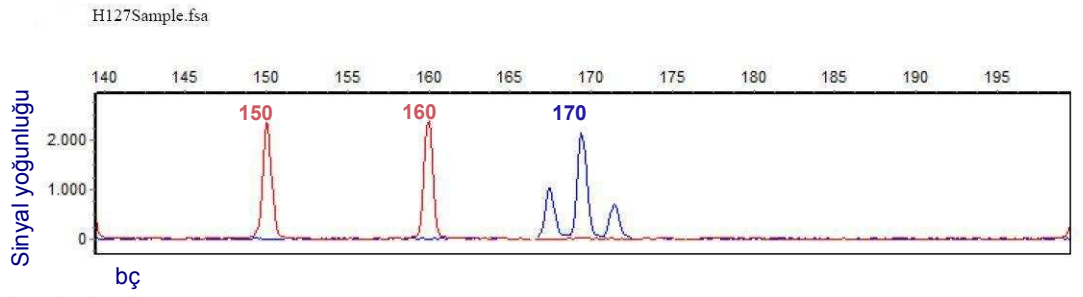
Şekil 20: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/21 TA tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



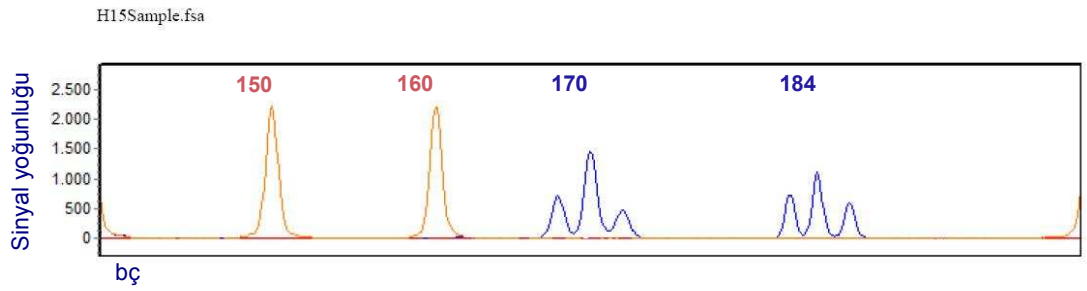
Şekil 21: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/22 TA tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



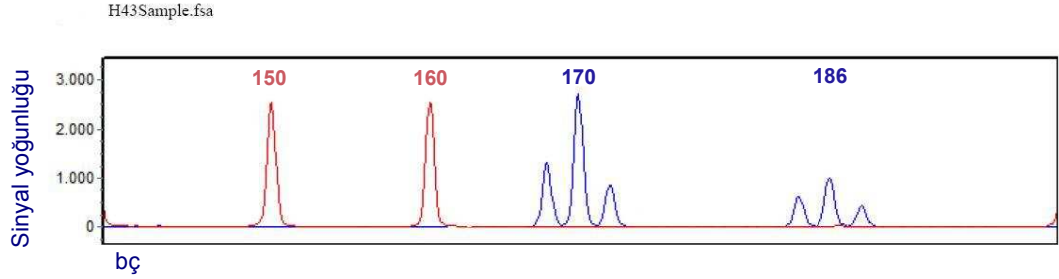
Şekil 22: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/23 TA tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



Şekil 23: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 14/14 TA tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.

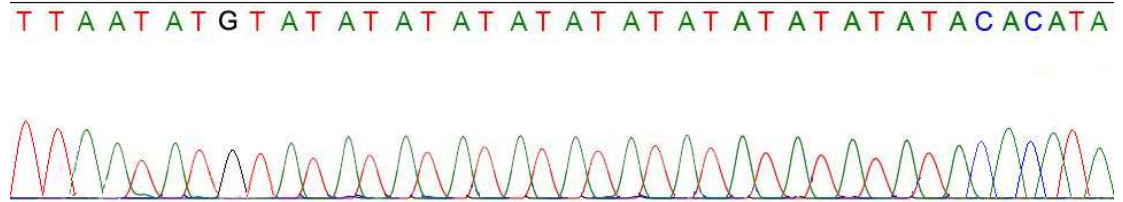


Şekil 24: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 14/21 TA tekrar sayısına sahip sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



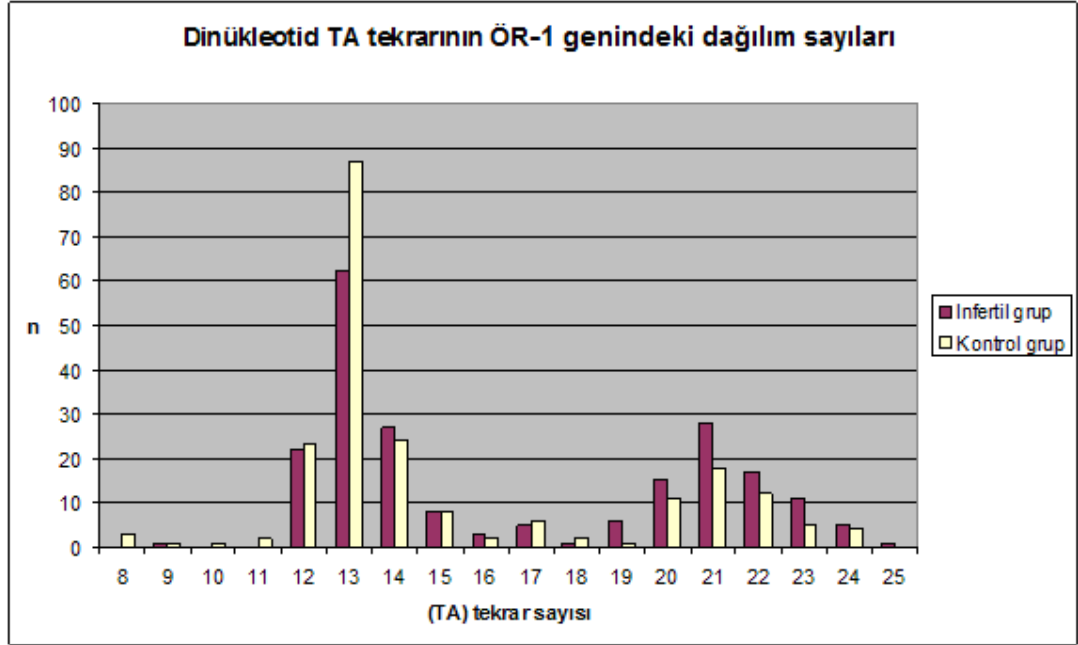
Şekil 25: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 14/22 TA tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.

Fragment analizi yöntemi ile tekrar sayıları belirlenen örneklerden aynı tekrar sayısına sahip 5 bireyin sonuçları DNA analizi yöntemi ile doğrulandı (Şekil 26).



Şekil 26: ÖR-1 geni kontrol bölgesinde 13/13 TA tekrar sayısına sahip bireyin dizi analizi görüntüsü.

İnfertil ve kontrol grubundaki ÖR-1 geni TA mikrosatellit tekrarları allel dağılımı Şekil 28 'de gösterilmiştir. ÖR-1 geni TA tekrar polimorfizmleri için 8 ve 25 arasında farklı allel sayıları izlenmiştir. Allel sayıları bimodal dağılım göstermekte olup, 18 TA tekrarı önceki çalışmalarda olduğu gibi referans kırılma noktası olarak dikkate alınmıştır^{103,104,105}. Buna göre tekrar sayıları 18 ve üstü olan alleller uzun, 18'den düşük olan alleller ise kısa olarak değerlendirilmeye alınmıştır.



Şekil 27: İnfertil ve kontrol grubundaki ÖR-1 geni TA mikrosatellit tekrarları için allel dağılımı

TA tekrar polimorfizmi kontrol grubu genotip dağılımları Hardy-Weinberg eşitliğine uygunken ($p > 0.05$), hasta grubunda sapma gözlenmiştir ($p < 0.05$). İnfertil kadınlarda homozigot kısa ve uzun genotipler sırasıyla %33.7 (KK) ve %18.3 (UU) oranında, heterozigot genotip ise % 48.1 (UK) oranında belirlenmiştir. Kontrol grubunda yer alan kadınlarda ise genotip yüzdeleri sırasıyla %54.2 (KK), % 38.3 (UU), % 7.5 (UK) olarak bulunmuştur (Tablo 13). İnfertil grubunda K alleli görülme sıklığı %57.7, U alleli görülme sıklığı %42.3 iken, kontrol grubunda K alleli görülme sıklığı %73.4 ve U alleli görülme sıklığı %26.6 olarak belirlendi.

Tablo 13. İnfertil kadınlarda ve kontrollerde ÖR-1 geninin TA dinükleotid tekrarı mikrosatellit polimorfizminin dağılımı

	Kontrol N= 107		İnfertil N=104		p değeri	OO (%95 GA)	p ^a değeri
Genotipler	N	(%)	N	(%)			
<i>TA tekrarları</i>					0.004		
KK	58	54.2	35	33.7		1 ^b	
UK	41	38.3	50	48.1		2.02 (1.12-3.64)	0.019
UU	8	7.5	19	18.3		3.94 (1.56-9.94)	0.004
Alleller							
K	157	73.4	120	57.7		1 ^b	
U	57	26.6	88	42.3		2.02 (1.34-3.04)	p<0.001

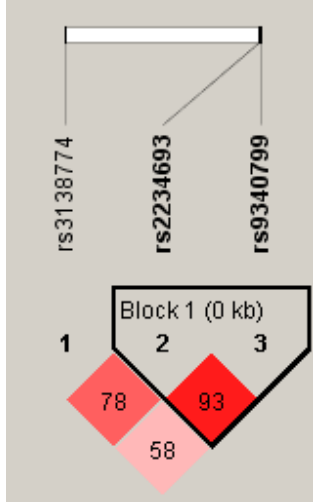
OO, Olasılıklar Oranı; CI, Güvenlik Aralığı.

^a Grupların karşılaştırılmasında χ^2 testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar koyu renktedir.

^b Referans genotip/allel.

ÖR-1 geninin TA dinükleotid tekrarı mikrosatellit polimorfizminin genotip dağılımları karşılaştırıldığında, infertil ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlendi ($p=0.004$). Söz konusu farka neden olan allel uzun alleldir ($p<0.001$). Ayrıca, uzun tekrar sayısı içeren allele sahip bireylerin infertilite riskinin kısa tekrar sayısı içeren allele sahip olanlara göre 2 kat arttığı gözlemlendi (Tablo 13).

ÖR-1 geninde tanımlanan üç polimorfizm arasındaki bağlantı yüzdeleri Şekil 28 de gösterildi. Haploview programı kullanılarak yapılan hesaplamalarda; TA tekrar polimorfizmi ve c.454-397 T>C polimorfizmleri arasında %78 oranında, TA tekrar polimorfizmi ve c.454-351 A>G polimorfizmleri arasında %58 oranında ve c.454-397 T>C polimorfizmi ve c.454-351 A>G polimorfizmleri arasında %93 oranında bağlantı olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre, sadece c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmleri arasında haplotip analizi yapılabileceği ve TA tekrar polimorfizminin analiz dışı bırakılması kullanılan program tarafından önerildi.



Şekil 28: ÖR-1 geninde tanımlanan genomdaki yerleşim sıralarıyla TA, C.454-397 T>C ve C.454-351 A>G polimorfizmleri arasındaki bağlantı yüzdeleri.

