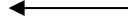
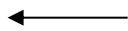


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

DOKTORA TEZİ

**OVULATUAR FAKTÖRLÜ İNFERTİL HASTALARIN
GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE LİQUİRİTİGENİN'İN
ETKİLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE
ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELENMESİ**

EMEL USTA

PROF. DR. SİBEL KÖKTÜRK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Çocuklarım Defne ve Kerem USTA 'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yaptığım süre boyunca bana her zaman destek ve örnek olan, tecrübeleriyle yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Sibel KÖKTÜRK 'e,

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU 'na,

Tez izleme komitesinin değerli üyesi, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Gamze Tanrıverdi 'ye,

Tezimin deneysel çalışmalarının gerçekleştirilmesi aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Bebek Laboratuvarı Genel Koordinatörü Emb. Dr. Sibel BULGURCUOĞLU KURAN 'a, içten davranışları ve yardımları için Emb. Ayşe ALTUN 'a,

Tezimin tamamlanma sürecindeki destekleri için Doç. Dr. Tuğba KOTİL 'e, Dr. Öğr. Üyesi Tuba EKİZ YILMAZ 'a, Araş. Gör. Fatma Beyza SAĞ 'a,

Tüm doktora eğitim sürecim boyunca yanımda olan her aşamada ve konuda yardımcı olan Biyolog Sibel DOĞAN 'a, Biyolog İlkay ÖZDEMİR 'e, Doktora öğrencisi Feride ÖZDEMİR 'e,

Şu anda başka yerlerde olsalar da varlıklarını ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Uzm. Dr. Fatma Nur KARAKUŞ 'a, Araş. Gör. Aslı ERDOĞAN 'a, Araş. Gör. Zehra SEZER 'e, Araş. Gör. Başak IŞILDAR 'a,

Elektron mikroskop çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Biyolog Funda ONAR 'a, Biyolog Ebru KARABULUT AKYÖN 'e, Biyolog Fadime AKTAR 'a ve çalışma hayatıma renk katan İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ailesinin tüm üyelerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ovaryumlar	4
2.2. Oositlerin erken dönem gelişimi.....	5
2.3. Folikül gelişimi	6
2.4. Ovulasyon	9
2.5. Korpus luteum.....	9
2.6. İnfertilite	10
2.7. Oosit ve Kümülus hücre etkileşimi.....	12
2.8. Hücre kültüründe kullanılan medyumlar	15
2.8.1. İVF’te kullanılan medyumlar.....	16
2.9. Liquiritigenin	18
2.10. Sirtuin ailesi	20
2.10.1. SIRT2	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Çalışmaya dahil olan hasta grupları	24
3.2. Çalışmada kullanılan yöntemler	24
3.2.1. Ovulasyon indüksiyonu ve oosit aspirasyonu.....	24
3.2.2. Hücre kültürü	25
3.2.3. LQ dozunun belirlenmesi.....	26
3.2.4. Hücre gruplarının belirlenmesi ve LQ uygulaması.....	26
3.2.5. Hücrelerin fikse edilmesi	27

3.2.6. Viabilite testi	27
3.2.7. İmmunohistokimyasal inceleme	27
3.2.7.1. Görüntü analizi	28
3.2.8. Elektron mikroskop takibi	28
3.2.9. İstatistiksel analiz	29
3.2.10. Kullanılan kimyasal maddeler, malzemelere ve cihazlar	30
3.2.10.1. Kimyasal maddeler	30
3.2.10.2. Malzemeler ve cihazlar	30
4. BULGULAR	31
4.1. Hastalardan elde edilen verilerin incelenmesi	31
4.2. Hastalardan elde edilen verilerin gruplar arasında karşılaştırılması	33
4.3. Hücre Sayımları Sonuçları	36
4.4. SIRT2 İmmünohistokimya Boyanma Sonuçları	37
4.5. Elektron mikroskobu bulguları	44
5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	77

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Doğal ve sentetik medyum çeşitleri (Arora, 2013)	16
Tablo 4-1: Hastalardan elde edilen verilere ait tanımlayıcı bilgiler	31
Tablo 4-2: Hastaların gebelik ve doğum durumlarına ait tanımlayıcı bilgiler	32
Tablo 4-3: Hastalardan elde edilen parametrelerin EF ve OF grupları arasında karşılaştırılması a=Student t testi, b=Mann-Whitney U testi.....	33
Tablo 4-4: EF, EF-DMSO, EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarının canlı hücre sayımlarını gösteren tablo. EF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar *** işareti ile belirtilmiştir ($p < 0,001$).	37
Tablo 4-5: EF, EF-DMSO, EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarının, ImageJ görüntü analiz programı kullanılarak, SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren tablo. EF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar *** işareti ile belirtilmiştir.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Overin genel yapısı ve folikül gelişimi (Mescher, 2016).....	5
Şekil 2-2: Primordiyal germ hücrelerinin göçünü gösteren 5 haftalık embriyo taslağı (Keith L Moore, Persaud, & Torchia, 2018).....	6
Şekil 2-3: Folikül gelişimi (Gartner, 2017)	8
Şekil 2-4: İnfertilite nedenleri (Speroff & Fritz, 2005)	11
Şekil 2-5 Foliküler ortamın korunmasında ve oosit yeterliliğinin belirlenmesinde rol oynayan preovulatuvar foliküle ait diyagram. Kısaltmalar: A: Androjen; cAMP: Siklik AMP; E2: Östrojen; OSF: Oositten salgılanan faktörler (Dumesic, Meldrum, Katz-Jaffe, Krisher, & Schoolcraft, 2015).....	13
Şekil 2-6: Çeşitli granüloza hücre alt gruplarının şematik görünümü(Usta E, 24 Oct. 2022)	14
Şekil 2-7: Meyan kökündeki beş aktif bileşiğin kimyasal yapıları (Cao et al., 2017)....	18
Şekil 2-8: Sirtuin ailesinin hücre içi lokalizasyonları (Song et al., 2018)	21
Şekil 2-9: Sirtuin ailesinin hücresel fonksiyonları (Manjula, Anuja, & Alcain, 2021) ..	22
Şekil 4-1: Toplam oosit sayısı ve yaş arasındaki korelasyon	32
Şekil 4-2: Gruplara göre yaşların dağılımı	34
Şekil 4-3: Gruplara göre total gonadotropin dozu dağılımı	35
Şekil 4-4: Gruplara göre toplam folikül sayısı, toplam oosit sayısı ve MII oosit sayısı dağılımı	35
Şekil 4-5: Gruplara göre fertilizasyon oranları dağılımı.....	36
Şekil 4-6: OF ve EF gruplarının normalize edilmiş embriyo sayılarının karşılaştırılması	36
Şekil 4-7: EF grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Bar 20 µm.	39
Şekil 4-8: EF-DMSO grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Bar 20 µm.	40
Şekil 4-9: EF-LQ grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Bar 20 µm.	41
Şekil 4-10: OF grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Piknotik nükleus ok başları, apoptotik cisimcikler ok ile gösterilmiştir. Bar 20 µm.	42

Şekil 4-11: OF-DMSO grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Piknotik nükleus ok başları, apoptotik cisimcikler ok ile gösterilmiştir. Bar 20 µm.	43
Şekil 4-12: OF-LQ grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Bar 20 µm.	44
Şekil 4-13: EF grubuna ait GH ‘nin elektron mikroskobik görüntüsü görülmektedir. Lipid damlacığı (beyaz okbaşı), vakuol (asterisk), mikrovillus (siyah okbaşı).	46
Şekil 4-14: EF grubuna ait GH ‘nin elektron mikroskobik görüntüsü görülmektedir. Nükleus (N) nükleolus (n), vakuol (asterisk), mikrovillus (siyah okbaşı).	47
Şekil 4-15: EF-DMSO grubuna ait GH ‘nin elektron mikroskobik görüntüsü görülmektedir.	48
Şekil 4-16: EF-LQ grubuna ait GH ‘nin elektron mikroskobik görüntüsü görülmektedir. Nükleus (N), nükleolus (n), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).	49
Şekil 4-17: OF grubuna ait GH ‘lerinin elektron mikroskobik görüntüsü görülmektedir. Nükleus (N), nükleolus (n), mikrovillus (siyah okbaşı), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).	50
Şekil 4-18: OF-DMSO grubuna ait GH ‘lerinin elektron mikroskobik görüntüsü görülmektedir. Nükleus (N), nükleolus (n), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).	51
Şekil 4-19: OF-LQ grubuna ait GH ‘lerinin elektron mikroskobik görüntüsü görülmektedir. Nükleus (N), nükleolus (n), mikrovillus (siyah okbaşı), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).	52
Şekil 4-20: OF-LQ grubuna ait GH ‘nin elektron mikroskobik görüntüsü görülmektedir. Nükleus (N), nükleolus (n), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

LQ: Liquiritigenin

DMEM-F12: Dulbecco' nun modifiye edilmiş Eagle medyumunu ve besleyici F12 ham medyumunu

ROS: Reaktif oksijen radikalleri

İVF: İn vitro fertilizasyon

OS: Oksidatif stres

GH: Granüloza hücreleri

KH: Kümülsus hücreleri

HCG: İnsan koryonik gonadotropin

ZP: Zona pellusida

AMP: Adenozin monofosfat

AMPK: Adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz

ER α : Östrojen reseptörü α

FBS: Fetal sığır serumu

OF: Ovulatuvar faktör

EF: Erkek faktörü

DMSO: Dimetil sülfoksit

PBS: Fosfat buffer solüsyon

VKİ: Vücut kitle indeksi

YÜT: Yardımla üreme teknikleri

ÖZET

Usta, E. (2022). Ovulatuvar Faktörlü İnfertil Hastaların Granüloza Hücrelerinde Liquiritigenin 'in Etkilerinin İmmünohistokimyasal ve Elektron Mikroskopik İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

İnfertilite dünya genelinde her geçen gün artan küresel bir sağlık sorunudur. Granüloza hücrelerinin (GH) oosit beslenmesi ve olgunlaşmasının yanı sıra oosit sperm etkileşimi üzerinde de önemli bir role sahip olması, infertilite tanı ve tedavisinde GH'lerinin bir seçenek olarak ön plana çıkmasını sağlamaktadır.

Liquiritigenin (LQ) Glycyrrhiza radix'ten elde edilen anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-proliferatif ve östrojenik birçok etkiye sahip olan bir flavonoiddir. Çalışmamızda ovulatuvar faktör (OF, infertil) ve erkek faktörü (EF, sağlıklı bireyler) nedeniyle in vitro fertilizasyon (İVF) ünitesine başvuran hastaların oosit-kümüls komplekslerinden elde edilen GH'lerinde LQ'nun etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

OF ve EF nedeniyle İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İVF ünitesine başvuran hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. 20 OF ve 15 EF hastasından elde edilen GH'ler kültür ortamında EF, EF-Dimetil sülfoksit (DMSO), EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarına ayrıldı. Hücre kültüründe GH'lere 24 saat, LQ (40 µM) ve DMSO (5 µL) uygulandı. İmmünohistokimyasal boyama ile SIRT2 antikoruna boyanma şiddeti ve hücre morfolojisi değerlendirildi. Transmisyon elektron mikroskobu ile granüloza hücrelerinin ultrastrüktürü incelendi. Tüm grupların GH'lerinde hücre morfolojisi, nükleusları, sitoplazmik organelleri ve apoptotik gibi ultrastrüktürel değişiklikler karşılaştırıldı.

OF ve OF-DMSO gruplarının GH'lerinde SIRT2 immünohistokimyasal boyanma şiddeti, EF ve EF-DMSO gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır. EF-LQ ve OF-LQ gruplarının GH'lerinde SIRT2 boyanma şiddetinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı izlenmiştir. OF ve OF-DMSO gruplarının GH'lerinde apoptotik hücre morfolojisini yansıtan bulgular gözlenirken, OF-LQ grubunda ise daha az olarak gözlenmiştir.

Bu sonuçlar, kültür medyumuna eklenen LQ'nun GH ultrastrüktürü üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Bu bize LQ'nun İVF ünitelerinde alternatif bir medyum ajanı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, LQ'nun alternatif bir medyum ajanı olarak kullanımıyla ilgili deneysel ve klinik daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, Granüloza hücreleri, Liquiritigenin, SIRT2, Hücre kültürü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordinatörlüğü tarafından Araştırma Görevlisi Emel USTA'nın ÖYP bütçesi ile desteklenmiştir. Proje No: 393.2019-DR-35/27-01

ABSTRACT

Usta, E. (2022). Immunohistochemical and Electron Microscopic Investigation of the Effects of Liquiritigenin on Granulosa Cells of Infertile Patients with Ovulatory Factor. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Programme. PhD Thesis. İstanbul. 2022

Infertility is a global health problem that has been increasing day by day. The fact that granulosa cells (GCs) have an important role in the oocyte nutrition and maturation as well as the oocyte-sperm interaction makes them appear as an option in the diagnosis and treatment of infertility.

Liquiritigenin (LQ) is a flavonoid compound derived from *Glycyrrhiza radix*. This experimental study aimed to examine the effects of LQ on GCs obtained from patients treated in an in vitro fertilization (IVF) unit due to the ovulatory factor (OF, infertile) and male factor (MF, healthy individuals).

GCs obtained from patients were divided into groups as MF, MF Dimethyl sulfoxide (DMSO), MF-LQ, OF, OF-DMSO and OF-LQ. LQ (40 μ M) and DMSO (5 μ L) were applied to culture mediums of determined groups for 24 hours. SIRT2 staining intensity and cell morphology were evaluated by immunocytochemical staining. Ultrastructural morphologies of GCs were examined by transmission electron microscopy.

The intensity of SIRT2 immunoreactivity in GCs of OF and OF-DMSO groups was significantly decreased compared to those of MF and MF-DMSO groups. SIRT2 immunoreactivity increased significantly in EF-LQ and OF-LQ groups when compared to other groups. In OF and OF-DMSO groups, ultrastructural findings reflected apoptotic cell morphology but MF-LQ and OF-LQ groups showed less apoptotic cell morphology

These results demonstrate that LQ has positive in vitro effects on morphology and SIRT expression in GCs, suggesting that LQ can be used as an alternative medium agent in IVF procedures. However, further detailed studies are needed.