Bu sonuçlara göre, haplotiplerin kontrol ve hasta grubundaki tahmini sıklıkları hesaplandı. Hasta ve kontrol grubunda (PX, px, pX, Px) olmak üzere 4 haplotip belirlendi. (Tablo 14). Kontrol grubunda en sık görülen haplotip PX temel alınarak, diğer haplotiplerin herbirine ait infertilite riski hesaplandı. Px haplotipine sahip bireyler PX haplotipli bireyler ile karşılaştırıldığında infertilite riskinin 2 kat arttığı gözlemlendi. Ancak, diğer haplotiplerde ise yatkınlık belirlenmedi (Tablo 14).

Tablo 14 c.454-397 T>C ve c.454-351 A>G polimorfizmlerinin kontrol ve hasta grubundaki haplotip sıklıkları

Haplotip	Kontrol (2n= 214) (%)	İnfertil (2n= 208) (%)	OO (%95 GA)	<i>p</i> ^a değeri
PX	145 (67.8)	104 (50.0)	1 ^b	
Px	54 (25.2)	84 (40.4)	2.17 (1.42-3.32)	0.0001
pX	12 (5.6)	18 (8.7)	2.09 (0.97-4.53)	0.057
px	3 (1.4)	2 (0.9)	0.93 (0.15-5.66)	1.000

OO, Olasılıklar Oranı; CI, Güvenlik Aralığı.

^a Grupların karşılaştırılmasında χ^2 testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar koyu renktedir.

^b Referans haplotip.

İnfertil grubundaki üç polimorfizme ait östrojen reseptör genotiplerinin IVF parametreleri ile karşılaştırıldığı veriler Tablo 15, 16 ve 17’de gösterilmiştir.

ÖR-1 geninin c.454-397 T>C bölgesinin polimorfik dağılımları ile IVF klinik parametreleri karşılaştırıldığında genotipler arasında olgunlaşma oranı, embriyo sayısı ve fertilizasyon oranı yönünden istatistiksel olarak anlam gözlendi. Embriyo sayısı yönünden incelendiğinde PP genotipli bireye göre pp genotipli bireyde istatistiksel olarak düşük sayıda embriyo sayısı görülmesi farka neden olmaktadır ($p=0.003$). Olgunlaşma oranları yönünden her üç genotip birbiriyle kıyaslandığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.001$). PP genotipinde en yüksek olmak üzere olgunlaşma oranları Pp ve pp genotiplerinde sırasıyla azaldığı gözlendi ($p<0.001$). Fertilizasyon oranları da aynı yönde dağılım göstermekte olup her üç genotipte de anlamlı fark sergilemektedir. PP ve Pp aynı zamanda PP ve pp genotipler karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulundu ($p<0.001$) (Tablo 15).

ÖR-1 geninin c.454-351 A>G bölgesinin polimorfik dağılımları ile IVF klinik parametreleri karşılaştırıldığında genotipler arasında folikül:oosit oranı, olgunlaşma oranı, embriyo sayısı ve fertilizasyon oranları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi. Folikül:oosit oranı gruplar arasında karşılaştırıldığında heterozigot bireylerde bu oranın düşük olduğu

Tablo 15: İnfertil grubundaki c.454-397T>C polimorfizmine ait östrojen reseptör genotiplerinin IVF parametreleri ile karşılaştırılması

	PP* (n=28)	Pp* (n=50)	pp* (n=26)	p değeri
Folikül sayısı (Ortalama ±Std Sapma)	18.5 (15.25-23.00)	19.0 (15.00-23.25)	19.0 (16.00-25.00)	0.579 ^a
Toplanan oosit sayısı (Ortalama ±Std Sapma)	18.5 (14.00-22.00)	17.5 (15.00-22.25)	19.0 (15.00-22.25)	0.812 ^a
Folikül:oosit oranı (Ortalama ±Std Sapma)	1.1 (1.00-1.14)	1.0 (1.00-1.06)	1.1 (1.00-1.12)	0.073 ^a
Olgun oosit sayısı (Ortalama ±Std Sapma)	16.5 (12.25- 20.00)	16.0 (12.00- 21.00)	14.5 (10.75- 19.25)	0.305 ^a
Olgunlaşma oranı (%) (Ortalama ±Std Sapma)	94.0 (87.09- 100.00)^c	93.5(86.76- 96.03)^d	82.0 (63.38- 89.83)^{c,d}	p<0.001^a
Döllenen oosit sayısı (Ortanca (min-max)%)	13.5 ± 3.8^e	11.9 ± 4.3	9.4 ± 4.7^e	p<0.001^b
Fertilizasyon oranı (%) (Ortalama ±Std Sapma)	86.6 (72.1-94.02)^{f,g}	71.0 (59.58-81.25)^f	60.0 (48.86-75.48)^g	p<0.001^a

^a Grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

^b Grupların karşılaştırılmasında Anova testi kullanılmıştır.

^c PP genotipi ile pp genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

^d Pp genotipi ile pp genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

^e PP genotipi ile pp genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p=0.002

^f PP genotipi ile Pp genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

^g PP genotipi ile pp genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

*Pvull enziminin kesim bölgesinin olması p aleli, kesim bölgesinin olmaması ise P aleli olarak isimlendirilmektedir. Toplumda görülebilecek genotipler PP, Pp ve pp şeklindedir.

gözlendi. XX ile Xx ve Xx ile xx genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p= 0.031$ ve $p= 0.010$). Olgunlaşma oranları değerlendirildiğinde XX ile xx genotipleri, Xx ile xx genotipleri birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$ ve $p=0.028$). Embriyo sayısı yönünden ise özellikle XX ve xx genotipleri arasında fark gözlenmiş olup ($p<0.001$) xx genotipinde döllen embriyo sayısının belirgin şekilde düşüş gösterdiği izlendi ($p<0.001$). Fertilizasyon oranları yönünden XX ile Xx, XX ile de xx genotipi arasında fark elde edildi ($p<0.001$) (Tablo 16).

ÖR-1 geni kontrol bölgesinde yer alan TA mikrosatellit polimorfizmlerinin IVF parametreleri ile karşılaştırması yapıldığında özellikle embriyo sayısı yönünden farklı olduğu görüldü. Buna göre, her iki allelinde uzun tekrar sayısına sahip UU genotipli bireyler, hem her iki allelinde kısa tekrar sayısına sahip KK genotipli bireylerle ($p<0.001$) hem de bir uzun bir kısa tekrar sayısına sahip UK genotipli bireylerle ($p=0.017$) karşılaştırıldığında dölenen oosit sayısının istatistiksel olarak daha az olduğu belirlendi. Fertilizasyon oranları incelendiğinde ise her üç genotip birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında fark olduğu gözlendi ($p<0.001$). (KK ile UK genotipi için $p= 0.011$, KK ile UU genotipi için $p<0.001$ ve UK ile UU genotipi için $p= 0.013$). Fertilizasyon oranının KK genotipinde en yüksek, UK genotipinde daha düşük ve UU genotipinde en düşük olduğu dikkat çekmektedir (Tablo 17).

Tablo 16: İnfertil grubundaki c.454-351A>G polimorfizmine ait östrojen reseptör genotiplerinin IVF parametreleri ile karşılaştırılması

	XX* (n=36)	Xx* (n=50)	xx* (n=18)	p değeri
Folikül sayısı (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	18.5 (16.00-23.75)	19.0 (15.00-24.00)	19.0 (16.00-23.25)	0.972 ^a
Toplanan oosit sayısı (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	18.0 (15.00-22.00)	17.5 (15.00-23.00)	18.5 (15.00-22.00)	0.938 ^a
Folikül:oosit oranı (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	1.1 (1.00-1.14)^c	1.0 (1.00-1.05)^{c,d}	1.1 (1.00-1.12)^d	0.026^a
Olgun oosit sayısı (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	17.0 (13.00- 20.00)	16.00 (11.75- 20.25)	13.5 (10.00- 19.25)	0.222 ^a
Olgunlaşma oranı (%) (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	94.3 (87.84- 100.00)^e	91.7 (80.75- 95.50)^f	86.5 (65.00- 91.39)^{e,f}	p<0.001^a
Döllenen oosit sayısı (Ortanca (min-max)%)	13.6 $\pm$ 3.8^g	11.4 $\pm$ 4.4	8.9 $\pm$ 4.7^g	p<0.001^b
Fertilizasyon oranı (%) (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	84.0 (72.61-94.36)^{h,i}	68.8 (59.58-78.33)^h	59.5 (39.78-79.56)ⁱ	p<0.001^a

^a Grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

^b Grupların karşılaştırılmasında Anova testi kullanılmıştır.

^c XX genotipi ile Xx genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p= 0.031

^d Xx genotipi ile xx genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p= 0.010

^e XX genotipi ile xx genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

^f Xx genotipi ile xx genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p= 0.028

^g XX genotipi ile xx genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

^h XX genotipi ile Xx genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

ⁱ XX genotipi ile xx genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

*Xbal enziminin kesim bölgesinin olması x aleli, kesim bölgesinin olmaması ise X aleli olarak isimlendirilmektedir. Toplumda görülebilecek genotipler XX, Xx ve xx şeklindedir.

Tablo 17: İnfertil grubundaki TA dinükleotid tekrar polimorfizmine ait ÖR genotiplerinin IVF parametreleri ile karşılaştırılması

	KK (n=35)	KU (n=50)	UU (n=19)	p değeri
Folikül sayısı (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	18.0 (15.00-24.00)	19.5 (16.00-23.00)	19.0 (15.00-24.00)	0.894 ^a
Toplanan oosit sayısı (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	17.0 (14.00-23.00)	18.0 (16.00-22.25)	19.0 (14.00-22.00)	0.836 ^a
Folikül:oosit oranı (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	1.0 (1.00-1.12)	1.0 (1.00-1.07)	1.1 (1.00-1.09)	0.451 ^a
Olgun oosit sayısı (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	16.0 (12.00- 21.00)	16.0 (12.75- 20.00)	14.0 (10.00- 20.00)	0.417 ^a
Olgunlaşma oranı (%) (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	92.9 (83.33- 95.55)	92.5 (85.80- 95.59)	86.4 (66.67- 92.86)	0.075 ^a
Döllenen oosit sayısı (Ortanca (min-max)%)	13.1 $\pm$ 4.3^c	11.9 $\pm$ 4.3^d	8.7 $\pm$ 4.3^{c,d}	p<0.001^b
Fertilizasyon oranı (%) (Ortalama $\pm$ Std Sapma)	80.0 (70.00-92.85)^{e,f}	71.1 (60.00-81.53) ^{e,g}	58.8 (40.00-71.43) ^{d,f,g}	p<0.001^a

^a Grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

^b Grupların karşılaştırılmasında Anova testi kullanılmıştır.

^c KK genotipi ile UU genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

^d UK genotipi ile UU genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p=0.017

^e KK genotipi ile UK genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p= 0.011

^f KK genotipi ile UU genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p<0.001

^g UK genotipi ile UU genotipi karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmuştur p= 0.013

* ÖR-1 geninin kontrol bölgesinde yer alan TA tekrarının 18 ve üstünde olması U alleli, 18'in altında olması K alleli olarak isimlendirilmektedir. Toplumda görülebilecek genotipler UU, UK ve KK şeklindedir.