Key Words: Infertility, Liquiritigenin, Granulosa cells, SIRT2, Cell culture

This study was supported by the ÖYP budget of Research Assistant Emel USTA under the İstanbul University Teaching Staff Training Program (ÖYP) Coordinatorship. Project Number: 393.2019-DR-35/27-01.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü, infertiliteyi 12 ay veya daha fazla düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen klinik gebelik elde edilememesi ile ortaya çıkan üreme sistemi hastalığı olarak tanımlamıştır (J. W. Lee, Hyun, Kim, & Kim, 2021). İnfertilite vakalarının yaklaşık % 40-50'si kadın kaynaklı faktörlere bağlı olarak oluşmaktadır (Showell, Mackenzie-Proctor, Jordan, & Hart, 2017). Kadınlarda infertilite nedenleri, ovaryen bozukluklar (primer over yetersizliği ve polikistik over sendromu), tubal hasar, endometriozis ve uterin veya peritoneal bozukluklar olarak tanımlanmıştır (Yeste, Jones, Amdani, Patel, & Coward, 2016). Gebeliğin oluşması ve canlı doğum için kaliteli gamet, embriyo ve implantasyon için uygun maternal çevreye gerek duyulmaktadır. Günümüzde farmakolojik ve cerrahi tedaviler (çoğunlukla endoskopi) ile yardımcı üreme tekniklerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Fakat, gebelikte ve bunu takip eden doğumda istenilen başarı oranlarına ulaşamamıştır (Szamatowicz, 2016). Oositin içinde bulunduğu intrafoliküler çevre, fiziksel ve kimyasal koşullar ön plana çıkmaktadır.

Granüloza hücre (GH) ölümü, oositleri besleyici maddelerden, büyüme ve sağ kalım faktörlerinden ayırır ve östradiol biyosentezini azaltır (Tripathi, Shrivastav, & Chaube, 2013). Düşük östradiol seviyesi, folikülogenezisi etkiler, oosit kalitesini düşürür ve anormal erken embriyo gelişimine neden olur (Tiwari et al., 2015). Bütün bunlara bağlı olarak ovaryen bozukluklar ve infertilite ortaya çıkar. Klinik uygulamada in vitro ve in vivo da sağlıklı bir implantasyon ve gebeliğin gerçekleşmesi için granüloza ve oosit kalitesi önemli bir rol oynamaktadır (R. Krisher, 2004). Oositi çevreleyen kümülüs hücreleri, oosit olgunlaşmasına yardım ederken, oositi zararlı çevresel etkilere de korurlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar oosit ve çevresindeki foliküler hücreler arasındaki ilişkiye dikkat çekerek, granüloza hücrelerinin, oositin reproduktif potansiyeline ve canlılığına katkıda bulunduğunu açığa çıkarmıştır (Wyndham, Marin Figueira, & Patrizio, 2012).

Strese bağlı artan reaktif oksijen radikalleri (ROS)'nin, infertilite patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Agarwal, Aponte-Mellado, Premkumar, Shaman, & Gupta, 2012). Membran lipid peroksidasyonu ve proteinlerin oksidasyonu DNA hasarına neden olarak oosit, embriyo ve implantasyonu olumsuz yönde etkiler (Ruder, Hartman, Blumberg, & Goldman, 2008). Ayrıca hücre fonksiyonlarını da bozarak

hücrelerin apoptoza gitmesine neden olur. Bunun sonucunda oosit maturasyonu, ovulasyon ve fertilizasyon gibi süreçlerin bozulmasıyla infertiliteye neden olur (S. Wang et al., 2017). Hücre içinde üretilen ROS'lar oldukça karmaşık ve birbirleriyle ilişkili antioksidan sistemleri tarafından kontrol edilir (Al-Gubory, Fowler, & Garrel, 2010). Ayrıca diyetle alınan antioksidanlar da hücreleri oksidatif stresin neden olabileceği hasarlardan korumaktadır (Machlin & Bendich, 1987).

Hücre kültüründe kullanılan kültür medyumları oosit için oldukça önemlidir. Medyumlar hem hücreler için gerekli olan substratları sağlarken hem de uygun pH ve osmolarite gibi koşulların oluşmasına katkıda bulunurlar (Bouraki, Metallinou, Simopoulou, Charalabopoulos, & Asimakopoulos, 2012). İn vitro fertilizasyon (İVF) ünitelerinde kullanılan medyum ve tamponlarında spontan olarak ROS içerdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Grzelak, Rychlik, & Bartosz, 2001; Martín-Romero, Miguel-Lasobras, Domínguez-Arroyo, González-Carrera, & Alvarez, 2008). Bu durum bazı İVF ünitelerinde düşük gebelik ve implantasyon oranlarının nedeni olabilir. Kültür medyumlarında ROS üretimini kontrol eden antioksidan ürünlerin kullanımı oosit hasarını önleyerek İVF ünitelerinde daha iyi sonuçların elde edilmesine katkıda bulunabilir.

Ayrıca, ROS'un ovaryumlarda birikmesi oksidatif strese (OS) neden olur (Sharma, Biedenharn, Fedor, & Agarwal, 2013; Tripathi et al., 2013). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, artan ROS'un üreme potansiyelini olumsuz yönde etkilediğini ve granüloza hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir (Ávila, González-Fernández, Rotoli, Hernández, & Palumbo, 2016; Tripathi et al., 2013).

Antioksidanlar, diğer moleküllerin oksidasyonunu yavaşlatma veya önleme ve hücre hasara neden olabilecek serbest radikallerin üretimini azaltma potansiyeli taşımaktadır (Tiwari et al., 2015). Flavonoidlerden liquiritigeninin (LQ), hayvan ve hücre kültüründe oluşturulan modeller üzerinde yapılan çalışmalarda güçlü antioksidan özellik gösterdikleri bulunmuştur (Hajirahimkhan et al., 2015; Hidalgo, Sánchez-Moreno, & de Pascual-Teresa, 2010). Osteoblastlar üzerinde yapılan in vitro bir çalışmada ROS indüksiyonu ile oluşturulan hücre hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Choi, Suh, & Lee, 2014). Ayrıca deney öncesi LQ ile muamele edilen HepG2, AML12 hücrelerinde oluşturulmak istenen oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir (Jung, Lee, Kim, & Kim, 2017).

Doğal bir polifenolik bileşik ana sınıfı olan flavonoidler, bazı sebzelerde, kuruyemişlerde ve meyvelerde bulunur (Hollman & Katan, 1997). LQ, glycyrrhiza radix'ten izole edilen flavonoid bileşiklerinden biridir ve anti-hiperlipidemik, anti-inflamatuar, anti-alerjik ve östrojenik faaliyetler dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik özelliklere sahiptir (C. H. Huang, F. T. Wang, & W. H. Chan, 2019; S. M. Park et al., 2015). Ayrıca LQ'nun, antioksidan aktivitesi sayesinde ROS kaynaklı apoptoz ve hücre hasarına karşı embriyo, hepatosit, nöron ve osteoblastik hücreler üzerinde koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Chien-Hsun Huang, Fu-Ting Wang, & Wen-Hsiung Chan, 2019; Jung et al., 2017; Ramalingam, Kim, Lee, & Lee, 2018). Fakat LQ'nun insan granüloza hücreleri üzerine etkileriyle ilgili yeterli ve ayrıntılı bir çalışma yapılmamıştır. İVF merkezlerinde LQ'nun başta granüloza hücreleri için alternatif bir medyum ajanı olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmak amacıyla, granüloza hücre morfolojisi ve ultrastruktürü üzerine etkilerini, SIRT2 immünositokimyasal boyaması ve elektron mikroskopuyla değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

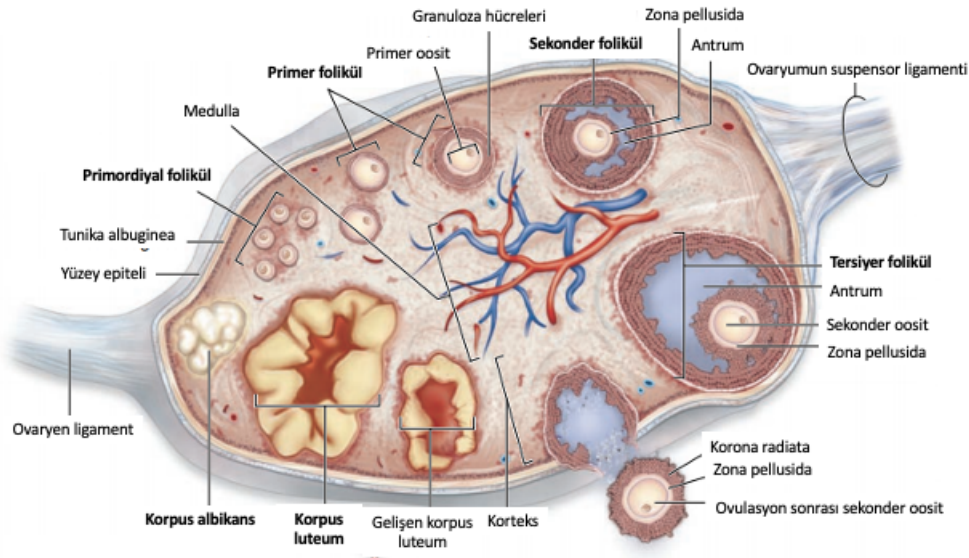
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumlar

Ovaryumlar doğum yapmamış kadınlarda (nullipar) yaklaşık olarak 3 cm uzunluğunda, 1,5 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığında, oval şekilli, pembemsi beyaz görünümde yapılardır. Her ovaryum tek katlı kübik epitel (germinal epitel) ile çevrilidir ve mezoovaryum denilen peritoneal katlantı aracılığıyla broad ligamente bağlanır. Ovaryumun süperior kutbu suspensor ligament aracılığı ile pelvis duvarına bağlanırken inferior kutbu ovaryen ligament aracılığı ile uterusu bağlanır (Mescher, 2016; Pawlina, 2016).

Ovaryumların çevresi germinal epitel olarak bilinen tek katlı kübik hücrelerle çevrilidir. Bu epitelin altında testistekine benzer şekilde tunika albuginea adı verilen tıkmaz bağ dokusundan oluşan yapı yer almaktadır. Ovaryumlar korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Ovaryumların çoğunluğunu oluşturan korteks medullayı çevreleyen ve menarştan sonra boyutları farklılık gösteren birçok ovaryum folikülü içerir. Bu foliküllerin çevresi yoğun hücreli bağ dokusu ve dağınık düz kas lifleri içeren bir stromayla sarıdır. Medulla ise hilumdan giren kan damarları, lenf damarları, sinirleri ve onları çevreleyen gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır (Şekil 2-1) (Gartner, 2017; Pawlina, 2016).

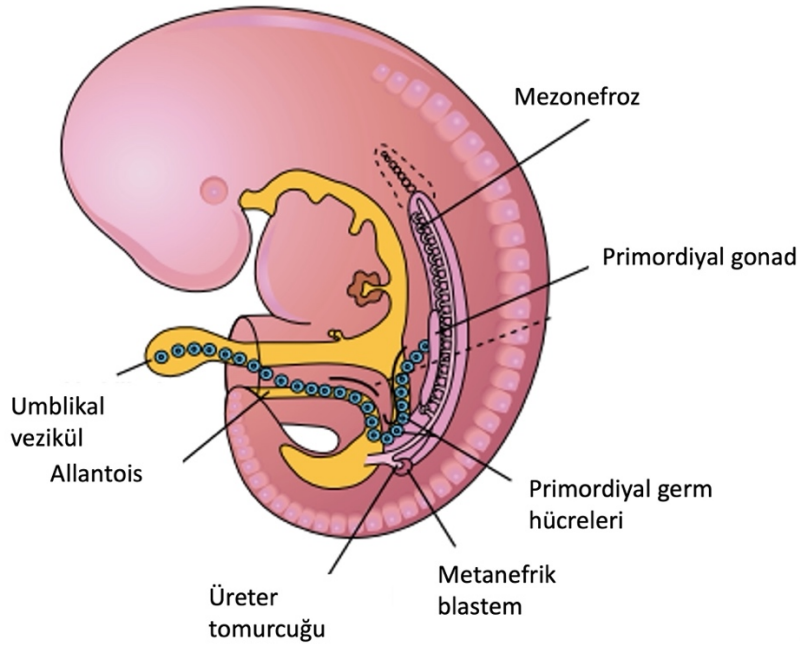
Ovaryumlar dişi gamet üretimi, östrojen ve progesteron sekresyonu, reproduktif organların postnatal büyümesinin regülasyonu ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumludur (Kierszenbaum, 2019; Mescher, 2016; Pawlina, 2016).



Şekil 2-1: Overin genel yapısı ve folikül gelişimi (Mescher, 2016)

2.2. Oositlerin erken dönem gelişimi

Ovaryumdaki foliküllerin gelişimi inutero olarak embriyonik yaşamın 24. gününde yolk sac kesesinin duvarında oluşan primordial germ hücreleri ile başlar. 4. ve 6. haftalar arasında primordial germ hücreleri yolk sac kesesinin duvarından dorsal mezenter aracılığıyla gonad taslaklarına göç ederler (Şekil 2-2). Burada mitotik bölünmeler geçirerek oogonyumlara farklılaşırlar. Fetal gelişimin 2. ayında yaklaşık olarak 600.000 kadar oogonyum bulunmaktadır (Sadler, 2019). Tüm oogonyumlar 3. ayın erken döneminde mayoz bölünmeye başlarlar ancak, 5. ayda birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde dururlar. Bu aşamadan sonra primer oosit olarak adlandırılırlar ve seksüel olgunlaşma gerçekleşene kadar bu aşamada beklerler. Etraftaki bağ dokusu hücreleri tek katlı yassı bir tabaka halinde primer oositin çevresini sararak folikül hücrelerini oluştururlar. Folikül hücreleri ve primer oositten oluşan bu yapıya primordial folikül denir. Yaklaşık 7 milyondan fazla sayıya ulaşan foliküller sonradan dejenere olarak doğumda 700.000 – 2 milyon, pubertede ise 400.000 kadar kalırlar (Mescher, 2016; Keith L. Moore, 2013; Schoenwolf, 2008).



Şekil 2-2: Primordiyal germ hücrelerinin göçünü gösteren 5 haftalık embriyo taslağı (Keith L Moore, Persaud, & Torchia, 2018)

2.3. Folikül gelişimi

Primordiyal foliküller embriyonik gelişimin 12. haftasında gonad taslağında oluşmaya başlarlar. Bu foliküller ovaryumun yüzeyel korteks tabakasında tunika albugineanın hemen altında yer alırlar. Yaklaşık 25 µm çapında primer oositi içeren primordiyal foliküller gelişimin 5. ayında maksimum sayıya ulaşırlar (7 milyon). Bu foliküllerin büyük bir kısmı dejenere olur ve doğumda 700.000 - 2 milyon , pubertede ise sadece 400.000 folikül geriye kalır. Puberteyle beraber hipofizden folikül uyarıcı hormonun (FSH) salınması ile primordiyal folikül büyümeye başlarken, oositte, folikül hücrelerinde ve çevresindeki stromada değişiklikler görülür. Folikül hücrelerinin çoğalarak kübik bir hal almasıyla oluşan foliküle, primer folikül denir (Şekil 2-3). Primer folikül evresinde oosit çapı artarak 120'µm ye kadar ulaşır ve zona pellusidayı oluşturacak olan ekstraselüler proteinleri salgılar. Folikül hücrelerinin tek sıra halinde oositi çevreleyen erken evredeki formuna tek katmanlı (unilaminer) primer folikül denir. Folikül hücrelerinin mitoz bölünmeyle çoğalması ve çok katlı bir tabaka halini almasıyla ise çok katmanlı (multilaminer) primer folikül oluşur. Bu aşamadaki folikül hücrelerine granüloza hücreleri adı verilir (Pawlina, 2016; Schoenwolf, 2008).

Granüloza hücrelerinin çoğalmasıyla beraber folikülü çevreleyen bazal membranın dışındaki stromal hücreler teka folikülü oluştururlar. Teka folikülü teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki tabakaya farklılaşır. Teka interna iyi vaskülarize, kübik hücrelerin bulunduğu foliküle komşu olan iç kısımdır. Bu hücrelerde çok sayıda luteinizan hormon (LH) reseptörleri vardır. LH etkisiyle sentezlenen androstenedion granüloza hücrelerine geçer ve aromataz enzimi aracılığıyla östrojen sentezinde kullanılır. Teka eksterna ise fibroblast ve düz kaslardan oluşan dış kısımdır (Kierszenbaum, 2019; Mescher, 2016).

Granüloza hücrelerinin çoğalması ve oositin maturasyonu ile büyüyen primer folikül korteksin derinliklerine ilerler. Granüloza hücreleri, hücreler arası boşluğa folikül sıvısı (likör folikülü) denilen hiyaluronik asitten zengin bir sıvı salgılamaya başlar. Biriken bu sıvı hücreleri birbirinden uzaklaştırarak boşluklar oluşturur. Boşlukların birleşmesiyle antrum adı verilen tek bir boşluk meydana gelir ve bu aşamadan sonra folikül artık sekonder folikül yada antral folikül olarak adlandırılır (Şekil 2-3). Folikül büyümeye devam ederken 125 µm çapa ulaşan oosit, granüloza hücreleri tarafından salınan oosit maturasyon inhibitörü (OMİ) etkisiyle daha fazla büyümmez. Artan sıvıyla beraber büyüyen antruma doğru oosit ve etrafındaki granüloza hücreleri kümülüs ooforus adında bir çıkıntı oluşturur, geri kalan granüloza hücreleri ise mural granüloza hücreleri olarak adlandırılır. Oositin etrafını çevreleyen zona pellusidayı penetre ederek oositele bağlantı kuran granüloza hücrelerine ise korona radiata denmektedir (Gartner, 2017; Pawlina, 2016).

Folikül boyutunun 20-25 mm'ye kadar ulaştığı, tek bir büyük boşluğun bulunduğu foliküle olgun ya da graaf folikül denir (Şekil 2-3). Folikülün son aşamaya ulaşmasıyla beraber granüloza hücrelerinin mitotik aktiviteleri azalır ve mural granüloza tabakası incelir. Teka tabakaları kalınlaşarak daha belirgin hale gelir. Teka eksterna bağ dokusu kapsül benzeri bir yapı oluştururken teka interna iyi vaskülarize, küçük lipid damlacıklarından zengin uzun hücrelerin bulunduğu bir tabaka halini alır (Pawlina, 2016).

Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce olgun folikül tarafından üretilen östrojen seviyeleri kanda yeteri kadar yükselir. Bunun sonucunda negatif geri besleme ile hipofiz bezindeki FSH üretimi inhibe olurken, LH seviyesindeki ani artışla primer oosit birinci mayotik bölünmesini tamamlayarak sekonder oositi ve birinci polar cismi oluşturur.

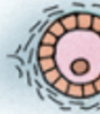
Sekonder oosit fertilizasyon olana kadar ikinci mayotik bölünmenin metafaz evresinde duraklar (Gartner, 2017; Kierszenbaum, 2019; Mescher, 2016; Pawlina, 2016).

**Primordiyal
folikül**



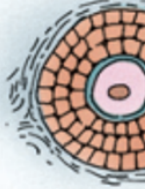
Folikül hücreleri
Oosit

**Unilaminer
primer
folikül**



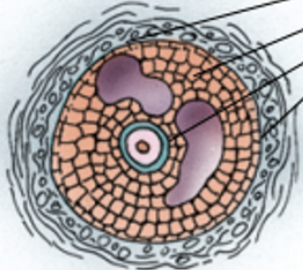
Bazal lamina
Folikül hücreleri

**Multilaminer
primer folikül**



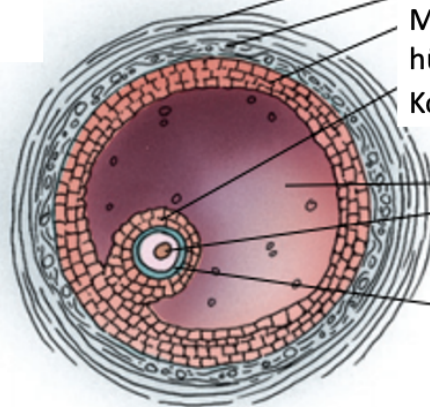
Teka tabakası
Zona pellusida
Folikül hücreleri

**Sekonder
folikül**



Teka tabakası
Granüloza hücreleri
Zona pellusida
Bazal membran

**Graaf
folikül**



Teka eksterna
Teka interna
Mural granüloza
hücreleri
Korona radiata
Antrum
Oosit
Zona pellusida

Şekil 2-3: Folikül gelişimi (Gartner, 2017)

2.4. Ovulasyon

Olgun folikülden sekonder oositin serbestleşmesine ovulasyon denir (Şekil 2-1). Menstruel siklusun 14. Gününde LH pikiyle beraber ovaryuma kan akışı artar ve teka eksternadaki kapillerlerden plazma sızıntısına bağlı olarak ödem meydana gelir. Oluşan ödemle beraber histamin, prostoglandin, kollojenaz ve aktive plazminojen seviyeleri artar. Folikül gelişimiyle beraber foliküler sıvıdaki proteoglikan ve hyalironik asit miktarının artması suyun içeriye difüze olmasını sağlayarak foliküler sıvının hacminin ve basıncının yükselmesini sağlar (Gartner, 2017).

Ovulasyondan hemen önce matür folikülün tunika albugineaya basınç uygulayan kısmındaki over yüzeyinde kan akımı durur. Stigma ya da makula pellusida olarak adlandırılan bu avasküler kısımda aktive olan plazminojenlerin enzimatik proteolizi ile duvar yıkılır. Prostaglandinlerin etkisiyle teka eksterna tabakasındaki düz kas liflerinin kasılması sekonder oosit ve ona eşlik eden folikül hücrelerinin, folikül sıvısı ile beraber ovaryumdan ayrılmasını sağlar. Sekonder oositi içeren kümülus kitlesi tuba uterinanın fimbriyaları tarafından ostiuma doğru süpürülür ve tuba uterinaya alınır (Pawlina, 2016).

Menstruel siklus ortalama 28 gün olarak kabul edilmesine rağmen bazı sikluslar daha uzun veya daha kısa sürebilmektedir. Ancak ovulasyon her zaman mensturasyonun başlangıcından 14 gün önce gerçekleşmektedir (Kierszenbaum, 2019; Mescher, 2016; Pawlina, 2016).

2.5. Korpus luteum

Ovulasyondan sonra geride kalan granüloza hücreleri ve teka interna ovaryum korteksinde tekrar organize olarak hormon salgılayan bir bez yapısına, korpus luteuma dönüşür (Şekil 2-1). Başlangıçta bazal membranın yırtılması ve oositin atılmasıyla folikül içeriye doğru çökerek katlantılı bir hal alırken, rüptüre olan kan damarlarından folikül boşluğuna kan akışı olur. Folikül boşluğuna dolan bu kan pıhtılaşarak korpus hemorajikum denilen geçici yapıyı oluşturur. Teka hücrelerinin de foliküler boşluğa invaze olmasıyla oluşan bu yapı LH, östradiol, insülin benzeri büyüme faktörü 1-2, insan koryonik gonadotropin ve prolaktin etkisiyle korpus luteuma farklılaşır. Granüloza ve teka hücreleri sırasıyla granüloza lutein ve teka lutein hücrelerine

farklılaşarak luteinizasyon adı verilen süreci tamamlarlar. Granüloza lutein hücreleri korpus luteumun merkezinde yer alan daha büyük boyutlu hücrelerdir. Tek lutein hücreleri ise korpus luteumun periferinde yerleşmiş daha küçük ve daha koyu boyanma özelliği gösterirler. Her iki hücre de ultrastrüktürel olarak steroid sentezleyen hücreler gibi sitoplazmalarında artan sayı ve boyutta lipid damlacıkları içermektedir (Gartner, 2017; Pawlina, 2016).

Kan ve lenf damarlarından zengin bir yapı halini alan korpus luteum over korteksinde yer almaktadır. LH etkisiyle yüksek miktarda progesteron ve androstenedion sentezleyen korpus luteum gelişmekte olan zigotun implantasyonu için uterus ve endometriyumun hazırlanmasını sağlar. LH sekresyonu 12-14 gün boyunca devam ederek korpus luteumun devamlılığını sağlar. Fertilizasyon ve sonrasında gerçekleşen implantasyonla beraber trofoblast hücrelerinden salgılanan insan koryonik gonadotropin (hCG), LH benzeri etki göstererek korpus luteumun dejenere olmasını önler ve böylece korpus luteum gebeliğin 4-5. ayına kadar progesteron ve östrojen sentezlemeye devam eder (Mescher, 2016).

Fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşmediğinde, yeterli hormonal uyarıyı alamayan korpus luteum ovulasyondan sonra yaklaşık 14. günde dejenere olur ve korpus albicans denilen yapıyı oluşturur (Kierszenbaum, 2019; Mescher, 2016; Pawlina, 2016).

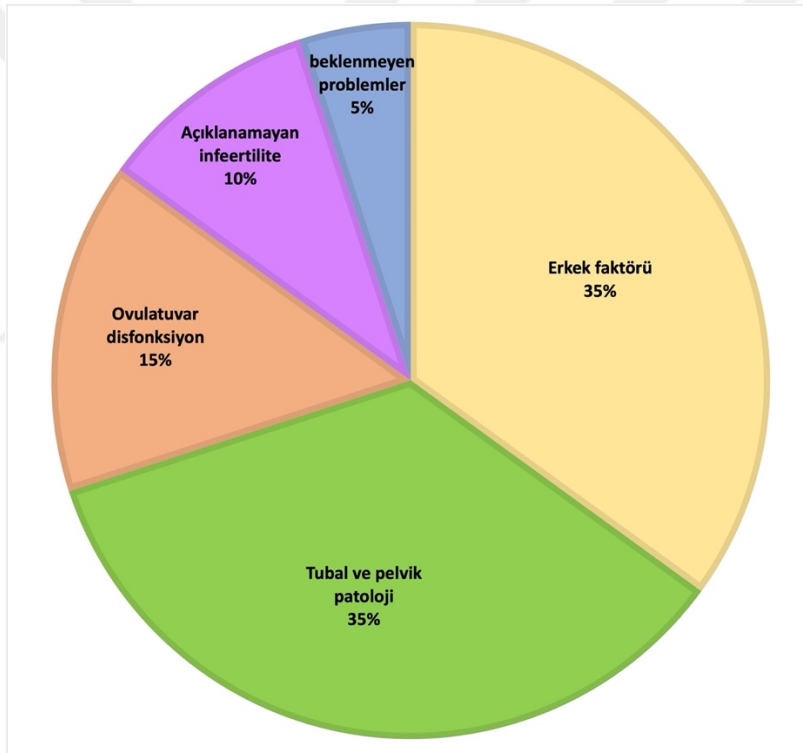
2.6. İnfertilite

İnfertilite, cinsel olarak aktif bir çiftin bir yıl korunmasız cinsel ilişkiden sonra gebelik elde edememesi olarak tanımlanır ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından hastalık olarak kabul edilmektedir (Yeste et al., 2016). Dünya genelinde çiftlerin yaklaşık olarak %10-16'sını etkileyen bir problemdir (Fidler & Bernstein, 1999). İnfertiliteden etkilenen insan sayısının azaltılması birçok sağlık kuruluşunun birincil önceliği haline gelmiştir.

Üreme çağındaki kadınlarda infertilite prevalansı gelişmiş ülkelerde ortalama olarak yedi çiftten birinde görülürken, gelişmekte olan ülkelerde dört çiftten birinde görülmektedir. Bu oran bölgeler arasında farklılıklar göstermektedir. Güney Asya, Afrika, Orta-Doğu gibi bölgelerde infertilite oranları %30'lara ulaşabilmektedir (Vander Borght & Wyns, 2018). Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması (TNSA) verilerine göre ise; Türkiye'de 15-49 yaş arasında evli olup çocuk sahibi olmayan kadınların oranı %4

olarak belirlenmiştir (Uçan, Taşçı, & Ovayolu, 2008). Türkiye’de infertilite sıklığı açısından kesin bilgiler bulunmamaktadır ancak bu oranın % 10-15 olduğu ve giderek arttığı düşünülmektedir (Çelik & Kırca, 2018).