Bulgularımız, insan oositlerinde DNA hasarını belirlemede kullandığımız Komet tekniğinin piksel yoğunluğu cinsinden sonuçları bize herhangi bir işlem uygulanmamış oositlerde (Grup 1) DNA fragmentasyonunun düşük olduğunu, piezo elektrik tekniği uygulanmış oositlerde daha fazla olmak üzere hidrojen peroksit uygulanmış oositlerde en fazla olduğunu göstermektedir. Araştırdığımız östrojen reseptör gen polimorfizmlerin genotip dağılımlarının infertil ve kontrol grupları arasında farklı olduğu izlenmektedir. c.454-397 T>C polimorfizmi için PP genotipli kadınlar ile karşılaştırıldığında Pp genotiplilerde 2 kat, pp genotiplilerde ise 4 kat risk artışı gözlenmektedir. c.454-351 A>G polimorfizmi için ise x alleleline sahip olanların infertilite riskini X alleleline sahip olanlara göre yaklaşık 2 kat arttırdığı göze çarpmaktadır. Kontrol bölgesindeki TA tekrar sayılarının fazla olması da infertilite riskini 2 kat arttırmaktadır. Olgunlaşma oranları, döllenmiş oosit sayısı ve fertilizasyon oranlarının pp ve xx genotiplerine sahip kadınlarda belirgin oranda düşük olduğu, Xx genotipli kadınlarda folikül:oosit oranının en düşük olduğu gözlenmektedir. Genin kontrol bölgesinde uzun TA tekrarının düşük döllenmiş oosit sayısı ve fertilizasyon oranı ile ilişkili olduğu izlenmektedir.

5. TARTIŞMA

İlk tüp bebek Louise Brown'un 30 yıl önce doğumundan bugüne kadar IVF teknikleri ile 3 milyonu aşkın bebek dünyaya geldi. ESHRE'nin (European Society of Human Reproduction and Embryology = Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Birliği) 2002'deki yıllık konferansında sunulan rapora göre o yıl içinde 200 bin tüp bebek dünyaya gelmiştir. Bu rakam 1989 yılında toplanan ve dünya çapındaki ilk veri olan bildiriye göre 30 bin tüp bebeğin dünyaya geldiği düşünüldüğünde IVF yöntemlerine duyulan gereksinim ortaya çıkmaktadır. Dünya üzerindeki her 6 çiftten birinin infertilite problemi vardır¹⁰⁶. Dondurma çözme işlemi yapılmamış, taze embriyolarla yapılan transferler sonucu elde edilen gebelik oranı genel ortalama olarak %25.1, doğum oranı ise %18.5 olarak verilmektedir. Ancak bu oranların ülkelere göre dağılımı gebelik için %13.6 ile %40.5 arasında ve doğum için %9.1 ile %37.1 arasında değişmektedir. Teknolojik ilerlemeler, daha yüksek gebelik ve doğum oranlarını sağlamak üzere IVF tekniklerinin geliştirilmesi için yoğunlaştırılmıştır. Öncelikli hedef gebelik ve doğum oranlarının artırılması olup bu amaçla gamet hücrelerinin embriyo oluşturma potansiyelini çoğaltmaya yönelik olgunlaşma ve fertilizasyon oranlarının artırılması oldukça önem taşımaktadır.

Özellikle fertilizasyon bozukluğuna gamet hücrelerinde DNA hasarının neden olabileceği olasılığı doğrultusunda bugüne kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Ancak bu konu üzerinde sadece sperm DNA bütünlüğü araştırılmış, oositte oluşan DNA hasarının fertilizasyon üzerine etkisi incelenmemiştir. Aynı şekilde literatürde DNA hasarı ile oosit olgunlaşması

karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda, DNA hasarının oosit olgunlaşması ve fertilizasyonu üzerine etkileri incelenmiş aynı zamanda tüp bebek tedavilerinde uygulanan tekniklerin oositlerde DNA hasarı oluşturma olasılığı araştırılmıştır.

Çalışmamızda uyguladığımız komet tekniğinin orijinali ilk olarak beyaz kan hücreleri için uygulanmıştır^{34,35,107,108}. Daha sonra 2001 yılında Chan ve arkadaşları bu yöntemi geliştirerek hamster oositleri için uygulamışlardır⁵⁸. Bu çalışmada oosit komet tekniği yardımcı üreme tekniklerinde kullanılan malzemelerin kalite kontrolünde fare tek hücre embriyo biyoassay yöntemine alternatif bir teknik olarak gösterilmiş ve daha hızlı ve efektif bir teknik olması gibi üstünlüklerine dikkat çekilmiştir. Çalışmamızda bu tekniği değiştirerek insan oositlerinde DNA hasarını belirlemede kullandık. Komet tekniğinin orijinalinde canlı hücreler mini agaroz jel içerisine süspanse edilmektedir. Oosit komet tekniğinde ise cam lamin üzerine oositler kuru olarak fikse edilir ve üzerine mini agaroz jel yayılır. Komet tekniğinde genellikle komet kuyruğu, komet momentumu veya sperm kafası gibi çekirdek DNA'sının yoğunluğu analiz edilir¹⁰⁹. Bu çalışmada oosit DNA'sındaki hasar piksel yoğunluğu ve çap uzunluğu ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Chan ve arkadaşlarının fare tek hücre embriyo biyolojik testi ile doğruladığı bu ölçümlere göre DNA fragmentasyonu arttıkça DNA hasarı artmakta ve bu durumda gözlenen piksel yoğunluğu azalmaktadır. Bunun yanı sıra hücrenin çap uzunluğu artmaktadır⁵⁸.

Çalışmamızda infertil kadınlardan elde edilen metafaz II aşamasındaki oositlere, her birinde 26 kadının bulunduğu 4 grupta farklı uygulamalar yapıldı ve komet tekniği uygulanarak DNA hasarı yönünden incelendi. Diğer taraftan 100 kadından toplanan metafaz II aşamasındaki oositlerden alınan komet ölçümleri ile kadınların IVF siklusunda elde edilen olgunlaşma ve fertilizasyon oranları karşılaştırıldı. Bu şekilde hem yardımcı üreme tekniklerinde uygulanan bazı tekniklerin oosit DNA'sı üzerine etkileri araştırıldı hem de oositte DNA hasarının oosit olgunlaşma ve fertilizasyon üzerindeki etkileri incelendi.

Çalışma bulgularımıza göre ortalama piksel yoğunluğu normal bir dağılım gösterirken çap uzunluğu ile paralel sonuçlar sergilemektedir. Çalışma gruplarına ait oositlerde çap uzunluğu cinsinden fark gözlenmese de piksel yoğunluğu cinsinden istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşıldı. Foliküllerden aspirasyon sonrası herhangi bir işleme tabi tutulmayan oositlerde (Grup 1) DNA fragmentasyonunun daha az olduğu, diğer gruplara göre yüksek piksel yoğunluğu ve düşük çap uzunluğunun olduğu belirlendi.

Yine aynı ölçümler göz önünde bulundurularak negatif kontrol olarak birinci grup ile karşılaştırıldığında mikroyenjeksiyon yapılan oositlerde (Grup 2) daha az olmak üzere piezo elektrik uygulanan oositlerde (Grup 3) daha fazla DNA fragmentasyonunun olduğu belirlendi. Pozitif kontrol olarak ele alınan ve 100µM hidrojen peroksit 1.5 saat süreyle maruz bırakılan oositlerde (Grup 4) diğer üç gruba oranla belirgin derecede yüksek DNA fragmentasyonuna rastlandı.

Oosit hücrelerinde DNA fragmentasyonunun IVF'te olgunlaşma ve fertilizasyon oranlarına etkisini incelemek amacıyla 100 infertil kadından toplanan Metafaz II aşamasındaki oositlere uyguladığımız komet sonuçları değerlendirilirken kontrol olarak literatürde yer alan olgunlaşma ve fertilizasyon oranları kullanıldı. Buna göre metafaz II aşamasına ulaşmış oositlerin toplam oosit sayısına oranı yaklaşık %81, fertilizasyon oranı da yaklaşık %71 olarak rapor edilmiştir¹⁰². Bu oranlar referans olarak alındığında ve oositlerde belirlenen hasar ölçüm değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Ancak olgunlaşma ve fertilizasyon oranları referans değerlerinin üstünde olan gruplarda, düşük çap uzunluğunun ve yüksek piksel yoğunluğunun olması dikkat çekmektedir.

Bugüne kadar insan oositlerinde DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili olarak literatürde benzer bir çalışmanın bulunmaması çalışmamızı değerli kılmaktadır. Ancak elde ettiğimiz bulguların desteklenmesi ve geliştirilmesi için bu konuda şüphesiz daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Otuz seneye yakın bir zamandır uygulanan ve infertil çiftlerin umudu ve kimi zaman tek şansı olan tüp bebek tedavilerinde uygulanan bazı yöntemlerin insan oositlerinde DNA hasarı oluşturma olasılığına karşın toplumun bu tedavilere bakış açısını değiştirmesi beklenemez. Ancak çalışmamızda istatistiksel olarak da anlamlı bulduğumuz sonuçlar, üreme genetiğine önemli katkı sağlayacak ve yardımcı üreme tedavilerinin ortaya çıkartabileceği bazı olumsuzlukların giderilmesi veya azaltılması amaçlı gelecekte yapılacak çalışmalara ve yeni yöntemlerin geliştirilmesine ışık tutabilecektir. Elde ettiğimiz bulguların yeni çalışmalar ile zenginleştirilmesi

ve tüp bebek tedavilerinin başarı ölçütü olarak nitelendirilen gebelik ve eve sağlıklı bebek götürme oranları ile karşılaştırılması şüphesiz atılması gereken önemli bir adım olacaktır. Çalışmamızda olgunlaşma ve fertilizasyon oranları ile DNA hasarı arasında her ne kadar istatistiksel bir anlam bulamamış olsak da bu konuda daha detaylı ve daha geniş çalışma grubuna sahip çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bulgularımız ile birlikte göz önünde bulundurularak araştırılması gereken diğer bir konu ise oositlerde çok erken evrede başlayan, fertilizasyon ve implantasyon aşamasında bile devam eden DNA onarım mekanizmasının işleyişidir. Yardımcı üreme teknikleri sırasında oluşabilecek DNA hasarlarının ne kadarının nasıl onarıldığının anlaşılması oldukça önemlidir.

Literatürde, yardımcı üreme tekniklerinden bağımsız olarak farklı gelişim aşamalarındaki oositlerde pek çok nedenle oluşabilen DNA hasarını inceleyen çalışmalar bulunmaktadır^{110,111,112,113}. Oositlerin mayoza girişinden fertilizasyon aşamasına kadar olan sürecin oldukça uzun olması maternal genomda DNA hasarı olma olasılığını güçlendirmektedir. Bunun aksine sperm ile kalıtılan genomda oluşabilecek DNA hasarı spermatogenez sırasında gerçekleşebilen mutajenik olaylar ile açıklanmaktadır¹¹⁴. Spermatogenezle karşılaştırıldığında oogenez aşamasında mutasyon oranları daha düşüktür¹¹⁵. Fetal gelişim sırasında primer oositin meydana gelişinde yaklaşık 20 mitotik bölünme gerçekleşmektedir¹¹⁶. Erkek pre-mayotik germ hücreleri ise spermatogonyumun mayotik profaz aşamasına ulaşmasına kadar çok fazla sayıda mitotik bölünmeden geçerler¹¹⁷. Oosit ve

spermde DNA hasarı, gametlerin DNA'yı değiştiren ajanlara maruz kalması gibi pek çok faktör sonucu meydana gelebilir. Bu sebeple gelişen embriyoda mutasyon yükünün en aza indirilmesi için gametlerden köken alan DNA hasarı, zigotta DNA replikasyonunun ilk turunda onarılmalıdır.