İnfertilite nedenleri çeşitli toplumlarda farklılık gösterebilmekle beraber başlıca ovulatuvar disfonksiyon (% 20-40), tubal ve peritoneal patolojiler (% 30-40) ve erkek faktörü (% 30-40) nedeniyle olmaktadır (Şekil 2-4) (Speroff & Fritz, 2005). İnfertilite ile başvuran çiftlerin yaklaşık olarak % 85’inde neden belirlenebilmektedir. Geri kalan % 15 hastada ise neden bulunamamakta ve açıklanamayan infertilite olarak adlandırılmaktadır (Carson & Kallen, 2021).



Şekil 2-4: İnfertilite nedenleri (Speroff & Fritz, 2005)

Doğurganlık oranları yaş, çevresel faktörler, genetik hastalıklar, akut veya kronik hastalıklar, geçirilmiş operasyonlar gibi bir çok faktörden etkilenebilir (Control & Prevention, 2014).

Kadınlarda görülen infertilite nedenleri ovulatuvar faktörler % 40, tubal ve pelvik patolojiler % 40, açıklanamayan nedenler % 10 olarak görülmektedir. Ovulatuvar

faktörler arasında; ovulasyon düzensizliği, hipofiz-over aksında görülen hormonal bozukluklar, over tümörleri veya menapoz gibi faktörler sayılabilir (Brugo-Olmedo, Chillik, & Kopelman, 2001).

Yaşam tarzı, obezite ve sigara gibi çevresel faktörler fertilitiyi olumsuz etkilemektedir ancak kadında fertilitiyi etkileyen en önemli faktör yaştır (Vollenhoven & Hunt, 2018).

Günümüzde yaşam koşullarının modernleşmesi, kadınların iş hayatında daha aktif rol almaları, çiftlerin daha ileri yaşlarda çocuk sahibi olmak istemelerine neden olmakta ve ilerleyen yaşla birlikte yardımcı üreme tekniklerine olan ihtiyaç artmaktadır (Infertility, 1991; Vollenhoven & Hunt, 2018).

Fertilitenin yaşa bağlı olarak azalmasından oksidatif stresin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (J. P. de Bruin et al., 2002). Sağlıklı bir vücutta ROS ve antioksidanlar belli bir denge halindedir. Hücreler çok çeşitli antioksidan sistemler aracılığıyla ROS etkilerini kısıtlarlar. Ancak yaşla beraber bu dengenin oksidatif stres yönüne döndüğü ve kadınlarda infertiliteye neden olduğu artan çalışmalarla gösterilmiştir (Agarwal, Gupta, & Sharma, 2005).

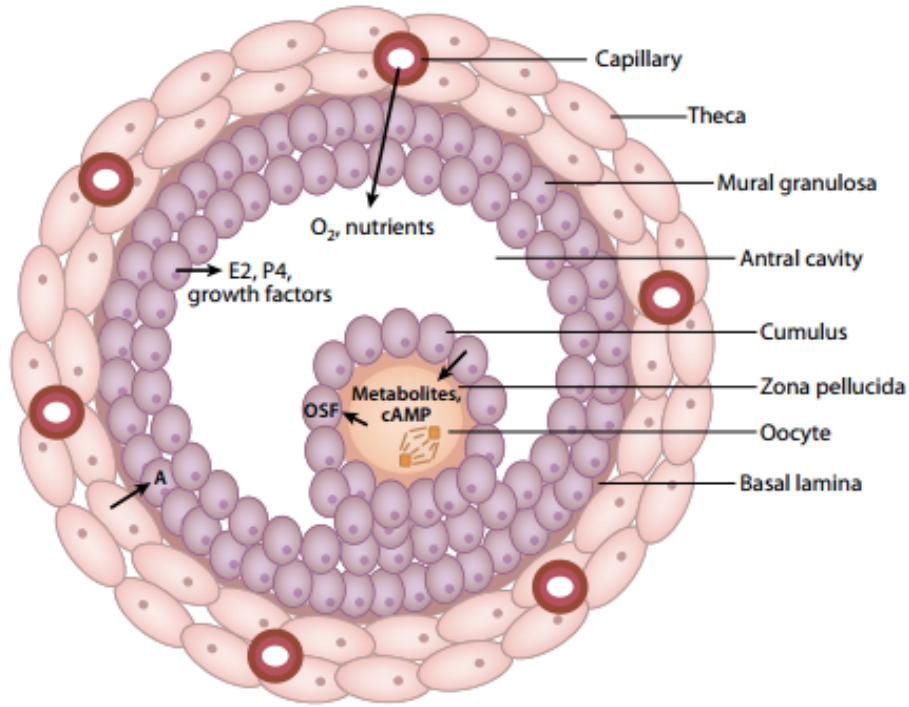
ROS ve antioksidanların dişi üreme sistemi metabolizmasında anahtar rol oynadıkları kabul edilmektedir (S. Wang et al., 2017). ROS'lar foliküler büyümeyi, oosit olgunlaşmasını, fertilizasyonu, emriyo implantasyonu ve gelişimi gibi üreme süreçlerinde önemli bir role sahiptir (Kala, Shaikh, & Nivsarkar, 2017). Folikül tarafından üretilen ROS oosit maturasyonu ve folikülün rüptüre olması için gerekli olan stimülasyonu sağlamaktadır. Ancak aşırı ROS üretimi hücre hasarına neden olmaktadır.

Günümüzde hastalara infertilite nedenine göre farmakolojik tedavi, cerrahi tedavi ve yardımcı üreme teknikleri olmak üzere üç tane tedavi uygulanmaktadır. Geçtiğimiz yüzyılda YÜT'de büyük ilerlemeler kaydedilmiştir ancak bütün bunlara rağmen YÜT'leri gebeliği ve canlı doğumu garantileyememektedir (Wojsiat, Korczyński, Borowiecka, & Żbikowska, 2017).

2.7. Oosit ve Kümülus hücre etkileşimi

Teka hücreleri, granüloza hücreleri, kümülüs hücreleri ve oositin kendisi, hem foliküler büyümeyi hem de oosit yeterliliğini kontrol etmek için karmaşık bir sinyal etkileşimi içindedir. Bu çevre içinde, oosit ve onu çevreleyen kümülüs hücreleri, her

hücrenin birbiriyle iletişim içinde olduğu dinamik işlevsel bir birim oluşturur (Şekil 2-5). Oositin gerekli faktörleri üretip sekrete etme yeteğinin yanında, kümulus hücrelerinin bu faktörlere uygun yanıt verme yeteneği, bu birimin ve dolayısıyla oositin gelişiminde etkilidir.

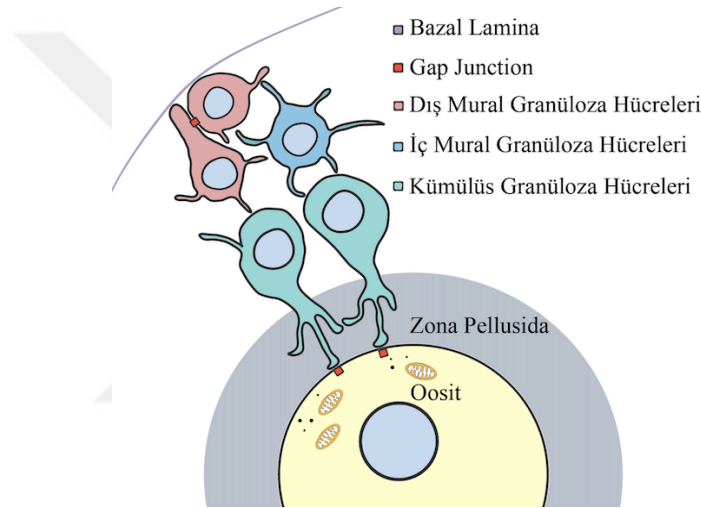


Şekil 2-5 Foliküler ortamın korunmasında ve oosit yeterliliğinin belirlenmesinde rol oynayan preovulatuar foliküle ait diyagram. Kısaltmalar: A: Androjen; cAMP: Siklik AMP; E2: Östrojen; OSF: Oositten salgılanan faktörler (Dumesic, Meldrum, Katz-Jaffe, Krisher, & Schoolcraft, 2015)

Kümulus hücreleri oositi çevreleyen somatik hücrelerdir (Turathum, Gao, & Chian, 2021). Folikülogenezisin ilerlemesiyle folikül içinde antrum oluşur ve oositi çevreleyen somatik hücreler yani granüloza hücreleri, kümulus-oosit kompleksini oluşturmak üzere kümülüs ve mural granulosa hücrelerine farklılaşırlar (Şekil 2-6) (Diaz, Wigglesworth, & Eppig, 2007). Mural granüloza hücreleri folikül duvarında bulunurken, kümülüs hücreleri zona pellusidayı geçerek gap junctionlar aracılığı ile oosit ile bağlantı kurarlar (Kidder & Mhawi, 2002). Kümülüs hücreleri ve oosit arasındaki yakınlık, oositin gelişimi için çok önemli olan çift yönlü iletişimi destekler (Biase & Kimble, 2018). Kümulus hücreleri oosit gelişimi ve mayotik maturasyonu için

metabolik destek sağlarken, oosit de kümülüs hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını destekleyen büyüme faktörlerini salgılar (Gilchrist, Ritter, & Armstrong, 2004).

Folikül içinde yerleşimlerinin farklı olmasının yanı sıra kümulus hücreleri ve mural granüloza hücrelerinin işlevleri de farklıdır (Şekil 2-6). Kümulus hücreleri oosit gelişimini destekleyerek hyaüronik asit sentezlerken, mural granüloza hücreleri sahip oldukları LH reseptörleri ve aromataz enzimi sayesinde endokrin fonksiyonların yürütülmesini ve folikül gelişimini desteklerler (Abedini Najafabadi, 2016; Strauss III, Modi, & McAllister, 2014).



Şekil 2-6: Çeşitli granüloza hücre alt gruplarının şematik görünümü (Usta E, 24 Oct. 2022)

Kümulus granüloza hücrelerinin ve mural granüloza hücrelerinin morfolojik görünüşleri de birbirinden farklıdır. Mural granüloza hücreleri yoğun, koyu sitoplazmaya sahip epitel benzeri bir görünüme sahiptir. Kümulus granüloza hücreleri ise gevşek, berrak sitoplazmalı ve yuvarlak bir şekle sahiptir (Turathum et al., 2021).

Kümulus granüloza hücrelerinin oluşumu, oosit tarafından salgılanan faktörler tarafından düzenlenirken, mural granüloza hücrelerinin oluşumu ise hipofiz bezinden salgılanan folikül stimülasyon hormonunun (FSH) düzenlenmesi altındadır (Diaz et al., 2007).

LH tarafından uyarılan mayotik olgunlaşma, oositin kendisinden ziyade onu çevreleyen granüloza hücreleri üzerindeki etkisiyle gerçekleşir (Mehlmann, 2005).

Çoğalan kümulus hücreleri, LH piki ile beraber aşırı çoğalır ve kapladığı alan genişler (Lin et al., 2009). Kümülüs hücrelerinin genişleme özelliğinin, normal oosit gelişimi, ovulasyon ve döllenme için kritik olduğu gösterilmiştir (Vanderhyden, Macdonald, Nagyova, & Dhawan, 2003). KH'lerin genişlemesinin; ovulasyon sırasında foliküllerden oosit-kümülüs kompleksinin salınmasının kolaylaştırılması, oviduktal fimbriyalar tarafından yakalanması, oviduktardan geçiş ve ovule olmuş oositin oviduktarda canlılığının korunmasında etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Hess, Chen, & Larsen, 1999; Salustri, Fulop, Camaioni, & Hascall, 2004). Ayrıca kümulus genişlemesi sperm aktivasyonu ve motilitesi için de uygun mikro çevrenin oluşturulmasını sağlar (L. Chen, Russell, & Larsen, 1993; Tesařík, Pilka, Drahorad, Čechová, & Veselský, 1988).

Lipid damlacıklarının oosit ve KH'lerinde yaygın olarak dağıldığı bulunmuştur. Lipid damlacıkları oosit olgunlaşması ve preimplantasyon dönemi embriyonik gelişim için enerji oluşumunu sağlayan ana maddedir (Uhde, van Tol, Stout, & Roelen, 2018). Ayrıca oositler enerji ihtiyacını karşılamak için yeterli glikoz üretemediğinden, kümulus hücreleri glikozu piruvata metabolize ederek oosite gönderirler (Su, Sugiura, & Eppig, 2009).

Tüp bebek sonuçlarını iyileştirmek için en iyi oositlerin seçilmesi gerekmektedir. Daha kaliteli oositlerin seçilmesiyle ilgili temel zorluk, gelişimsel olarak yetersiz oositlerin kaliteli olanlarla morfolojik açıdan tam olarak ayırt edilememesinden kaynaklanmaktadır. Bunun önüne geçebilmek için tüp bebek merkezlerinde yetkin oositleri seçmek için yaygın olarak invaziv ve noninvaziv yöntemler kullanılmaktadır. Noninvaziv yöntemler morfolojik değerlendirme şeklinde yapılmaktadır. Yüksek kaliteli oositler seçilirken kümülüs kompleksi, zona pellucida, perivitellin boşluk, oositlerin şekli ve hacmi, birinci polar cisim ve ooplazma gibi bir çok özellik morfolojik açıdan değerlendirilmektedir (Lasienė, Vitkus, Valanėiūtė, & Lasys, 2009).

2.8. Hücre kültüründe kullanılan medyumlar

1882'de Sydney Ringer adlı doktorun salin solüsyonu kullanarak kurbağadan alınan kalbin dış ortamda atmaya devam etmesini sağlamasıyla kültür medyumlarının çağı başlamıştır. Hücre kültüründe en önemli faktör kullanılan medyumlardır. Medyumlar hücresel fonksiyonları desteklemesinin yanısıra canlılık ve proliferasyon için gerekli olan maddeleri, uygun pH ve osmolariteyi sağlarlar (Bouraki et al., 2012;

Yao & Asayama, 2017). Genel olarak kültürde kullanılan medyumlar doğal medyumlar ve yapay (sentetik) medyumlar olarak ikiye ayrılırlar (Tablo 2-1) (Arora, 2013).

Doğal medyumlar biyolojik sıvılardan elde edilirler. Çok çeşitli hayvan hücresi kültüründe kullanılabilirler ancak bileşiminin tam olarak bilinmemesi en büyük dezavantajıdır. Sentetik medyumlar inorganik tuzlar, besin maddeleri, vitaminler, proteinler, karbonhidratlar, esansiyel ve sıklıkla esansiyel olmayan amini asitler, büyüme faktörleri eklenerek hazırlanırlar (Arora, 2013; Morgan, Morton, & Parker, 1950).

İVF’te kullanılan ilk medyumlar doğal medyumlar kategorisinde iken zaman ilerledikçe sentetik medyumların bileşiminin kontrol edilebilir olması tüp bebek laboratuvarlarında tercih edilmelerini sağlamıştır (Chronopoulou & Harper, 2015).

Tablo 2-1: Doğal ve sentetik medyum çeşitleri (Arora, 2013)

Doğal medyumlar	Biyolojik sıvılar	Plazma, serum, lenf sıvısı, insan plasental kord serumu, amniyotik sıvı, insan tubal sıvısı
	Doku ekstraktları	Karaciğer, dalak, kemik iliği, ve lökosit ekstresi
	Kandan elde edilen materyaller	Pıhtı
Sentetik medyumlar	Dengeli tuz solüsyonu	PBS, DPBS, HBSS, EBSS
	Bazal medyum	MEM, DMEM
	Kompleks medyum	RPMI-1640, IMDM

2.8.1. İVF’te kullanılan medyumlar

İlk olarak 1929 ’da Lewis ve Gregory’nin in vitro ortamda plazmayı kullanarak tavşan embriyolarının gelişimini incelemesi İVF’te kullanılan kültür medyumlarının

temelini atmıştır (Lewis & Gregory, 1929). Daha sonra Kuhl'un 1941'de ilk kez fare embriyolarını kan pıhtısı üzerinde kültüre etmesiyle kullanılan medyumların içerikleri değiştirilmeye ve geliştirilmeye başlanmıştır (Kuhl, 1941).

Bu süreçte dengeli tuz çözeltileri, glukoz, yumurta akı (Krebs & Henseleit, 1932), otolog serum, hayvansal kaynaklı serum (McLaren & Biggers, 1958), antibiyotik, albumin ve amino asid (Brinster, 1963) gibi çeşitli maddelerin kültür medyumuna eklenmesinin yanı sıra embriyonun ovidukt epitel hücreleri ile ko-kültür yapılması (Brinster & Biggers, 1965) gibi çeşitli denemeler yapılmıştır. Whittingham 1968 yılında farelerde yaptığı çalışmalarda ilk defa İVF ve embriyo kültüründe, modifiye edilmiş Krebs-Ringer bikarbonat solusyonu, sodyum laktat, sodyum pirüvat, glukoz, sığır serumu, streptomisin ve penisilinin kullanarak başarılı sonuçlar elde ettiğini bildirmiştir (Whittingham, 1968).

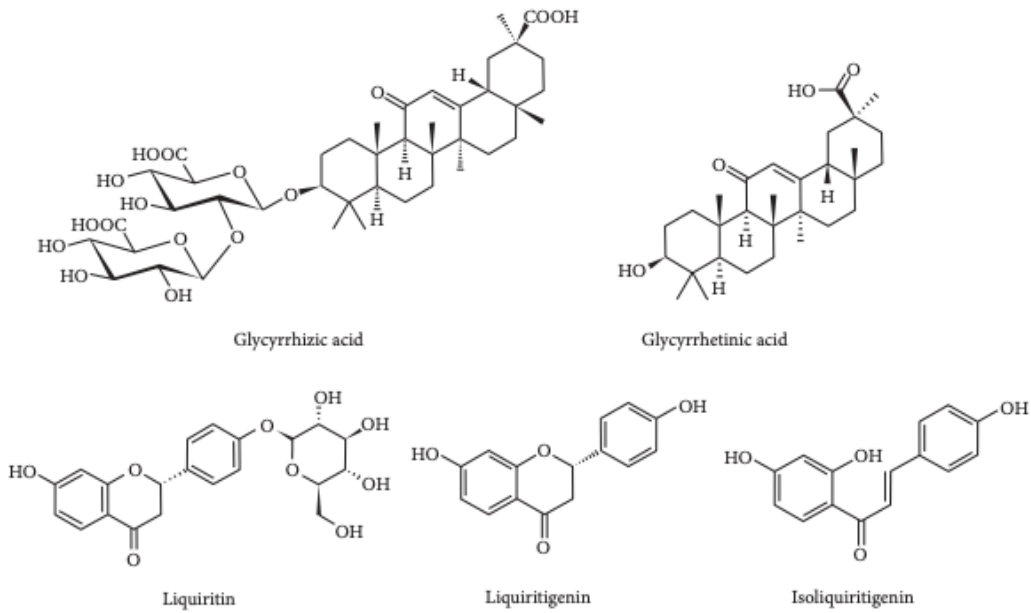
İVF'te kullanılan kültür medyumlarındaki büyük ilerleme 1978'de ilk İVF bebeğinin doğmasını sağlamıştır (Fishel, 2018). Oositlerin ve embriyoların besin ihtiyaçlarının ve çevresel gereksinimlerinin daha iyi anlaşılması için yapılan çalışmalar, İVF'te uygulanan kültür koşullarında ilerlemelere yol açarak, gebelik oranlarının yükselmesini sağlamıştır (Goldberg, Falcone, & Attaran, 2007). Protein, enerji substratları, hormonlar, büyüme faktörleri, pH, oosit tarafından salgılanan faktörler ve antioksidanlar gibi oosit gelişim potansiyelini etkileyen bir çok etkenin in vitro ortamda oosit kalitesi üzerindeki etkisi incelenmektedir (Chronopoulou & Harper, 2015).

Günümüzde oosit toplanması prosedürlerinde, İVF ve mikromanipülasyon süresince ve embriyo gelişiminin çeşitli aşamalarında farklı içeriklere sahip ticari medyum çeşitleri kullanılmaktadır. Kullanılan medyumlar genellikle tuz, enerji substratları, serum takviyeleri, amino asitler, tampon çözeltileri, antibiyotikler, vitaminler, nükleotitler, büyüme faktörleri, eser elementler ve nükleaz inhibitörleri vb. maddeleri içermektedir (Chronopoulou & Harper, 2015). Ancak oosit toplanması sırasında heparin, gentamisin içeren bikarbonatlı HEPES tamponlu (buffer) medyumlar veya insan tubal sıvısı kullanılırken, İVF ve mikromanipülasyonlar esnasında parafin yağ altında protein katkılı bikarbonat tamponlu medyumlar kullanılmaktadır. Bir çok şirket oluşturdıkları kendi ticari markalarını piyasaya sürmektedir ve içeriklerini tam olarak açıklamamaktadır (Chronopoulou & Harper, 2015).

Kültür ortamındaki tüm bu değişikliklere rağmen, medyum bileşiminin embriyo kalitesi ve IVF başarı oranlarını etkileyip etkilemediği veya hangi kültür ortamının en iyi IVF başarı oranlarına yol açtığı hala belirsizdir (Mantikou et al., 2013).

2.9. Liquiritigenin

Flavanoidler doğal polifenolik bileşiklerin ana sınıfıdır ve çoğunlukla sebzelerde, kuruyemişlerde, şifalı bitkilerde, meyvelerde ve içeceklerde bulunurlar (C. H. Huang et al., 2019). Meyan kökü olarak da bilinen *glycyrrhiza radix* geleneksel Çin tıbbında tedavi amacıyla halen kullanılmaktadır. Son yıllarda *glycyrrhiza radix*'in kendisi veya aktif metabolitlerinin etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Meyan kökünün kimyasal olarak tanımlanmış beş aktif metaboliti bulunmaktadır (Şekil 2-7). (Cao et al., 2017).



Şekil 2-7: Meyan kökündeki beş aktif bileşiğin kimyasal yapıları (Cao et al., 2017)

LQ [7-Hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-2,3dihidro-4H-1-benzopiren-4,7,4'-Dihidroksiflavanon], meyan kökü (*glycyrrhizae radix*) bitkisinin etken maddelerinden biridir. Anti-hiperlipidemik, anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-allerjik ve östrojenik aktivite gibi birçok biyokimyasal ve farmakolojik etkileri vardır. Ayrıca

detoksifikasyon, analjezi ve antitusif özellikleri olması nedeniyle Asya ülkelerinde geleneksel tıpta yaygın olarak da kullanılmaktadır (Jung et al., 2017).

LQ selektif östrojen reseptörü β (ER β) agonistidir (Mersereau et al., 2008) ve postmenapozal kadınlarda yapılan klinik çalışmalarda sıcak basması ve gece terlemesi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Kupfer et al., 2008). ER β 'nın öğrenme ve hafıza gibi beyin fonksiyonları üzerinde de önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (F. Liu et al., 2008; Walf, Koonce, & Frye, 2008). Farelerle yapılan bir çalışmada LQ kullanımının hafızayı güçlendirdiği davranışsal testlerle ortaya konulmuştur (Ko et al., 2018). Ayrıca belirli konsantrasyonlarda östrojen reseptörü α (ER α) üzerinde de parsiyel agonistik etkileri olduğu diğer çalışmalarda gösterilmiştir (Green, 2015).

Östrojen reseptörleri granüloza hücre farklılaşması, folikül ve oosit gelişimi ve ovulasyon için anahtar role sahiplerdir (Tang, Zhang, Lian, Deng, & Yu, 2019). ER α ağırlıklı olarak rahim, overler ve meme dokusunda bulunurken, ER β ise esas olarak sinir sistemi, overler, kardiyovasküler sistem ve erkek üreme sisteminde bulunur (Jia, Dahlman-Wright, & Gustafsson, 2015). ER α , ER β reseptör etkinliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, ER β 'nın granüloza hücre farklılaşması için hayati önem taşıdığını kanıtlamışlardır. ER β yokluğunda foliküllerin hücresel organizasyonunun (antrum, kümulus-oosit kompleksi), enzimatik aktivitesinin (androjen prekürsörlerinden östrojen sentezi) ve ovulasyon sürecinde yetersizliklerin olduğu gösterilmiştir (Couse, Yates, Deroo, & Korach, 2005).

Yaşam süresinin uzamasıyla birlikte yaşla ilgili kronik hastalıkların görülme sıklığı artmaktadır. Yaşlanma hücre içi makromoleküllerde kümülatif hasar oluşumu ile hücresel fonksiyonların kademeli olarak bozulması şeklinde ifade edilmektedir (Berlett & Stadtman, 1997; Suh, Heath, & Hagen, 2003). Yapılan çalışmalar mitokondrinin hücre içi reaktif oksijen radikalleri üreterek yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Hagen et al., 1997). Ayrıca mitokondri disfonksiyonun hücre ölümü patogenezinde çok önemli bir rol oynadığı da iyi bilinmektedir (Tompkins et al., 2006).

LQ'nun antioksidan aktivitesini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) gibi sinyal moleküllerinin mitokondrinin korunmasında ve ROS üretiminin inhibisyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Y. W. Kim, Lee, et al., 2009; Lemasters & Nieminen, 1997; S. M. Shin,

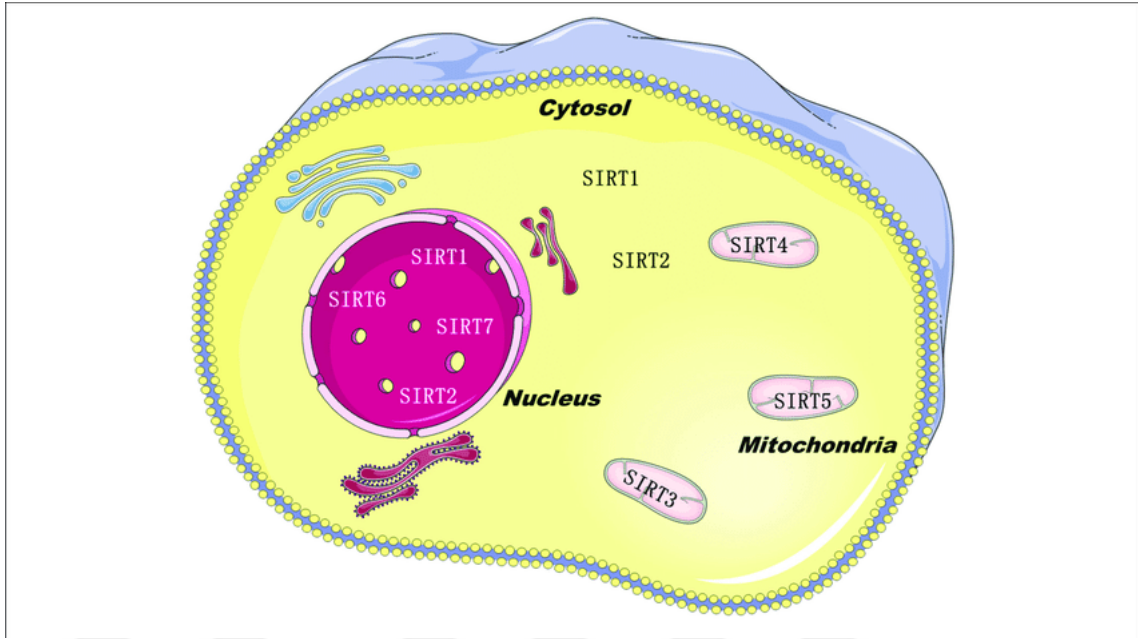
Cho, & Kim, 2009). Yapılan bir çalışmada LQ'nun karaciğer karsinomu (HepG2) hücrelerinde AMPK aktivasyonunun hücre hasarını önlemede güçlü etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Jung et al., 2017). Bunun yanı sıra LQ'nun hepatositlerde faz II ve faz III enzim indüksiyonu yaparak da antioksidan etkili olduğu gösterilmiştir (Y. W. Kim, Kang, et al., 2009).