Oogenez sırasında gerçekleşen DNA onarımını konu alan az çalışma bulunmaktadır. Zheng ve arkadaşları DNA hasarına duyarlı 48 genin ifadenme şemasını incelemişler, bu genlerin hücre döngüsünde duraksamaya sebep olup rhesus maymun oositlerinde ve erken embriyoda DNA hasarını onardıklarını belirlemişlerdir¹¹⁸.

Yardımcı üreme tedavileri sürecinde oositlerde gerçekleşen DNA onarımını konu alan bir çalışmada, DNA hasarı yaratılan sperm ile fertilize olmuş preimplantasyon embriyolarında tek hücre aşamasından itibaren DNA onarım genlerinin ifadenmesinin değiştiği belirtilmiştir¹¹⁹. Bir başka çalışma da hasarlı DNA ya sahip sperm ile mikroenjeksiyon yapılan insan oositinde fertilizasyon sonrası onarım mekanizmasının işlediği ve bu onarımın, blastokist oluşumu, implantasyon ve sağlıklı gebelik oluşumu için yeterli olduğu görülmüştür¹²⁰. Farklı DNA hasar yanıt yolaklarında görev alan pek çok DNA onarım geninin, post-implantasyon aşamasında da ifadelendiği rapor edilmiştir¹²¹.

Yeni fertilize olmuş preimplantasyon embriyosunda gerçekleşen DNA onarımı, ovulasyon sonrası oositte depolanan maternal mRNA'lar ve proteinlere dayanmaktadır. DNA onarım genlerinin memeli gelişiminin erken dönemlerinde ifadelendiği gösterilmiştir. Oositin onarım için

yeterli ekipmanı yoksa veya zigotik gen ifadenmesi doğru zamanda başlamıyorsa embriyonun ölmesi kaçınılmazdır¹²². Buna göre meydana gelebilecek DNA hasarlarının onarım mekanizması ile giderilememesi halinde embriyo canlılığını yitirecek ve fetal gelişim gerçekleşmediği için infertil hastalar patolojik sonuçlar ile karşı karşıya gelmeyecektir. Ancak yetersiz ve eksik onarım olması halinde, uzun vadeli patolojilerin meydana gelebilme olasılığı son dönemde rapor edilen bulgular arasındadır^{120,123}.

Sonuç olarak, insan oositlerinde DNA hasarının belirlenmesinin yanı sıra bir o kadar da memeli oosit ve embriyosunun hasarlı DNA' ya yanıtı ve onarımı ile ilgili yapılacak çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu şekilde hücrelerin onarım kapasitesinin ne olduğu daha iyi anlaşılacaktır. Embriyonik gelişiminin erken aşamalarında DNA onarım genlerinin rolleri ve ifadenme zamanlamaları ile ilgili az veri bulunmaktadır. İnsan embriyolarının *in vitro*da kültür edilmesinin ve yardımcı üreme tekniklerinin DNA onarımında görev alan genlerin ifadenmelerini nasıl etkilediği çok iyi bilinmemektedir. Dolayısıyla preimplantasyon embriyolarının kültür ortamında DNA onarımını düzenleme yeteneklerini ne zaman ve nasıl değiştirdiklerini bilmek, meydana gelebilecek hasarların üstesinden gelme ve üreme genetiğinde ve yardımcı üreme tekniklerinde yeni ve gelişmiş yöntemler üretmede çok önemlidir.

Tüp bebek tedavilerinde öncelikli hedef gebelik ve doğum oranlarının artırılması olup bu amaçla gamet hücrelerinin embriyo oluşturma potansiyelini çoğaltmaya yönelik olgunlaşma ve fertilizasyon oranlarının artırılması oldukça önem taşımaktadır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda

bu oranlara etki edebilecek faktörlere odaklanılmaktadır. Bu konuyla ilgili çeşitli gen polimorfizmleri ile ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. Özellikle ÖR α 'yı kodlayan ÖR-1 geni ile ilgili çalışmalar başta olmak üzere bu genin polimorfizmlerini ortaya koyan çalışmalar gündemdedir⁹⁰. Bu çalışmalar özellikle bizim de çalışmamıza dahil ettiğimiz c.454-397 T>C, c.454-351 A>G ve kontrol bölgesinde yer alan TA tekrar polimorfizmlerini kapsamaktadır.

IVF; foliküllerin uyarılması, olgun foliküllerin aspire edilmesi, oositlerin toplanması, oositlerin sperm ile birleştirilmesi ve döllenmiş embriyoların rahim içerisine yerleştirilmesi işlemlerini içermektedir. Her ne kadar her hastaya aynı protokoller uygulansa da hastaların foliküler yanıtı birbirinden farklılık göstermektedir. Tüp bebek tedavisinin başarısında pek çok faktör rol oynamaktadır. Bu faktörlerin de en çok foliküler büyümeye, steroidogenez ve oositlerin olgunlaşmasına etki ettiği bilinmektedir¹²⁴.

Yardımcı üreme tekniklerinde bugüne kadar östrojen reseptör polimorfizmlerinin gelişen folikül sayısı, oosit kalitesi ve olgunluğu, fertilizasyon ve gebelik oranlarına etkisi incelenmiş, bu polimorfizmlerin, ovaryumların uyarılması sonucu foliküllerin kalitesine ve dolayısıyla implantasyona etkili olabileceğine dikkat çekilmiştir⁹⁰. Bir diğer grup tarafından yapılan çalışmada östrojen hormonunun işlevinin oosit sitoplazmasının ve oolemma olgunlaşması için gerekli olduğu belirlenmiştir¹²⁵. Olgun oositlerde fertilizasyon oranının yüksek olduğu¹²⁶ ve östrojenden yoksun foliküllerde düşük kalitede oositler elde edildiği gözlenmiştir¹²⁷.

FSH, foliküllerin gelişiminde çok önemli rol almaktadır. Granuloza hücrelerinin proliferasyonu, androjenlerin östrojene aromatize edilmesi, FSH reseptörlerinin çoğalması ve LH reseptörlerin tetiklenmesi gibi görevler üstlenmektedir. Diğer taraftan östrojen de lokal bir düzenleyici rolü üstlenmektedir. FSH etkisini güçlendirme, granuloza hücrelerinin proliferasyonunu tetikleme ve östrojen ve FSH reseptör sayısını arttırmada etkilidirler. Dolayısıyla östrojen ve FSH birlikte ovaryumda bir sinerji içerisinde granuloza hücrelerindeki FSH reseptör sayısını arttırarak folikül gelişimini ve olgunlaşmasını sağlamaktadır⁶². Östrojenin granuloza hücre işlevi üzerine doğrudan etkisi bulunmaktadır. Oositlerin olgunlaşmasından sorumlu olup optimal oosit sitoplazması ve oolemma olgunlaşması için gereklidir¹²⁸.

ÖR-1 genindeki genetik varyasyonlar, fetal dönemden yetişkin döneme kadar büyüme ve farklılaşmada östrojenlerin farklı yanıtlarına yol açabilmektedir. Östrojen varyasyonları aynı zamanda üreme hayatı boyunca germ hücrelerinin azalma hızında çeşitliliğe neden olmaktadır⁹².

Daha çok farklı endikasyonlara bağlı infertilite olgularında ÖR-1 geninde tanımlanan polimorfizmler çalışılmıştır. Ancak, gerek bu gende tanımlanan polimorfizmlerin farklı populasyonlarda farklı sıklıklar göstermesi gerekse çalışma grubunun genişletilmesine gereksinim duyulması sebebiyle bu tez çalışmasında IVF olgularındaki ÖR-1 geninde tanımlanan üç polimorfizmin sıklığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, ÖR-1 geninde tanımlanmış olan c.454-397 T>C, c.454-351 A>G ve TA tekrar

polimorfizmlerinin olgunlaşma ve fertilizasyon başarısı üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Önceki çalışmalarda infertil ve kontrol grupları arasında c.454-397 T>C polimorfizmi için herhangi bir fark bulunamamış olup ^{62,92} ancak ortalama olgun oosit sayısında ve folikül:oosit oranında anlamlı fark elde edilmiştir⁹⁰. Tez çalışmamızda infertil ve fertil kadınlar c.454-397 T>C polimorfizm sıklıkları açısından karşılaştırılmış ve gruplar arasında anlamlı fark elde edilmiştir. c.454-397 T>C polimorfizmi için gruplar arası farka neden olan etkenin p allelinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Önceki çalışmalar ile çalışmamızın bulguları arasındaki farklılıkların etnik köken, çalışılan birey sayısı gibi çalışmaların tasarımındaki farklılıktan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Sundarajan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada c.454-397 T>C polimorfizmlerinin ÖR-1 geninin düzenlenmesinde özellikle östrojen hormonunun etki ve işlevinde etkili olduğu rapor edilmiştir. Bu etkinin polimorfizmin şiddetine göre folikül ve oosit sayılarına da yansıdığına dikkat çekilmiştir. c.454-397 T>C polimorfizminin folikül ve oosit sayıları ile pozitif ilişkisini belirleyen çalışmalarda PP genotipli kadınlarda pp genotiplilere oranla daha fazla sayıda folikül geliştiği (p=0.033) ve istatistiksel olarak anlam bulunamasa da belirgin şekilde daha yüksek sayıda oosit toplandığı belirtilmiştir ^{62,90}. Polimorfizmlerin folikül ve oosit sayıları üzerindeki belirgin etkisini, hastalara birbirinden farklı stimülasyon protokolü uygulamaları ile açıklamışlardır. Estonya popülasyonunda da P alleli için homozigot özellik gösteren tüp bebek hastalarında ortalama folikül:oosit oranından yola

ıkarak folikül kalitesinin yüksek olduğu sonucuna varılmıřtır⁹². Bizim alışmamızda c.454-397 T>C polimorfizminin ne oosit ve folikül sayılarına ne de folikül:oosit oranları üzerinde net bir etkisi belirlenememiştir. Ancak alışmamızda döllenen oosit sayısı incelendiğinde PP genotipli kadınlarda heterozigot ve pp genotipli kadınlara göre anlamlı şekilde yüksek embriyo sayısı elde edildiği belirlenmiştir. Bu bağlantı daha önce Sundarrajan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada embriyo sayıları ile c.454-397 T>C polimorfizmi arasında belirlenen ilişki ile uyumludur.

Literatürde  strojen reseptör geni polimorfizmleri ile tüp bebek tedavisinde elde edilen olgunlaşma ve fertilizasyon oranlarının karşılaştırılması ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Ancak  nceki çalışmalar ortalama olgun oosit sayısının ve embriyo sayısının özellikle c.454-397 T>C polimorfizmi ile bağlantısını istatistiksel olarak vurgulamış ve olgunlaşma, fertilizasyon oranlarına etkili olabileceğine^{62,90} ve hatta gebelik oranlarına da etkili olduğuna dikkat ekmiřlerdir⁶². Folikül büyüklüğünün de östrojen işlevini dolayısıyla c.454-397 T>C polimorfizminin varlığı ile doğrudan bağlantısını belirleyen Sundarajan ve arkadaşları polimorfizm olan gruplarda fertilizasyon ve gebelik oranlarının polimorfizm olmayan gruba oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Tüp bebek tedavisi gören ve pp genotipine sahip kadınlarda gebelik oranlarının yüksek olduğu gösterilmiştir ^{62,92}. Bizim alışmamızda c.454-397 T>C polimorfizminin hem olgunlaşma hem fertilizasyon oranları üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular bugüne kadar gebelik oranları üzerine etkili olduğu gösterilen  R-1 polimorfizmlerinin aynı zamanda olgunlaşma ve fertilizasyon oranları üzerine de etkili olduğuna işaret eden ilk çalışma niteliğindedir.

Çalışmamızda c.454-397 T>C polimorfizminin olgunlaşma oranlarına etkisi incelendiğinde üç genotip de birbiriyle anlamlı bulunmuş ($p<0.001$) ve PP genotipinde en yüksek olmak üzere olgunlaşma oranları Pp ve pp genotiplerinde sırasıyla azalmaktadır.

Fertilizasyon oranları yönünden elde ettiğimiz fark incelendiğinde c.454-397 T>C polimorfizmi için aynı olgunlaşma oranlarında olduğu gibi PP genotipinde en yüksek olmak üzere fertilizasyon oranları Pp ve pp genotiplerinde sırasıyla azalmaktadır ve her üç genotip için de anlamlı fark sergilemektedir. Önceki çalışmalarda özellikle c.454-397 T>C polimorfizmi için belirtildiği gibi östrojen reseptörünün etkisini bozduğu⁶² ve bu durumda östrojenin işlevini değiştirerek folikül gelişimini ve dolayısıyla oosit olgunlaşmasını negatif yönde etkilediğini vurgulamak mümkün olmaktadır. İlk tüp bebek uygulamasını gerçekleştiren Edwards ve arkadaşlarının 1984 yılında yaptıkları çalışmada rapor ettikleri gibi olgun oositlerde fertilizasyon oranlarının yüksek olması elde ettiğimiz bu önemli bulguyu açıklamaktadır¹²⁶.

Tez çalışmamızda infertil ve fertil kadınlar, c.454-351 A>G polimorfizm sıklıkları açısından karşılaştırıldığında grupların birbirinden farklı olduğu ve elde ettiğimiz bu istatistiksel farkın xx genotipinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Aynı polimorfizm ile klinik parametreler karşılaştırıldığında folikül ve oosit sayıları ile ilgili bir bağlantı elde edilememiş sadece heterozigot özellik gösteren bireylerde folikül:oosit oranının düşük olduğu ve XX ile Xx ve Xx ile xx genotipleri arasında istatistiksel fark olduğu

belirlenmiştir. Düşük folikül:oosit oranı, folikül başına toplanan olgun oosit sayısının fazla olduğunu işaret etmektedir.

IVF'te klinik parametreler ile *c.454-351 A>G* polimorfizminin karşılaştırmasında elde ettiğimiz bir diğer değerli bulgu ise olgunlaşma ve fertilizasyon oranları ile ilgilidir. Olgunlaşma oranlarının xx genotipli kadınlarda düşük olduğu fertilizasyon oranlarının ise XX genotiplilerde belirgin şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir. Laboratuvar çalışmaları, ÖR-1 haplotipleri arasında enhancer aktivitesinin farklılık gösterdiğini ve en yüksek aktivitenin ÖR-1 xx haplotipinde ve ÖR-1*x allelinde gerçekleştiğini göstermiştir¹²⁹. Gözlenen bu farklılık, ÖR-1 geninin ifadenin ÖR-1 genotipine göre düzenlendiğini işaret etmektedir. Ayrıca bazı çalışmalar ÖR-1 xx ve pp genotiplerinin ÖR-α işlevini arttırdığı ve östrojenin biyolojik aktivitesini ve dolayısıyla üreme etkenliği üzerindeki rolünü etkilediği hipotezini vurgulamışlardır¹³⁰. ÖR-1 geninin *c.454-397 T>C* lokusunda P allelinin bulunmasının myb ailesinden transkripsiyon faktörleri için (aktivatör protein 4 – AP4) bağlanma bölgesini engellediği düşünülmektedir⁹⁹. *c.454-397 T>C* ve *c.454-351 A>G* polimorfizmlerinin ÖR-α işlevine nasıl bir etkide bulunduğu tam olarak bilinmese de, *c.454-397 T>C* için baskın olan P alleli ve *c.454-351 A>G* için baskın olan X alleli ÖR-α aktivitesini tetiklemektedirler¹²⁹.

TA dinükleotid polimorfizmleri ile ilgili bugüne kadar yapılan az sayıdaki çalışmadan farklı olarak çalışmamızda bu polimorfizmlerin infertilite ve IVF parametrelerine önemli etkilerini istatistiksel olarak ortaya koymaktayız. Fertil ve infertil kadınlar olmak üzere gruplarımız arasında TA

tekrar polimorfizm sıklıkları açısından ilişki gösterilmiştir. Bu çerçevede allel sıklıkları benzer bir dağılım gösterirken, heterozigot genotipe sahip bireyler infertil grupta belirgin bir sayı artışı sergilemekte ve iki kısa allel veya iki uzun allel içeren homozigot genotipler iki çalışma grubu arasında birbirlerinden farklıdır. İnfertil gruptaki heterozigot birey fazlalığından dolayı sapmaya neden olduğunu düşünmekteyiz. Ancak kontrol grubunun HWE ile uyumlu olması nedeniyle sadece infertil grupta gözlenen bu sapmanın ilgililenen lokus ile hastalık arasındaki ilişkiden kaynaklanabileceği çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır^{131,132,133}.

Önceki çalışmalarda kısa TA tekrarlarının, açıklanamayan infertilite olgularında⁹⁰ ve prematür overyan bozukluğu olan kadınlar⁹⁴ ile ilişkisi açıklanmıştır. Altmae ve arkadaşlarının çalışmasında bizim çalışmamızla uyumlu bazı sonuçlar elde edilmiş ve uzun TA tekrarlarının daha iyi KOH sonuçları ile bağlantılı olduğu daha fazla sayıda folikülün olgunlaştığı, daha fazla sayıda oositin elde edildiği ve iyi kalitede bir embriyo elde etmek üzere daha az düzeyde FSH dozuna gereksinim duyulduğu gibi bulgulara dikkat çekmişlerdir⁹⁰.

TA tekrar polimorfizmleri ile ilgili olarak çalışmamızda elde ettiğimiz diğer bir bulgu ise genotipler arasında embriyo sayısı yönünden belirgin şekilde fark gözlenmesidir. Buna göre iki allelinde de uzun TA dinükleotid tekrarı olan kadınlarda diğer genotiplerle karşılaştırıldığında döllenmiş oosit sayısının daha az olduğu belirlendi. Döllenmiş oosit sayısında elde edilen anlamlı ilişki fertilizasyon oranları arasındaki ilişkiye de yansımış

olup fertilizasyon oranlarında da her üç genotip birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmiştir.

ÖR-1 geninin kontrol bölgesinde yer alan TA tekrar dizisinin ÖR-1 gen ifadenmesini veya işlevini etkilediği bilinmektedir⁹⁵. Bu doğrultuda Becherini ve arkadaşları, TA tekrar sayısındaki farklılığın gen işlevini nasıl etkilediği üzerine farklı hipotezler geliştirmişlerdir¹⁰⁰. Bu hipotezlerden ilki dinükleotid TA polimorfizminin transkripsiyonel düzenleme yoluyla ifadenme düzeyini doğrudan etkilediği yönündedir. Bir diğer hipoteze göre, dinükleotid polimorfizmi ÖR-α protein işlevini doğrudan etkileyecek eksonda yer alan bir polimorfizm ile bağlantılıdır. Farklı bir hipotez de ÖR-1 gen polimorfizminin ÖR-1 genine bitişik başka bir tanımlanmayan gendeki mutasyon ile bağlantılı olduğudur. TA tekrar polimorfizmlerinin etkisiyle farklı bölgelerde meydana gelen alternatif kesim mekanizması ve bunun sonucunda oluşan farklı aktif kontrol bölgeleri ve alternatif eksonlar sayesinde gen ifadenmesi değişmekte ve farklı protein ürünleri meydana gelmektedir¹⁰⁰.

ÖR-1 geninde tanımlanan üç polimorfizm arasındaki bağlantı yüzdelerini hesapladığımızda *c.454-397 T>C* polimorfizmi ve *c.454-351 A>G* polimorfizmleri arasında %93 oranında bağlantı elde edilmiştir. Bu polimorfizmler için yapılan haplotip analizi sonuçlarına göre hasta ve kontrol grubunda (PX, px, pX, Px) olmak üzere 4 haplotip belirlenmiş, kontrol grubunda en sık görülen haplotip PX temel alınarak, diğer haplotiplerin herbirine ait infertilite riski hesaplanmıştır. Buna göre, Px haplotipine sahip bireylerde infertilite riskinin 2 kat arttığı gözlenmiştir. Ancak literatürde bu

polimorfizmler için benzer yatkınlık bulunamadığı için sonuçlarımız tartışılmamıştır.

ÖR-1 gen polimorfizmlerinin infertilite üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda çoğunlukla *c.454-397 T>C* polimorfizmi tercih edilmiştir. Ör-1 gen polimorfizmlerinin özellikle *c.454-397 T>C* polimorfizminin yardımcı üreme tedavilerinde elde edilen klinik parametreler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmaların sonuçları birbirlerine göre farklılık göstermekte ve çalışma planlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda yapılan ve yapılacak çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Ancak daha net sonuçlara ulaşmak için olgu sayılarının artırılması ve yeni polimorfizmlerin ortaya konulması veya değişik popülasyonlara (ırk veya coğrafi farklılıklar yönünden) ait çalışmaların planlanması gerekmektedir.

Çalışmamızın konuyla ilişkili olarak diğer çalışmalarla birlikte bilgi havuzuna katkı sağlamasının yanı sıra, söz konusu polimorfizmin toplumdan topluma farklılık gösterebileceği göz önüne alındığında Türk toplumuna ait dağılımı yansıtmaması diğer bir getirisi olmuştur.

c.454-397 T>C ve *c.454-351 A>G* polimorfizmleri her ne kadar tek nükleotid değişimi olsalar da Ör-α proteininde amino asit değişimine neden olmamaktadırlar. Bu polimorfizmler ve ortaya çıkan ilgili haplotipler, Ör-1 geninin düzenleyici dizilerinde varyasyona neden olmaktadır⁹².

c.454-397 T>C, *c.454-351 A>G* ve TA tekrar polimorfizmlerinin daha büyük, kapsamlı çalışmalarda ve farklı toplumlarda çalışılarak infertilite

ve IVF'te elde edilen klinik parametreler üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılması, bu iki polimorfizmin hangi moleküler mekanizmalarla etkisini gösterdiği, polimorfizmlerin östrojenin ve reseptörünün işlevini tam olarak nasıl ve ne yönde değiştirdiği cevaplanması gerekli sorulardan bazılarıdır. Reseptör proteininin geninde henüz tanımlanmamış olan olası diğer polimorfik bölgelerin belirlenmesi ve bunların infertilite ile ilişkisinin araştırılması, ÖR-1 geninin infertilite üzerine etkisine özgül bir promotörünün ve/veya özgül bir intron kesimleme varyantının olup olmadığı, ayrıca ÖR-1 ve ÖR-2 genleri arasında etkileşimlerin olup olmadığı da sorgulanması gereken diğer konulardır.

ÖR-1 polimorfizmlerinin fertilite üzerine doğrudan etkisi olmamakla birlikte infertilite problemleri ortaya çıktığında ve tüp bebek tedavileri sonrası ovaryum cevabı ve tedavi başarısını öngörmede ÖR-1 polimorfizmleri önemli rol oynayabilmektedir. Çalışmamızda bu polimorfizmlerin özellikle oositlerin olgunlaşması ve fertilizasyonunda negatif yönde etki gösterdiğini belirledik. Tüp bebek tedavileri sonucu elde edilen implantasyon ve gebelik oranlarına olan doğrudan katkısını belirleyebilmek için şüphesiz daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

6. SONUÇ

Yardımcı üreme tedavisinde uygulanan mikroenjeksiyon ve konvansiyonel in vitro fertilizasyon tekniklerinde sperm hücresinin oosit aktivasyonunu sağlayamadığı ve dolayısıyla fertilizasyonun olmadığı oositler ile embriyo gelişimi mümkün olmamaktadır. Fertilizasyon oranlarının bu şekilde düşmesi ile birlikte gebelik oranları da düşmekte ve tüp bebek tedavisinden başarı elde edilememektedir.