LQ'nun hücre ölümünü indükleyerek anti-tümör aktivitesine sahip olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. İn vitro ortamda meme kanseri (Liang et al., 2021), kolorektal kanser (Meng & Lin, 2019), servikal kanser (Y. Liu et al., 2012), hepatoselüler kanser (D. Wang et al., 2014) ve oral kanserler (Ji, Hu, Jin, Yu, & Fang, 2021) üzerinde olumlu etkileri bildirilmiştir

Kullanılan ilaçların üreme sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri, ilaç fiyatlarının yüksek olması nedeniyle kadınlar arasında bitkisel ilaç kullanma eğilimi artmaktadır (Akbaribazm, Goodarzi, & Rahimi, 2021). Meyan kökü ekstresinin infertilite üzerine etkilerinin incelendiği bir çok çalışma bulunmaktadır (Jahromi et al., 2019; Kaur, Kaur, & Dhindsa, 2013; Shamsi, Nejati, Najafi, & Pour, 2020). PCOS oluşturulmuş farelerde ovaryen morfoloji, oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak meyan kökünde birçok aktif metabolit bulunmaktadır ve bu metabolitlerden hangisinin bu etkileri oluşturduğu kesin bilinmemektedir. Meyan kökünün aktif metabolitlerinden biri olan LQ'nun ovaryen patolojilerde olumlu etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar, infertilite tedavisi için bir seçenek olarak kullanılabileceğine dikkat çekmektedir (Shamsi et al., 2020).

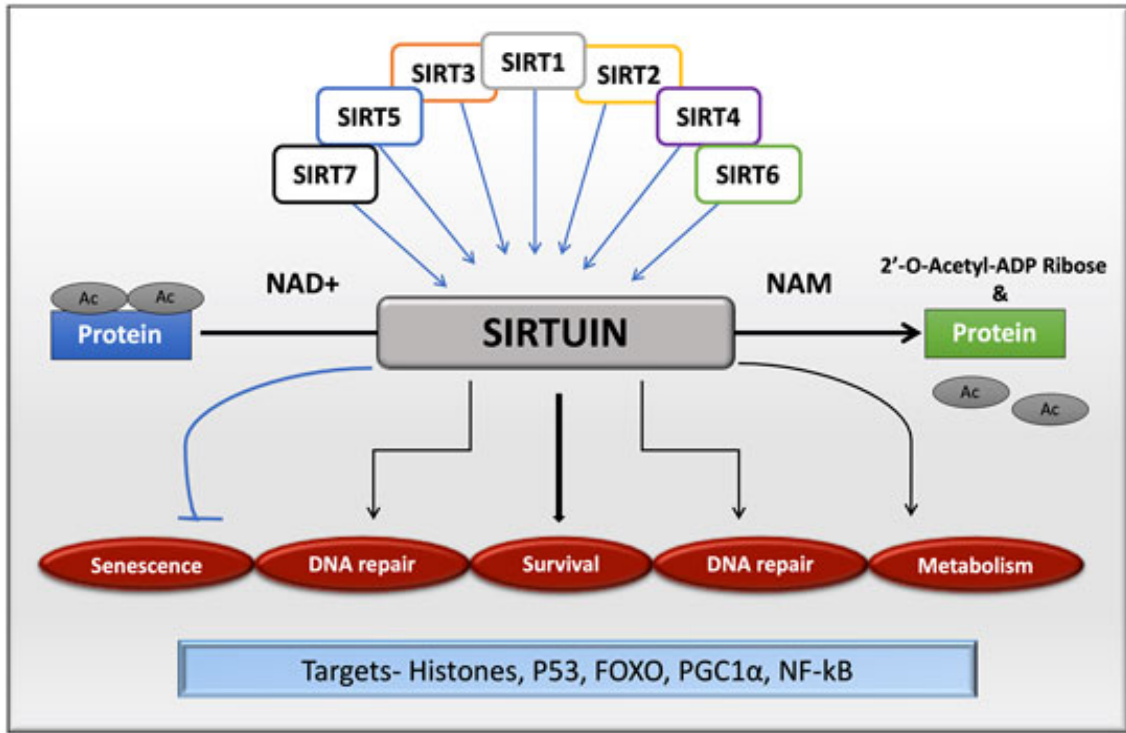
2.10. Sirtuin ailesi

Sirtuinler, vücutta homeostazı sağlamada anahtar rol oynayan yakın zamanda tanımlanmış nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı deasetilaz ailesidir. Hücre içinde lokalizasyonuna ve işlevine göre yedi çeşit Sirtuin (SIRT1–7) tanımlanmıştır (Şekil 2-8) (Frye, 2000).



Şekil 2-8: Sirtuin ailesinin hücre içi lokalizasyonları (Song et al., 2018)

Sirtuinler yaşlanma (Khan et al., 2017), metabolizma (Gomes, Outeiro, & Cavadas, 2015), stres yanıtı (Bi et al., 2019), apoptoz (Veiga-Santos et al., 2014) gibi çeşitli biyolojik olaylarda rol oynadığına dair bilimsel çalışmalar vardır (Şekil 2-9). Sirtuinlerin aslında deasetilaz aktivitesi sergiledikleri bildirilmiştir, ancak substrat proteinlerini katalize etmek için başka modifikasyonlar veya henüz tanımlanmamış başka etkiler gerçekleştirebileceklerini gösteren yeni yayınlar bildirilmektedir.



Şekil 2-9: Sirtuin ailesinin hücresel fonksiyonları (Manjula, Anuja, & Alcain, 2021)

SIRT2, başlıca sitoplazmada bulunan sirtuinlerin tek üyesidir (Vaquero et al., 2006). Yakın tarihli bir çalışma, SIRT2'nin (muhtemelen SIRT1 ve SIRT3 dahil olmak üzere) demiristoilaz aktivitesine sahip olduğunu gösterdi (Teng et al., 2015). SIRT4 (Haigis et al., 2006) ve SIRT6'nın (Liszt, Ford, Kurtev, & Guarente, 2005) bir ADP ribose grubunu protein hedeflerine aktardığı, ayrıca SIRT5'in, başlangıçta deasetilaz aktivitesi sergilediği bildirilmiş olmasına rağmen, son zamanlarda öncelikle NAD⁺ bağımlı demalonilaz ve desüksinilaz aktivitelere sahip olduğu bildirildi (Du et al., 2011).

2.10.1. SIRT2

SIRT2'nin hücre içindeki işlevi, steroidogenezdeki mekanizması ve ovaryen hücreler, özellikle foliküler hücreler üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, SIRT2'nin oksidatif stres (Y. P. Wang et al., 2014) ve enerji metabolizması (Xu, Wu, et al., 2019) gibi çeşitli fizyolojik düzenlemeler yoluyla foliküllerin gelişimini ve oosit olgunlaşmasını etkileyebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, sirtuinlerin steroidogenez ile yakından ilişkili olabileceğine dair artan kanıtlar

vardır. Yapılan bir çalışma SIRT2'nin peroxisome proliferator activated receptors/ liver X receptors (PPARs/LXRs) üzerinden steroid hormon homeostazını sürdürerek folikül gelişimi ve olgunlaşmasında rol oynadığını bildirmiştir. Ancak SIRT2'nin steroidogenez üzerindeki etkisi belirsizliğini korumaktadır. (Xu, He, et al., 2019).

Mitokondri membran potansiyeli ATP üretimi için büyük öneme sahiptir, ancak membran potansiyelinin aşırı yükselmesi, ROS'un yükselmesine neden olur (Merry, 2002). Oositler üzerinde yapılan in vitro bir çalışmada SIRT2 inhibitörüne maruziyetin mitokondri disfonksiyonuna neden olarak ROS'u arttırdığı, ATP miktarını ve antioksidan enzim ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir (Xu, Wu, et al., 2019). Osteoartrit hastalarından elde edilen kartilaj örnekleri üzerinde yapılan diğer bir çalışmada SIRT2'nin antioksidan enzim miktarını artırarak oksitadif stresi ve inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir (Qu et al., 2020).

SIRT2'nin gap junctionlarla bağlantısını gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Bajpe et al., 2015; Xu, He, et al., 2019). Gap junctionlar, komşu hücreleri birbirine bağlayan ve küçük moleküllerin geçişine izin veren hücreler arası kanallar içerirler ve konneksinlerden oluşurlar (Kidder & Mhawi, 2002). En az sekiz tip konneksin proteini vardır ve folikül gelişiminin bütün aşamalarındaki GH'lerinde en çok Cx43'ün eksprese edildiği bilinmektedir (Grazul-Bilska, Reynolds, & Redmer, 1997). Diyabetik farelerin oosite yakın olan kümülüs hücrelerinde, Cx43 proteininde azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (Chang, Dale, & Moley, 2005). Başka bir çalışmada Cx43 eksikliği olan farelerde folikülogenezsinin bozulduğu ve kümülüs hücrelerinin oosit çevresinde birden fazla katman oluşturamadığı gözlenmiştir. Bütün bunların oosit gelişiminde ciddi gecikmeye ve mayotik olgunlaşmanın başarısızlığına neden olduğu kanıtlanmıştır (Ackert, Gittens, O'Brien, Eppig, & Kidder, 2001). Birkaç çalışma, SIRT2'nin, Cx43 fosforilasyon seviyelerini etkileyebilen MEK (mitojenle aktive protein kinaz) kinaz aktivitesine aracılık ettiğini göstermiştir (Bajpe et al., 2015) ve sonuç olarak SIRT2'nin deasetilaz aktivitesi yoluyla Cx43 regülasyonunda görev aldığını bildirilmiştir (Xu, He, et al., 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi Embriyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışma öncesinde İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 10/05/2019 tarihli 09 sayılı toplantısında çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca olmadığına karar verildi. Hastalardan çalışmaya katılımları için sözlü bilgilendirmeye ek olarak, bilgilendirilmiş onam formları ile onam alındı.

Çalışma kapsamında, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezinde Kasım 2019 – Kasım 2021 tarihleri arasında gerçekleştirilen rutin döngülerden 30 döngüden çalışma kapsam ve kriterlerine uygun bulunarak hasta onamı sonrasında örnekler alındı.

3.1. Çalışmaya dahil olan hasta grupları

İstanbul Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD Üreme Sağlığı ve Infertilite Polikliniğine başvuran ve infertilite teşhisi konularak üremeye yardımcı tedavi uygulamasına alınan 18 yaş üzeri , ovulatuvar faktör ve erkek faktörlü kadın hastalar gönüllü olmaları durumunda çalışmaya dahil edilmiştir. Herhangi bir sistemik hastalığı olanlar, kronik ilaç/madde kullanımı olanlar, ovulatuvar ve erkek faktörünün beraber görüldüğü vakalar ve açıklanamayan infertilite grubu çalışmaya dahil edilmemiştir. İVF ünitesine başvuran hastaların vücut kitle indeksi (VKİ), endokrin profili, uygulanan tedavi yöntemi ve dozu, elde edilen folikül, oosit ve embriyo sayıları, gebelik durumları, canlı doğum olup olmadığı gibi klinik parametreleride analiz edilmek üzere kayıt altına alındı.

3.2. Çalışmada kullanılan yöntemler

3.2.1. Ovulasyon indüksiyonu ve oosit aspirasyonu

Kontrollü ovaryan stimülasyon, GnRH antagonisti (Cetrotide; Serono, Aubonne, İsviçre, Orgalutran; Organon Oss Hollanda) eşliğinde insan menopozal gonadotropinleri (HMG; Pergonal; Serono, Aubonne, İsviçre, Humegon; Organon Oss Hollanda) veya rekombinant folikül stimülan hormonların (FSH) (Gonal-F; Serono, Aubonne, İsviçre,

Puregon; Organon Oss Hollanda) birlikte kullanımlarını içeren protokoller uygulanarak gerçekleştirildi. Fazla sayıda oosit elde etmek için ovaryumları stimüle edilen hastaya, folikülleri yeterli büyüklüğe ulaştığında ve östrojen seviyesi istenilen düzeye geldiğinde oosit matürasyonunu sağlamak için insan koryonik gonadotropini (HCG, Pregnyl, Organon, Hollanda) veya rekombinant koryonik gonadotropin (Ovitrelle, Merck Serono, İsviçre) enjeksiyon uygulaması yapıldı.

Overlerin tedaviye verdiği yanıt, ultrason taramaları ve serum östradiol seviyelerinin ölçülmesiyle takip edildi ve folikül çapı en az 18 mm çapına ulaştığında hastalara ovulasyon için 1000 ya da 5000 IU HCG verildi. HCG yapıldıktan 35-36 saat sonra transvajinal ultrason eşliğinde oositler aspire edildi. Aspirasyonda Labotect (Model 4014, Almanya) markalı aspirasyon cihazı ve çift lümenli (Wallace ON 1633, Meksika) OPU iğneleri kullanıldı. Foliküller HEPES/MOPS (Origio, Danimarka) medyumunu kullanılarak tek tek aspire edildi ve steril tüplere (Falcon 2003, B.D., Fransa) toplanan kümülüs-oosit kompleksleri embriyoloji laboratuvarında stereo mikroskop altında (Nikon SMZ 1000, Japonya) incelendi. Toplanan kümülüs-oosit komplekslerinden temiz (kansız) ve uygun olanların kümülüs hücreleri HEPES+HSA ortamında sterio mikroskop altında steril insülin enjektörü ayrıştırıldı ve deneyde kullanılacak kümülüs hücreleri DMEM/F12 medyumuna içerisinde alınarak hücre kültürü laboratuvarına götürüldü. Hastaya ait oositler ise medyum içerisine (Quinn 's Advantage Fertilization Medium, Sage, Amerika) aktararak inkübatörde (37°C ve %6 CO₂) bekletildi.

3.2.2. Hücre kültürü

Oosit aspirasyonu sonrasında, oositler etraflarındaki korona-kümülüs hücrelerinden hyase adı verilen bir hyalüronidaz enzimi ve mekanik uyarı yardımıyla ayrıldı. Pasteur pipeti yardımıyla ayrılan granüloza hücreleri, %15 FBS ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren DMEM F12 (Dulbecco 'nun modifiye edilmiş eagle medium) medyumunu bulanan ependorfa konularak hızlıca İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. Hücre Kültürü Laboratuvarı'na ulaştırıldı. Granüloza hücrelerinden eritrosit, lökosit, hyase'lı medyum ve foliküler sıvıyı uzaklaştırmak amacıyla 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak üzerine %15 FBS ve %1 antibiyotik-anti mikotik içeren 1 ml DMEM F12 medyumuna eklendi ve 2000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi.