Çalışmamız iki bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde oositte DNA hasarının ikinci bölümde ise östrojen reseptör gen polimorfizmlerinin IVF tekniklerinde oositlerin olgunlaşması ve fertilizasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Komet tekniği, çeşitli hücre tiplerinde ve hedef organlarından alınan hücrelerde uygulanan ve çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan in vivo ve in vitro çalışmalarda kullanılan bir yöntemdir. Literatürde özellikle sperm hücreleri ve lenfositlerle yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Hücre sayısının milyonlara ulaştığı örneklerde başarıyla ve sıklıkla uygulanan bu teknik ile ilgili olarak insan oositi ile ilgili bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda DNA hasarını belirlemede ölçüt olarak hücrelerin piksel yoğunluğu ve çap uzunluklarından faydalanıldı. Çalışma gruplarına ait oositlerde çap uzunluğu cinsinden fark belirlenmedi ancak piksel yoğunlukları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşıldı. Foliküllerden aspire edildikten sonra hiçbir işlem uygulanmamış olgun oositlerde (Grup 1) elde edilen

yüksek komet piksel yoğunluğu değeri ile piezo elektrik uygulaması yapılmış (Grup 3) ve pozitif kontrol olarak kullanılan ve hidrojen peroksit solüsyonunda bekletilmiş oositlerde (Grup 4) belirlenen düşük komet değerleri farklı bulundu. Mikroenjeksiyon yapılan oositler ile (Grup 2) ve piezo elektrik uygulanmış oositlerde (Grup 3) ölçülen komet ortalama piksel yoğunlukları arasında da fark olduğu belirlendi ($p=0.014$). Grup 3 ve hidrojen peroksit maruz bırakılmış oosit grubu (Grup 4) arasında komet ortalama piksel yoğunlukları cinsinden ilişki saptandı.

Oositlerde DNA fragmentasyonunun IVF'te fertilizasyon ve olgunlaşma oranlarına etkisini incelemek amacıyla oosit komet ölçümleri ile kadınların tüp bebek siklusunda elde edilen olgunlaşma ve fertilizasyon oranları kıyaslandı. Literatürde yer alan standart olgunlaşma ve fertilizasyon oranları referans olarak alındığında ve oositlerde belirlenen hasar ölçüm değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

Sonuç olarak çalışmamızda oositlerde DNA hasarının, oositlerin olgunlaşma ve fertilizasyonuna doğrudan etkisinin olmadığı ancak yardımcı üreme tedavilerinde uygulanan bazı tekniklerin oositlerde DNA hasarına yol açtığı belirlendi. Tüp bebek tedavilerinde başarıya ulaşmak ve tedavinin gebelikle sonlandırılması amacıyla IVF laboratuvarlarında geliştirilen veya geliştirilecek alternatif tekniklerin rutinde uygulamaya konulmadan önce, başta oositler olmak üzere gamet hücrelerinin DNA'larına olan etkisinin araştırılması gerektiği anlaşıldı. Oositlerde kendiliğinden

gelişen veya tedavi sürecinde ortaya çıkan DNA hasarının implantasyon ve gebelik oranlarına etkisinin belirlenmesi sonraki çalışmaların amacı olabilir.

Östrojen, folikül oluşumu ve oosit olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır. Hormonların hedef hücrelerine ulaştıklarında etkilerini gösterebilmesi için özgül reseptörlerine bağlanması gerekir. Çalışmamızda yardımcı üreme tekniklerinde, östrojen reseptör polimorfizmlerinden c.454-397 T>C, c.454-351 A>G ve genin kontrol bölgesinde yer alan TA tekrar polimorfizminin infertil ve fertil (kontrol) kadınlarda dağılımını ve bu polimorfizmlerin gelişen folikül sayısı, döllen oosit sayısı, olgunlaşma ve fertilizasyon oranlarına etkisi incelenmiştir. c.454-397 T>C polimorfizminin genotip dağılımları karşılaştırıldığında, infertil ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark elde edilmiştir. Söz konusu farka p allelinin neden olduğu PP genotipli bireyler ile karşılaştırıldığında Pp genotipli bireylerde 2 kat, pp genotipli bireylerde ise 4 kat risk artışı olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, ÖR-1 geninde tanımlanan c.454-397 T>C polimorfizminde p alleleline sahip olanların infertilite riskinin P alleleline sahip olanlara göre 2 kat arttığı bulunmuştur.

Polimorfik dağılımlar ile IVF klinik parametreleri karşılaştırıldığında genotipler arasında olgunlaşma oranı, embriyo sayısı ve fertilizasyon oranı yönünden istatistiksel olarak ilişki gözlemlendi. pp genotipli kadınlarda istatistiksel olarak düşük sayıda embriyo sayısı görüldüğü belirlendi. Olgunlaşma ve fertilizasyon oranları yönünden her üç genotip birbiriyle kıyaslandığında PP genotipinde en yüksek olmak üzere olgunlaşma oranlarının Pp ve pp genotiplerinde sırasıyla azaldığı gözlemlendi.

ÖR-1 geninin c.454-351 A>G polimorfizminin genotip dağılımları karşılaştırıldığında gözlenen infertil ve kontrol grupları arasındaki farklılığa x allelinin neden olduğu belirlendi.

c.454-351 A>G için polimorfik dağılımlarının IVF klinik parametreleri ile ilişkisi değerlendirildiğinde genotipler arasında folikül:oosit oranı, olgunlaşma oranı, embriyo sayısı ve fertilizasyon oranı yönünden istatistiksel anlam izlendi. Folikül:oosit oranı gruplar arasında karşılaştırıldığında heterozigot bireylerde bu oranın düşük olduğu, olgunlaşma oranları ve döllenmiş oosit sayısı yönünden xx genotipinin gruplar arası farklılığa sebep olduğu saptandı.

ÖR-1 geni kontrol bölgesinde yer alan TA mikrosatellit polimorfizminin genotip dağılımlarının infertil ve kontrol grupları arasında farklı oldukları ve uzun tekrar sayısı içeren allele sahip bireylerde kısa tekrar sayısı içeren allele sahip olanlara göre infertilite riskinin 2 kat arttığı gözlemlendi.

Aynı polimorfizmin IVF parametreleri ile karşılaştırması yapıldığında özellikle embriyo sayısı yönünden farklı olduğu görüldü. Buna göre, her iki allelinde uzun tekrar sayısına sahip kadınlarda daha az sayıda oositlerin döllenmesi belirlendi. Bu etkinin fertilizasyon oranlarına da yansıdığı dikkat çekti ve her üç genotip birbiriyle karşılaştırıldığında fertilizasyon oranları için gruplar arasında fark olduğu gözlemlendi. Fertilizasyon oranının KK genotipinde en yüksek, UK genotipinde daha düşük ve UU genotipinde en düşük olduğu rapor edildi.

İncelenen üç polimorfizm içim haplotip analizi yapıldığında *c.454-397 T>C* polimorfizmi ve *c.454-351 A>G* polimorfizmleri arasında %93 oranında bağlantı olduğu belirlendi. Kontrol grubunda en sık görülen haplotip PX temel alınarak, diğer haplotiplerin herbirine ait infertilite riski hesaplandı. Buna göre px haplotipine sahip bireyler PX haplotipli bireyler ile karşılaştırıldığında infertilite riskinin 2 kat arttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak incelediğimiz östrojen reseptör gen polimorfizmlerinin gerek infertilite gerek ise yardımcı üreme tekniklerinde elde edilen sonuçlara etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuçların daha fazla çalışma ile desteklenmesi neticesinde gelecekte bu polimorfizmlerin analizinin yapılması ve kadınlarda infertilite riskinin polimorfik dağılımlar göz önünde bulundurularak hesaplanması mümkün olabilecektir. Aynı şekilde genotipleme yapılarak infertil kadınların tüp bebek tedavilerinde elde edilebilecek klinik parametrelerin iyileştirilmesi ve tedavide daha başarılı sonuçlar elde edilmesi amaçlanabilecektir.

7. ÖZET

MİKROENJEKSİYON ve PİEZO ELEKTRİK UYGULANMIŞ İNSAN OOSİTLERİNDE DNA HASARININ BELİRLENMESİ VE ÖSTROJEN RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMLERİNİN FERTİLİZASYONA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Anahtar kelimeler: Oosit komet tekniği, östrojen reseptör gen polimorfizmi, IVF, fertilizasyon

Bu çalışmada tüp bebek tedavisi gören 104 kadından toplanan metafaz-II aşamasındaki dört grup oosite komet tekniği uygulandı. Grup 1 oositler, spermle birleştirilmeden doğrudan çalışmaya dahil edildi. Mikroenjeksiyon sonrası döllenmeyen oositler ikinci grubu oluşturdu. Grup 3 oositlere piezo elektrik uygulandı. Dördüncü grup ise hidrojen peroksitte bekletilen oositlerden oluşmaktaydı. Bu gruplarda mikroenjeksiyon ve piezo elektrik gibi tekniklerin oosit DNA'sı üzerine etkilerinin ortaya konması beklenildi. Çalışmanın sonunda 1. ve 2. grup oositlerde, 3. ve 4. gruptakilere göre DNA fragmentasyonunun düşük olduğu belirlendi.

Çalışmanın diğer amacı da östrojen reseptör gen polimorfizmlerinin PCR-RFLP ile fragment analizi teknikleri kullanılarak belirlenmesi ve oosit olgunlaşma ve fertilizasyon oranları ile ilişkilendirilmesidir. Bu doğrultuda 104 infertil, 107 fertil kadın çalışmaya katıldı. İnfertil ve fertil kadınlar arasında polimorfizmlerin dağılımı karşılaştırıldı ve in vitro fertilizasyon (IVF) parametreleri üzerinde polimorfizmlerin etkileri incelendi.

c.454-397 T>C, c.454-351 A>G ve TA polimorfizmlerinin infertil ve fertil kadınlar arasındaki dağılımının farklı olduğu ve olgunlaşma oranları, embriyo sayısı ve fertilizasyon oranlarının pp ve xx genotipli kadınlarda düşük olduğu belirlendi. Uzun TA tekrarının düşük embriyo sayısı ve fertilizasyon oranı ile ilişkisi gözlemlendi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, komet yönteminin IVF tedavilerinde uygulanan tekniklerin oosit DNA'sı üzerine etkilerinin belirlenmesi ve uygulanan tekniklerin geliştirilmesi için önemli olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın bulguları, komet tekniğinin bir biyoassay yöntemi olarak kullanılabileceği ve bu sayede DNA'da hasar oluşumu en aza indirilerek IVF başarısının artırılabilceği görüşünü desteklemektedir. Östrojen reseptör gen polimorfizmleri ile infertilite ve IVF parametreleri arasında elde ettiğimiz ilişkiler ise bireylerin genotiplerine uygun tedavi yöntemleri geliştirmek ve uygulamak, dolayısıyla tüp bebek tedavilerinde başarı şansını arttırmak doğrultusunda önem taşımaktadır.

8. SUMMARY

DIAGNOSIS OF DNA DAMAGE ON OOCYTES WHICH ARE SUBJECT TO MICROINJECTION AND PIEZO ELECTRIC AS WELL AS DETERMINING THE IMPACT OF ESTROGEN RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS ON FERTILIZATION

Key Words: Oocyte comet assay, estrogen receptor gene polymorphism, IVF, fertilization

In this study, comet assay was applied on four groups of metaphase-II oocytes collected from 104 women undergoing in vitro fertilization (IVF) treatment. Group1 oocytes were not microinjected. Group2 oocytes were the unfertilized ones. Group3 oocytes were exposed to piezo electric stimulation. Group4 was the positive control in which the oocytes were incubated in hydrogen peroxide. It was expected to reveal the impact of microinjection and piezo electric stimulation on oocyte DNA. Group1 and 2 oocytes were found to have lower DNA fragmentation than Group3 and 4.

Another point was to detect estrogen receptor gene polymorphisms via PCR-RFLP and fragment analysis and correlate with oocyte maturation and fertilization rates. 104 infertile and 107 fertile women were investigated. First the severity of polymorphisms between infertile and fertile women then the effect of the polymorphisms on IVF parameters was analyzed.

Significant statistical relationship was observed between infertile and fertile women in terms of *c.454-397T>C*, *c.454-351A>G* and TA polymorphisms. Maturation rates, embryo number and fertilization rates

were significantly smaller in women having pp and xx genotypes. Long TA repeat was found to be associated with low embryo number and fertilization rate.

The outcome of our study implies the importance of comet technique upon determining the impact of techniques applied in IVF treatment on oocyte DNA and developing the applied techniques. The relationship we found between the polymorphisms and infertility&IVF parameters carry weight in developing and applying treatment methods suitable to individuals genotypes, in this way in increasing the success rates in IVF treatments.

9. KAYNAKLAR

1. Veeck LL. An Atlas of Human Gametes and Conceptuses. 1st ed. London: The Parthenon Publishing Group; 1999.
2. Ajduk A, Małagocki A, Maleszewski M. Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: Development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca^{2+} oscillations. *Reprod Biol.* 2008 8(1):3-22. Review.
3. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Başaklar AC. Dokuzuncu Baskıdan Çeviri, Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
4. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı. Ankara: Tıp & Teknik Yayıncılık Ltd. Şti; 1998. s.7-41,
5. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* 2006; 65(1):126-36. Review.
6. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 1995; 42(4):437-42.
7. Assey RJ, Hyttel P, Kanuya N. Oocyte structure in dominant and subordinate follicles in zebu cattle (*Bos indicus*). *Anat Embryol (Berl)* 1994; 190(5):461-8.

8. Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarré AS, Joly CG et al. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005; 63(4):1149-66.
9. Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002; 66(1):38-43.
10. www.ccivf.com/glossary.html
11. Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet*. 1965; 2(7419):926-9.
12. Cole RJ, Edwards RG, Paul J. Cytodifferentiation in cell colonies and cell strains derived from cleaving ova and blastocysts of the rabbit. *Exp cell res*. 1965;37:501-4.
13. Gardner DK, Weissman AC, Howles M, Shoham Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. 1st Ed. United Kingdom: Taylor and Francis. Preface xi; 2004.
14. Steptoe PC. Laparoscopy and ovulation. *Lancet*. 1968; 2(7574):913.
15. www.history1900s.about.com

16. Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM. Clinical Aspects of Pregnancies Established with Cleaving Embryos Grown In Vitro. Br. J. Obstet. Gynaecol. 1980; 87: 757-768.
17. Templeton AA, Morris JK, Parslow W. Factors that affect the outcome of in vitro fertilization treatment. Lancet 1996; 348: 1402-1406.
18. Brinsden PR. Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. United Kingdom: Taylor and Francis; 2005.p.24.
19. Hohmann FP, Macklon NS, Fauser BC. A Randomized Comparison of Two Ovarian Stimulation Protocols with Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Antagonist Cotreatment for In Vitro Fertilization Commencing Recombinant Follicle-Stimulating Hormone On Cycle Day 2 or 5 with the Standard Long GnRH Agonist Protocol. J Clin Endocrinol Metab 2003 ;88(1):166-73.
20. Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH. Implantation Rates After In Vitro Fertilization and Transfer of a Maximum of Two Embryos That Have Undergone Three To Five Days of Culture. Fertil Steril 2000;73(1):117-22.
21. Kastrop PM, Weima SM., Van Kooij RJ, Te Velde ER. Comparison Between Intracytoplasmic Sperm Injection And In-Vitro Fertilization (IVF) with High Insemination Concentration After Total Fertilization Failure In a Previous IVF attempt. Hum Reprod 1999;14(1):65-9.

22. Vicdan K, Işık AZ. İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipulasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Birinci baskı. Ankara: Çağdaş Medikal Kitabevi. 1999. s.92-94.
23. Tateno H, Kamiguchi Y. Evaluation of Chromosomal Risk Following Intracytoplasmic Sperm Injection in the Mouse. Biol Reprod. 2007; 77(2):336-42
24. Belva F, Henriët S, Liebaers I, Van Steirteghem A, Celestin-Westreich S, Bonduelle M. Medical outcome of 8-year-old singleton ICSI children (born ≥ 32 weeks' gestation) and a spontaneously conceived comparison group. Hum Reprod 2007;22(2):506-15.
25. Rajesh H, Yap HA, Wu YJ. Pregnancy outcomes from in-vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection: a comparison. Singapore Med J 2006; 47(4):309-14.
26. Middelburg KJ, Heineman MJ, Bos AF, Hadders-Algra M. Neuromotor, cognitive, language and behavioural outcome in children born following IVF or ICSI-a systematic review. Hum Reprod Update. 2008;14(3):219-31.
27. Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, et al. Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. Hum Reprod 1999;14:1307-1311.

28. Boklage CE. Survival Probability of Human Conceptions from Fertilization to Term. *Int. J Fertil.* 1990; 35(2): 75-84.
29. Baltaci V, Şatıroğlu H, Kabukçu C, Ünsal E, Aydınuraz B, Üner Ö et al. Relationship Between Embryo Quality and Aneuploidies. *Reprod BioMed Online* 2006;12(1):77-82.
30. Almeida PA, Bolton VN. The Relationship Between Chromosomal Abnormality In The Human Preimplantation Embryo and Development In Vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996: 8(2):235-41.
31. Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Sereni E, Sciajno R, Flamigni C et al. Predictive Factors for Embryo Implantation Potential. *RBM Online.* 2005; 10(5): 653-668.
32. Moller P, Loft S, Alfthan G, Freese R. Oxidative DNA damage in circulating mononuclear blood cells after ingestion of blackcurrant juice or anthocyanin-rich drink. *Mutat Res* 2004; 551: 119-126.
33. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril.* 2001 :76(5):892-900.
34. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123: 291-8.

35. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-91.
36. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995;339(1):37-59. Review.
37. Duty SM, Singh NP, Ryan L ve ark. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum Reprod.* 2002;17:1274-1280.
38. Morris ID, Iltott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002;17(4):990-8.
39. Bauch T, Böcker W, Mallek U, Müller WU, Streffer C. Optimization and standardization of the "comet assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlenther Onkol* 1999 ;175(7):333-40.
40. Van Kooij RJ, de Boer P, De Vreeden-Elbertse JM, Ganga NA, Singh N, Te Velde ER. The neutral comet assay detects double strand DNA damage in selected and unselected human spermatozoa of normospermic donors. *Int J Androl.* 2004;27(3):140-6.

41. Pitozzi V, Pallotta S, Balzi M, Bucciolini M, Becciolini A, Dolara P, et al. Calibration of the comet assay for the measurement of DNA damage in mammalian cells. *Free Radic Res.* 2006 ;40(11):1149-54.
42. Giovannelli L, Saieva C, Masala G, Testa G, Salvini S, Pitozzi V, et al. Nutritional and lifestyle determinants of DNA oxidative damage: A study in a Mediterranean population. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1483-1489.
43. Gedik CM, Ewen SW, Collins AR. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol.* 1992;62(3):313-20.
44. Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies, *Mutat Res* 2000; 463:13-31.
45. Collins AR, Raslova K, Somorovska M, Petrovska H, Ondrusova A, Vohnout B, et al. DNA damage in diabetes correlation with a clinical marker, *free radic. Biol. & Med* 1998; 25(3), 373-77.
46. Sardas S, Yılmaz M, Oztok U, Cakır N, Karakaya AE. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutat. Res* 2001; 490(2):123-129.

47. Sánchez-Suárez P, Ostrosky-Wegman P, Gallegos-Hernández F, Peñarroja-Flores R, Toledo-García J, Bravo JL, et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. *Mutat Res* 2008; 640(1-2):8-15.
48. Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 2002 Jul;17(7):1856-62.
49. Van der Westerlaken L, Helmerhorst F, Dieben S, Naaktgeboren N. Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005;83(3):612-7.
50. Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Alvarez JG, Fernández JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 2007;28(1):38-49.
51. Cebesoy FB, Aydos K, Unlu C. Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Arch Androl.* 2006;52(5):397-402.
52. Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization

rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005;84(1):130-40.

53. Bakos HW, Thompson JG, Feil D, Lane M. Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy. *Int J Androl*. 2007.
54. Li Z, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2006;23(9-10):367-76.
55. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13(7):1864-71.
56. Abu-Hassan D, Koester F, Shoeffter B, Schultze-Mosgau A, Asimakopoulos B, Diedrich K, Al-Hasani S. Comet assay of cumulus cells and spermatozoa DNA status, and the relationship to oocyte fertilization and embryo quality following ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006;12(4):447-52.
57. Raman RS, Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chan SR et al. Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2001;16(5):831-5.

58. Chan PJ, Calinisan JH, Corselli JU, Patton WC, King A. Updating quality control assays in the assisted reproductive technologies laboratory with a cryopreserved hamster oocyte DNA cytogenotoxic assay. *J Assist Reprod Genet.* 2001;18(3):129-34.
59. Jebelli B, Chan PJ, Corselli J, Patton WC, King A. Oocyte comet assay of luteal phase sera from nonpregnant patients after assisted reproductive procedures. *J Assist Reprod Genet.* 2001;18(8):421-5.
60. Maruyama T, Sachi Y, Furuke K, Kitaoka Y, Kanzaki H, Yoshimura Y, et al. Induction of thioredoxin, a redox-active protein, by ovarian steroid hormones during growth and differentiation of endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology.* 1999;140(1):365-72.
61. Gruber CJ, Wieser F, Gruber IM, Ferlitsch K, Gruber DM, Huber JC. Current concepts in aesthetic endocrinology. *Gynecol Endocrinol* 2002;16(6):431-41. Review.
62. Sundarajan C, Liao W, Roy AC, Ng SC. Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Mol Hum Reprod* 1999;5:797–802.
63. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med.* 1999; 246(2):133-8. Review.

64. Gray GA, Sharif I, Webb DJ, Seckl JR. Oestrogen and the cardiovascular system: the good, the bad and the puzzling. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(3):152-6. Review.
65. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):773-81. Review.
66. Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. *Hypertension* 2001;37:640-4.
67. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(14):2905-19. Review.
68. Atasü T, Şahmay S. Jinekoloji (Kadın Hastalıkları). Birinci Baskı. İstanbul: Universal Bilimsel Yayınları, 1996.
69. Couse JF, Bunch DO, Lindzey J, Schomberg DW, Korach KS. Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology.* 1999;140(12):5855-65.
70. Wu TC, Wang L, Wan YJ. Detection of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human oocytes and cumulus-oocyte complexes

using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Fertil Steril* 1993 Jan;59(1):54-9.