Yuvarlak lameller (coverslips) yirmi dört kuyucuklu (well plate) steril kültür kaplarına yerleştirildi. Hazırlanmış olan hücre süspansiyonundan her bir lamel üzerine eşit miktarda ekim yapıldı. Yaklaşık 1 saat hücrelerin lameller üzerine tutunması beklendi. İnvert mikroskopla tutunması gözlenen hücrelerin üzeri %10 FBS ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren DMEM F12 medyumunu ile 2 ml'ye tamamlandı ve 24 saat sonra LQ dozu uygulanmak üzere %5 CO₂, %95 nem içeren ve 37°C ortama sahip olan inkübatöre yerleştirildi.

3.2.3. LQ dozunun belirlenmesi

Çalışmada toz halinde bulunan liquiritigenin (Sigma-Aldrich, 78825, St Louis, MO, USA) DMSO içinde çözüldü. Stok solüsyon hazırlanarak DMEM / F12 medyumunu ile dilüe edildi ve hücrelere uygulanacak dozlar hazırlandı.

Çalışmada kullanılacak uygun dozun belirlenmesi için 1 µM, 10 µM, 40 µM ve 100 µM konsantrasyonlarla ön deneyler yapıldı. 100 µM ve 40 µM arasında hücre canlılığı ve morfolojisi arasında anlamlı fark gözlenmediği için uygun doz konsantrasyonu 40 µM olarak belirlendi (Huang & Chan, 2017; C. H. Huang et al., 2019; Jung et al., 2017).

3.2.4. Hücre gruplarının belirlenmesi ve LQ uygulaması

Çalışma kapsamında ovulatuar faktör (OF, infertil) ve erkek faktörü (EF, sağlıklı bireyler) nedeniyle İVF merkezine başvuran hastaların oosit-kümüllüs kompleksinden elde edilen granüloza hücreleri alındı. Elde edilen granüloza hücreleri OF ve EF olarak başlangıçta 2 gruba ayrıldı.

OF ve EF hastalarından elde edilen granüloza hücreleri daha sonra kendi içlerinde üçer gruba ayrıldı. Gruplarımız; OF, OF-DMSO, OF-LQ, EF, EF-DMSO ve EF-LQ olarak altı gruba ayrıldı.

OF grubundaki hücrelere medyum eklenirken, OF-DMSO grubundaki hücrelere DMSO (5 µL) ve OF-LQ grubundaki hücrelere 40 µM LQ eklendi.

EF grubundaki hücrelere medyum eklenirken EF-DMSO grubundaki hücrelere 5 µL DMSO ve EF-LQ grubundaki hücrelere 40 µM LQ eklendi.

3.2.5. Hücrelerin fikse edilmesi

Hücrelerin fikse edilmesi için %4'lük paraformaldehit solüsyonu hazırlandı. 4 g paraformaldehit, 100 ml PBS ve 100 ml NaOH solüsyonu 60⁰ C 'de çözülünceye kadar karıştırıldı. Ardından pH 7,4 olacak şekilde HCl eklendi. Son olarak solüsyon süzme kağıdından geçirilerek +4⁰ C'de saklandı.

Deneylerin tamamlanmasının ardından hücrelerin üzerindeki medium uzaklaştırılarak, immunohistokimyasal inceleme için %4'lük paraformaldehit solüsyonunda oda ısısında 10 dakika fikse edildi. Daha sonra paraformaldehit uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı ve +4⁰ C'de saklandı.

3.2.6. Viabilite testi

Viabilite testi için ayrılan kuyucuklardaki hücreler etüvde tripsin ile muamele edilerek mikroskop altında kontrollü bir şekilde yaklaşık 10-12 dakikada yüzeyden kaldırıldı. Üzerine DMEM F12 ilave edilerek enzim aktivitesi durduruldu. Daha sonra hücre süspansiyonu falcon tüpe alınarak 2000 g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu pipetajlanarak homojen hale getirildi. Eşit oranda hücre süspansiyonu ve tripan mavisi endersburg tüpüne konuldu (ör: 50µl hücre süspansiyonu, 50µl %0.4'lük Tripan mavisi). Karışım 3-5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Tripan mavisi \ hücre karışımından bir damla thoma lamına alınarak mikroskop altında sayım yapıldı ve canlı hücre sayıları belirlendi.

3.2.7. İmmunohistokimyasal inceleme

Çalışmamızda granüloza hücrelerinin işaretlenmesinde; Sir2.1 tavşan monoklonal primer antikoru (SN70-04, NBP2-67707, Novus Biologicals, USA) ve fare-tavşan spesifik HRP / AEC (ABC) immünohistokimya kiti (ab93705, Abcam, USA) kullanılmıştır.

Fikse edilmiş ve PBS'e alınmış lameller immünohistokimyasal boyamalar için işleme alınarak önce PBS ile 3 defa 5 dakika yıkandı. Ardından endojen peroksidazı bloklamak için hidrojen peroksit (H₂O₂) 10 dk oda ısısında bekletildi. 3 defa 5 dk PBS ile yıkama yapıldıktan sonra permeabilizasyonu sağlamak için %0,1 Triton X-100 (Sigma-Aldrich) solüsyonunda 5 dakika oda ısısında muamele edildi. PBS ile 3 defa 5 dakika yıkama yapıldı ve ardından özgül olmayan antikor bağlanmalarını engellemek için 5 dakika blok serumda bekletildi.

Lamellere 1:50 oranında dilüe edilmiş olan Sir2.1 primer antikoru uygulandı ve bir gece +4°C'de buzdolabında bekletildi. Daha sonra 3 kez 5 dakika PBS ile yıkama yapıldı ve 10 dk sekonder antikor solüsyonunda bekletildi. PBS ile 3 defa 5 dk yıkanan lameller straptavidin peroksidaz solüsyonunda 10 dk bekletildi ve PBS ile 3 defa 5 dk yıkandı. 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) kromojeniyle 7 dakika muamele edildi. Renk verme reaksiyonunu durdurmak için distile suda 3 defa 5 dakika bekletildi. Daha sonra lameller su bazlı kapatıcı ile kapatıldı.

3.2.7.1. Görüntü analizi

İmmünohistokimyasal olarak boyanan ve lam üzerine alınan lameller DP72 Olympus kamera sistemli bir Olympus BX61 mikroskop ile X 40 objektif kullanılarak fotoğraflandı ve görüntü kayıtları TIFF (Tagged Image File Format; Görüntü Dosyası Formatı) olarak saklandı. Analiz edilen alandaki pozitif boyanma oranını ölçmek için ImageJ görüntü analiz programı kullanıldı. Her grupta yer alan boyamalardan (n=5) X 40 büyütmede elde edilen 5 ayrı görüntüye renk analiz işlemi uygulandı (Anik et al., 2011; Ilbay et al., 2022). Renk analiz işlemi sonrasında elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.8. Elektron mikroskop takibi

Her deney grubundan elektron mikroskopik inceleme için kuyucuklardaki hücreler tripsin ile muamele edilerek (yaklaşık 10-12 dk) toplandı, santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Pellet kısmına 2 ml, %2,5 gluteraldehit eklenerek 30 dk boyunca +4°C'de fikse edildi. Fiksasyonu takiben hücreler PBS ile yıkanarak 1 gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün santrifüj edilerek süpernatantı uzaklaştıran hücreler +4°C'de %1'lik osmik asit'te 1 saat bekletildi. Hücreler PBS'te 10 dk ve distile suda 10 dk yıkandı. Kontrastlama için önceden hazırlanmış %1'lik üranil asetat ile 20 dk muamele edildi. Distile su ile 10 dk yıkama yapıldı. Hücreleri bir arada tutabilmek için pelletin üzerine yumurta akı eklendi. Santrifüj edilerek yumurta akının fazlası atıldı ve yavaş bir şekilde %70 alkol eklenerek setleşmesi için bir gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün yumurta akındaki hücreler 10 dk %90, %100, %100 alkol serilerinden geçirildi. Bu işlemi takiben 2 defa 10 dakika propilen oksitte bekletildi. Sonrasında sırasıyla 1:1 oranında propilen oksit-epon karışımında 1 saat, 1:3 oranından propilen oksit-epon karışımında 1 saat ve saf eponda 1 saat olacak şekilde uygulama yapıldı. Son olarak saf

epon içeren kapsüllere gömme işlemi gerçekleştirilerek bloklar 45°C etüvde 1 gece bırakıldı.

Her bir bloktan 700-800 nm olacak şekilde yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Daha sonra bu örneklerden yer tayin edilerek ince kesitler için trim yapıldı. Trimlenen dokulardan Leica EM UC7 ultramikrotomda, elmas bıçak ile yaklaşık 60 nm kalınlıkta ince kesitler alındı ve bakır gridler üzerine yerleştirildi. Gride alınan kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat boyasıyla kontrastlanarak JEOL-1220 transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) inceleme yapıldı. Tüm kesitler Mega View III dijital kamera ve Soft Imaging System AnalySIS programı ile görüntülendi ve sonuçlar değerlendirildi.

3.2.9. İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiğinde Graphpad Prism (ver. 7.00) veya IBM SPSS (ver. 25) programları kullanıldı. Parametrelere ait verilerin normaliteleri Shapiro-Wilk testi ile ölçüldü. Normal dağılım gösteren iki değişken grubu arasındaki ortalamaların kıyası Student t testi ile yapılırken, normal dağılım göstermeyen gruplarda iki değişken grubu arasındaki kıyas ise Mann-Whitney U testi ile ortaya konuldu. Devamlı nicel ve normal dağılım gösteren veriler arasındaki doğrusal ilişki ve yönü Pearson korelasyon testi ile gösterildi, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Spearman korelasyon analizi uygulandı. VKİ ve yaş verilerinin gebelik durumu ve doğum durumlarına göre yüzdelik dağılımları ki kare testi ile ölçüldü. Sadece toplam embriyo sayısının kıyaslandığı veri gruplarında normalizasyona gidildi. Tüm veriler ortalama $\pm$, ortalamaların standart hatası (standart error of mean=s.e.m) olarak sunulmuştur. $p < 0.05$ değeri istatistiki anlamlılık seviyesi olarak kabul edilmiştir. p değerlerine tekabül eden ve anlamlılık seviyesini belirten yıldız sayısı sırasıyla şu sınırlara göre ifade edilmiştir: n.s.= $p > 0.05$; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$; **** = $p \leq 0.0001$. Bu derecelendirme, yıldız sayısı arttıkça aradaki anlamlılık seviyesinin de o kadar artmakta olduğunu ifade etmektedir.

İmmünohistokimyasal analizler için elde edilen sonuçlar, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve post-hoc Tukey testleri kullanılarak değerlendirildi. İstatistik analizler sırasında güven aralığı $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3.2.10. Kullanılan kimyasal maddeler, malzemelere ve cihazlar

3.2.10.1. Kimyasal maddeler

Liquiritigenin (Sigma-Aldrich, 78825, St Louis, MO, USA), GnRH antagonisti (Cetrotide; Serono, Aubonne, İsviçre, Orgalutran; Organon Oss Hollanda), İnsan menopozal gonadotropin (HMG; Pergonal; Serono, Aubonne, İsviçre, Humegon; Organon Oss Hollanda), Rekombinant folikül stimülan hormon (FSH) (Gonal-F; Serono, Aubonne, İsviçre, Puregon; Organon Oss Hollanda), İnsan koryonik gonadotropin (HCG, Pregnyl, Organon, Hollanda), Rekombinant koryonik gonadotropin (Ovitrelle, Merck Serono, İsviçre), HEPES/MOPS (Origio, Danimarka), FBS (Panbiotech P30-3306), DMEM F12 (Sigma-Aldrich, D8900-10L), DMSO (Sigma-Aldrich), Sir2.1 tavşan monoklonal primer antikoru (SN70-04, NBP2-67707, Novus Biologicals, USA), Fare-tavşan spesifik HRP / AEC (ABC) immünohistokimya kiti (ab93705, Abcam, USA), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), Glutaraldehit (Merck, 104239), Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma, 45359-1EA-), Tripan mavisi (Sigma-Aldrich)

3.2.10.2. Malzemeler ve cihazlar

Ultramikrotom (Leica, EM UC7), Geçirimli Elektron Mikroskobu (JEOL-1220), Mega View III dijital kamera, Soft Imaging System AnalySIS programı, Olympus BX61 mikroskop, Bakır grid (EMS G100-Cu), Jelatin Kapsül (Size 3) (EMS 70104).

4. BULGULAR

4.1. Hastalardan elde edilen verilerin incelenmesi

Çalışma Kasım 2019 – Kasım 2021 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD Üreme Sağlığı ve İnfertilite polikliniğine başvuran 18 yaş üzerindeki 35 olgu üzerinde yapılmıştır. Hastalardan elde edilen verilere ait tanımlayıcı bilgiler Tablo 4-1 ve Tablo 4-2’de verilmiştir. Hastaların ortalama yaşı $33,45 \pm 0,87$ yıl olarak saptanmıştır. Olguların %57,14’ü (n=20) ovulatuvar faktör iken %42,86’sı (n=15) erkek faktörüdür.