71. Hurst BS, Zilberstein M, Chou JY, Litman B, Stephens J, Leslie KK. Estrogen receptors are present in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 ;80(1):229-32
72. Hillier SG, Smyth CD, Whitelaw PF, Miró F, Howles CM. Gonadotrophin control of follicular function. *Horm Res* 1995;43(5):216-23.
73. Babiker FA, De Windt LJ, Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doenemdans PA. Estrogenic Hormone Action in The Heart: Regulatory Network and Function, *Cardiovasc. Res* 2002; 53:709–719.
74. Klinge CM Estrogen Receptor Interaction with Co-activators and Co-repressors. *Steroids*. 2000; 65:227-251.
75. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 36869-36872.
76. Metzger D, Ali S, Bornert J, Chambon P. Characterization of the Amino-terminal Transcriptional Activation Function of the Human Estrogen Receptor in Aminoal and Yeast Cells. *J. Biol. Chem* 1995; 270: 9535-9542.

77. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Oeimo A, Hosoi T, et al. The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and Its Heterodimerization with ER α in Vivo and in Vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1998;243:122-126.
78. Kong EH, Pike ACW, Hubbard RE, Structure and Mechanism of the Oestrogen Receptor, *Biochem. Soc. Trans* 2003; 31: 56-59.
79. Ho KJ, Liao JK. Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Mol Interv* 2002 ;2(4):219-28. Review.
80. Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of Human Estrogen Receptor α by Protein Kinase A Regulates Dimerization. *Mol. Cell. Biol* 1999; 19: 1002–1015.
81. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Anderson G, et al. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol. Rev* 2001; 81:1535-1565.
82. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(12):5925-30.

83. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82(23):7889-93.
84. Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, Borresen AL, Oestrogen Receptor (ESR) Polymorphisms and Breast Cancer Susceptibility. Hum. Genet. 1994;94:665-670.
85. Schuur ER, Loktev AV, Sharma M, Sun Z, Roth RA, Weigel RJ. Ligand-dependent interaction of estrogen receptor- α with members of the forkhead transcription factor family. J Biol Chem. 2001;276(36):33554-60.
86. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Genomic Organization of the Human ER α Gene Promoter Region. Mol. Endocrinol 2001; 15, 2057-2063.
87. Passarge E. Renkli Genetik Atlası, Formal Genetik: Polimorfizm. Luleci G, Sakizli M. 2.baskı, İstanbul: Nobel Tıp - Yüce Yayınları; 2000. s.156
88. Carey J, White B. Medical Genetics. Third Edition. Missouri: Mosby; 2006.p.29
89. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genetics in medicine. Sixth Edition Philadelphia: Saunders Elsevier; 2004.p.87.

90. Altmäe S, Haller K, Peters M, Hovatta O, Stavreus-Evers A, Karro H, et al. Allelic estrogen receptor 1 (ESR1) gene variants predict the outcome of ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Mol Hum Reprod* 2007;13(8):521-6.
91. Hsieh YY, Wang YK, Chang CC, Lin CS. Estrogen receptor alpha-351 XbaI*G and -397 PvuII*C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomyoma. *Mol Hum Reprod* 2007;13(2):117-22.
92. Georgiou I, Konstantelli M, Syrrou M, Messinis IE, Lolis DE. Oestrogen receptor gene polymorphisms and ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997 ;12(7):1430-3.
93. Lehrer SP, Schmutzler RK, Rabin JM, Schachter BS. An estrogen receptor genetic polymorphism and a history of spontaneous abortion--correlation in women with estrogen receptor positive breast cancer but not in women with estrogen receptor negative breast cancer or in women without cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1993; 26(2):175-80.
94. Syrrou M, Georgiou I, Patsalis PC, Bouba I, Adonakis G, Pagoulatos GN. Fragile X premutations and (TA)_n estrogen receptor polymorphism in women with ovarian dysfunction. *Am J Med Genet* 1999 ;84(3):306-8.

95. Bretherick KL, Hanna CW, Currie LM, Fluker MR, Hammond GL, Robinson WP. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2008;89(2):318-24.
96. Pollak A, Rokach A, Blumenfeld A, Rosen LJ, Resnik L, Dresner Pollak R. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphism with the angiographic extent of coronary artery disease. *Eur Heart J* 2004;25(3):240-5.
97. Shearman AM, Cupples LA, Demissie S, Peter I, Schmid CH, Karas RH, et al. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *JAMA*. 2003; 290(17):2263-70.
98. Matsubara Y, Murata M, Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H, et al. Genotype distribution of estrogen receptor polymorphisms in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):3006-12.
99. Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL, et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med* 2002; 346(13):967-74.

100. Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A, et al. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet* 2000;9(13):2043-50.
101. Cohn CS, Sullivan JA, Kiefer T, Hill SM. Identification of an enhancer element in the estrogen receptor upstream region: implications for regulation of ER transcription in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 1999;158(1-2):25-36.
102. Rabe T, Diedrich K, Runnebaum B. *Manual on Assisted Reproduction*. First Edition. New York: Springer; 1997.p.316
103. Van Meurs JB, Schuit SC, Weel AE, van der Klift M, Bergink AP, Arp PP, et al. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Hum Mol Genet* 2003; 12(14):1745-54.
104. Albagha OM, Pettersson U, Stewart A, McGuigan FE, MacDonald HM, Reid DM, et al. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with postmenopausal bone loss, bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone. *J Med Genet* 2005;42(3):240-6.

105. Bretherick KL, Hanna CW, Currie LM, Fluker MR, Hammond GL, Robinson WP. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2008; 89(2):318-24.
106. <http://www.eshre.com/emc.asp?pagelId=806>
107. Kent CR, Eady JJ, Ross GM, Steel GG. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *Int J Radiat Biol* 1995;67(6):655-60.
108. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 1996 ;363(2):89-96.
109. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(8):613-9.
110. Barati F, Agung B, Wongsrikeao P, Taniguchi M, Nagai T, Otoi T. Meiotic competence and DNA damage of porcine oocytes exposed to an elevated temperature. *Theriogenology* 2008; 69(6):767-72.
111. Schwarz KR, Pires PR, Adona PR, Câmara deBem TH, Leal CL. Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis

and embryo development in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2008;20(4):529-36

112. Perez GI, Acton BM, Jurisicova A, Perkins GA, White A, Brown J, et al. Genetic variance modifies apoptosis susceptibility in mature oocytes via alterations in DNA repair capacity and mitochondrial ultrastructure. *Cell Death Differ* 2007;14(3):524-33.
113. Wang H, Höög C. Structural damage to meiotic chromosomes impairs DNA recombination and checkpoint control in mammalian oocytes. *J Cell Biol* 2006 22;173(4):485-95.
114. Drost JB, Lee WR. Biological basis of germline mutation: comparisons of spontaneous germline mutation rates among drosophila, mouse, and human. *Environ Mol Mutagen*. 1995; 26:48-64.
115. Huttley GA, Jakobsen IB, Wilson SR, Easteal S. How important is DNA replication for mutagenesis? *Mol Biol Evol*. 2000;17(6):929-37.
116. Baarends WM, van der Laan R, Grootegoed JA. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* 2001;121(1):31-9. Review.
117. Hurst LD, McVean GT. Do we understand the evolution of genomic imprinting? *Curr Opin Genet Dev* 1998 ;8(6):701-8. Review.

118. Zheng P, Schramm RD, Latham KE. Developmental regulation and in vitro culture effects on expression of DNA repair and cell cycle checkpoint control genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Biol Reprod* 2005 ;72(6):1359-69.
119. Harrouk W, Codrington A, Vinson R, Robaire B, Hales BF. Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutat Res* 2000; 461(3):229-41.
120. Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008; 78(4):761-72.
121. Jaroudi S, SenGupta S. DNA repair in mammalian embryos. *Mutat Res* 2007; 635(1):53-77. Review.
122. Jurisicova A, Latham KE, Casper RF, Casper RF, Varmuza SL. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(3):243-53.
123. Aitken RJ, De Iuliis GN. Value of DNA integrity assays for fertility evaluation. *Soc Reprod Fertil* 2007; 65:81-92. Review.

124. Tesarik J, Pilka L, Dvorák M, Trávník P. Oocyte recovery, in vitro insemination, and transfer into the oviduct after its microsurgical repair at a single laparotomy. *Fertil Steril*. 1983; 39(4):472-75.
125. Guo Y, Guo KJ, Huang L, Tong XG, Li X. Effect of estrogen deprivation on follicle/oocyte maturation and embryo development in mice. *Chin Med J* 2004;117(4):498-502.
126. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1984;1(1):3-23.
127. Botero-Ruiz W, Laufer N, DeCherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil Steril* 1984; 41(6):820-6.
128. Filicori M, Cognigni GE, Taraborrelli S, Spettoli D, Ciampaglia W, de Fatis CT, et al. Luteinizing hormone activity supplementation enhances follicle-stimulating hormone efficacy and improves ovulation induction outcome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(8):2659-63.
129. Maruyama H, Toji H, Harrington CR, Sasaki K, Izumi Y, Ohnuma T, et al. Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2000;57(2):236-40.

130. Corbo RM, Ulizzi L, Piombo L, Martinez-Labarga C, De Stefano GF, Scacchi R. Estrogen receptor alpha polymorphisms and fertility in populations with different reproductive patterns. *Mol Hum Reprod* 2007;13(8):537-40.
131. Szeszko JS, Howson JMM, Cooper JD, Walker NM, Twells RCJ, Stevens HE et al. Analysis of Polymorphisms of the Interleukin-18 Gene in Type 1 Diabetes and Hardy-Weinberg Equilibrium Testing. *Diabetes* 2006; 55:559-562.
132. Lee WC. Searching for Disease-Susceptibility Loci by Testing for Hardy-Weinberg Disequilibrium in a Gene Bank of Affected Individuals *Am J Epidemiol* 2003;158:397–400.
133. Auranen A, Spurdle AB, Chen X, Lipscombe J, Purdie DM, Hopper JL, et al. *BRCA2 Arg372His* polymorphism and epithelial ovarian cancer risk *Int. J. Cancer* 2003;103: 427–430.

10. EKLER

Teşekkür

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince ilgisini, bilgisini, deneyimini, iyi niyetini ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Abdullah Ekmekçi'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince engin bilgi, deneyim ve iyi niyetlerini esirgemeyen değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Sevda MENEVŞE, ve Sayın Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bugünkü kariyerim ve bilgi birikimimi borçlu olduğum hocam Sayın Prof. Dr. Volkan BALTACI'ya, çalışmalarımı destekleyen ailem; eşim Fatih AYVAZ'a, doktora eğitimim boyunca bana yardımcı olan arkadaşım İlke ÖNEN'e ve iş arkadaşlarım; Evrim ÜNSAL, Yasemin AKTAŞ ve Feriba TURHAN'a teşekkür ederim. Manevi desteğini her zaman üzerimde taşıdığım canım annem Sema ÜNER, babam Tefik ÜNER ve ağabeyim Özgür ÜNER'e de sonsuz teşekkürler.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : ÖZGE
Soyadı : ÜNER AYVAZ
Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA, 24.10.1978

Eğitimi :

2004- Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Doktora Eğitimi
2001-2003 Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Politikası Çalışmaları, Yüksek Lisans Eğitimi
1996-2001 Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Lisans Eğitimi
1993-1996 Özel Arı Fen Lisesi, Lise Eğitimi
1989-1993 Özel Arı Koleji, Ortaokul Eğitimi
1984-1989 Çankaya İlkokulu, İlkokul Eğitimi
Yabancı Dili : İngilizce