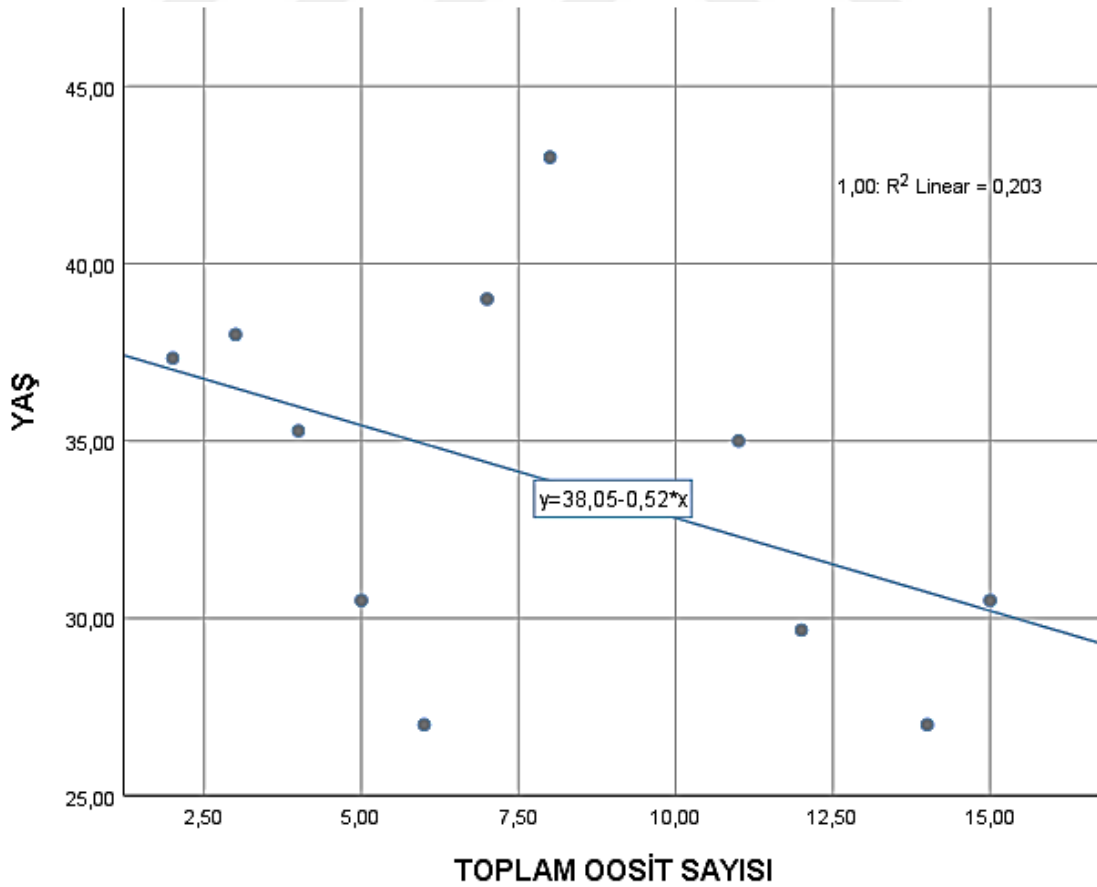
Tablo 4-1: Hastalardan elde edilen verilere ait tanımlayıcı bilgiler

	Min-Maks (Median)	Ort $\pm$ s.e.m	s.s
n=35			
Yaş	26-43 (33)	$33,45 \pm 0,87$	5,1
Total Gonadotropin	1350-4125 (2100)	2186 ± 126	744,6
FSH	0,4-15,44 (6,79)	$6,792 \pm 0,49$	2,9
LH	0,1-14,08 (5,43)	$5,492 \pm 0,43$	2,578
E2	19,8-224 (49,02)	$67,97 \pm 7,99$	47,33
PRL	6,51-50,78 (16)	$18,66 \pm 1,91$	11,33
Toplam Folikül Sayısı	2-19 (6)	$7,457 \pm 0,70$	4,168
Toplam Oosit Sayısı	2-15 (5)	$6,886 \pm 0,65$	3,886
M2 Oosit Sayısı	0-15 (4)	$5,086 \pm 0,57$	3,381
Fertilizasyon Oranı	0-100 (66,6)	$60,65 \pm 5,59$	33,07
Toplam Embriyo Sayısı	0-12 (3)	$3,088 \pm 0,416$	2,4
ETS	0-2 (1)	$0,31 \pm 0,109$	0,64
Boy	1,55-1,77 (1,60)	$142,5 \pm 9,013$	52,56
Kilo	43-85 (63,5)	$64,74 \pm 1,82$	10,6
BMI	17,22-32,04 (24,8)	$25,023 \pm 0,65$	3,8

Tablo 4-2: Hastaların gebelik ve doğum durumlarına ait tanımlayıcı bilgiler

	n	%
Gebelik Durumu		
Var	24	68,6
Yok	11	31,4
Abort	16	66,6
Doğum Durumu		
Negatif	27	77,1
Pozitif	8	22,9

Çalışmaya katılan hastaların yaşları ve hastalardan elde edilen oosit sayıları incelendiğinde iki veri arasında negatif bir korelasyon olduğu saptanmıştır ($p=0.040$, $r = -0.348$) (Şekil4-1). Hastaların yaşları ilerledikçe elde edilen oosit sayılarının azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4-1: Toplam oosit sayısı ve yaş arasındaki korelasyon

4.2. Hastalardan elde edilen verilerin gruplar arasında karşılaştırılması

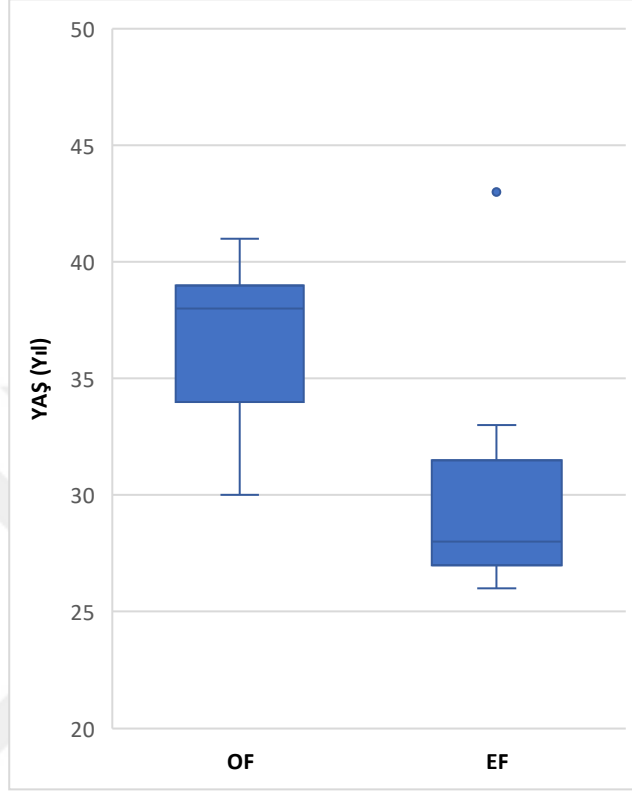
Gruplar arasında luteinizan hormon (LH), prolaktin hormonu (PRL), fertilizasyon oranı, toplam embriyo sayısı, elektron transfer sayısı (ETS), boy, kilo ve vücut kitle indeksi (VKİ) bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-3).

Gruplar arasında yaş bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır ($p<0,0001$) (Tablo 4-3). Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilen değerlendirmeler sonucunda, OF grubundaki olguların yaşlarının EF grubundaki olguların yaşlarından daha büyük olduğu saptanmıştır (sırasıyla, $p=0,009$, $p=0,001$).

Tablo 4-3: Hastalardan elde edilen parametrelerin EF ve OF grupları arasında karşılaştırılması a=Student t testi, b=Mann-Whitney U testi

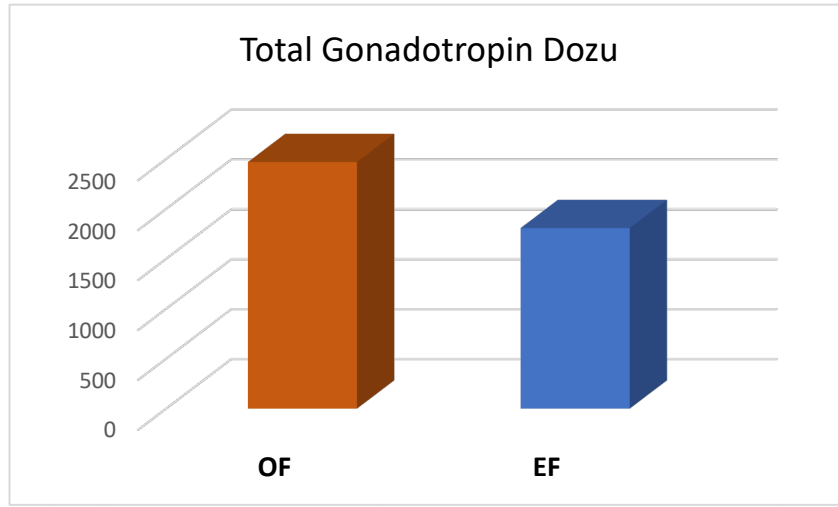
	OF (n=20) (ort.±s.e.m)	EF (n=15) (ort.±s.e.m)	p değeri	Anlamlılık seviyesi
Yaş ^b	36,25± 0,77	29,6±1,16	<0,0001	****
Total Gonadotropin ^b	2469± 176,6	1808± 124,3	0,0060	**
FSH ^a	6,89± 0,80	6,663± 0,43	0,0048	**
LH ^a	5,667±0,70	5,259± 0,42	0,6501	n.s
E2 ^b	83,25± 12,32	47,6± 5,99	0,0283	*
PRL ^b	17,55± 2,49	20,61± 3,02	0,2367	n.s
Toplam Folikül sayısı ^b	6,2± 0,91	9,133± 0,96	0,0084	**
Toplam Oosit sayısı ^b	5,6± 0,78	8,6± 0,99	0,0054	**
M2 Oosit sayısı ^b	4,05± 0,74	6,467± 0,79	0,0103	*
Fertilizasyon Oranı ^b	69± 7,33	49,51± 8,01	0,0626	n.s
Toplam Embriyo ^b	2,9±0,61	3,357±0,55	0,2276	n.s
ETS ^b	1,2±0,16	1,067±0,15	0,5101	n.s
Boy ^b	160,8±1,433	161,2±1,607	0,8570	n.s
Kilo ^a	65,37±2,74	63,93±2,30	0,7015	n.s
BMI ^b	25,37±1,003	24,58±0,782	0,4452	n.s

Her iki grup arasında yaş bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0,0001$). OF grubunda olguların yaşlarının EF grubundaki olguların yaşlarından daha büyük olduğu saptanmıştır (Şekil 4-2).



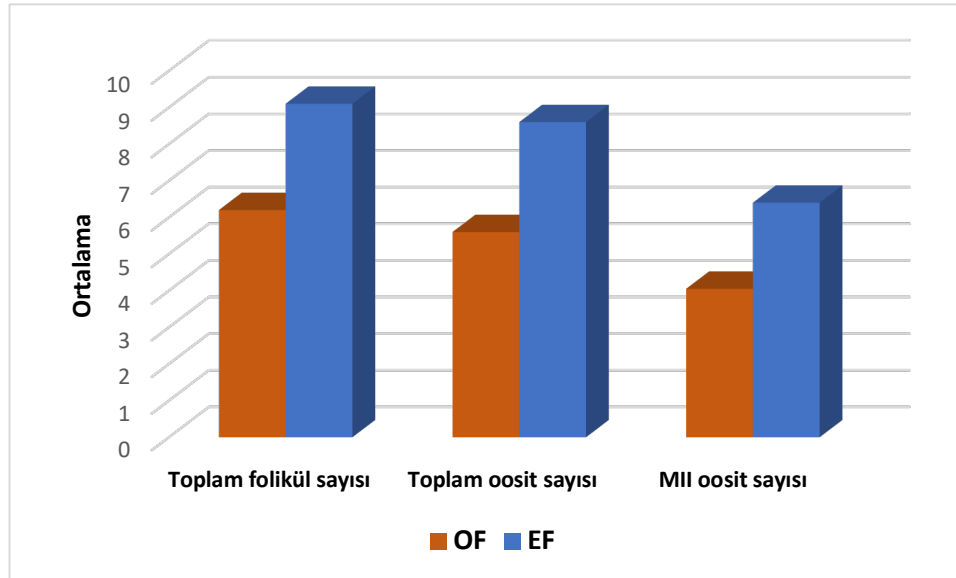
Şekil 4-2: Gruplara göre yaşların dağılımı

Gruplar arasında total gonadotropin dozu bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır ($p=0,0060$). Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilen değerlendirmeler sonucunda, OF grubunda total gonadotropin dozunun EF grubundan daha büyük olduğu görülmüştür (Şekil 4-3).



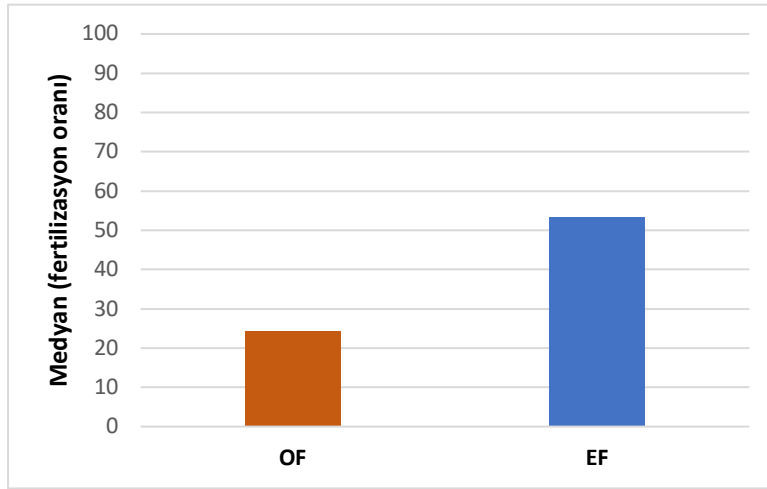
Şekil 4-3: Gruplara göre total gonadotropin dozu dağılımı

Gruplar arasında toplam folikül sayısı ($p=0,0084$), toplam oosit sayısı ($p=0,0054$) ve MII oosit sayısı ($p=0,0103$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). OF grubunda toplam folikül, toplam oosit ve MII oosit sayısının EF grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4-4).



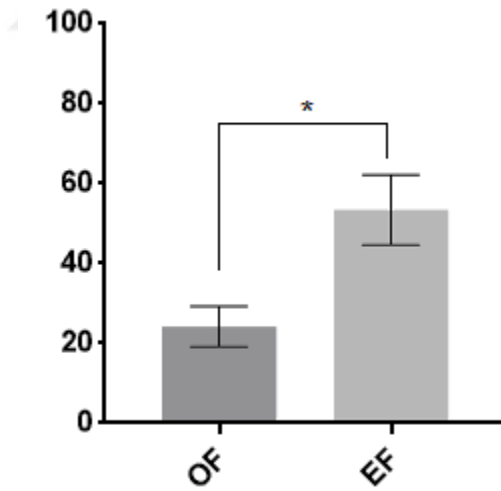
Şekil 4-4: Gruplara göre toplam folikül sayısı, toplam oosit sayısı ve MII oosit sayısı dağılımı

Gruplar arasında fertilizasyon oranı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p=0,0626$) (Şekil4-5).



Şekil 4-5: Gruplara göre fertilizasyon oranları dağılımı

Gruplar arasında normalize edilmiş toplam embriyo sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,0139$). EF grubunda normalize edilmiş toplam embriyo sayısının OF grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4-6).



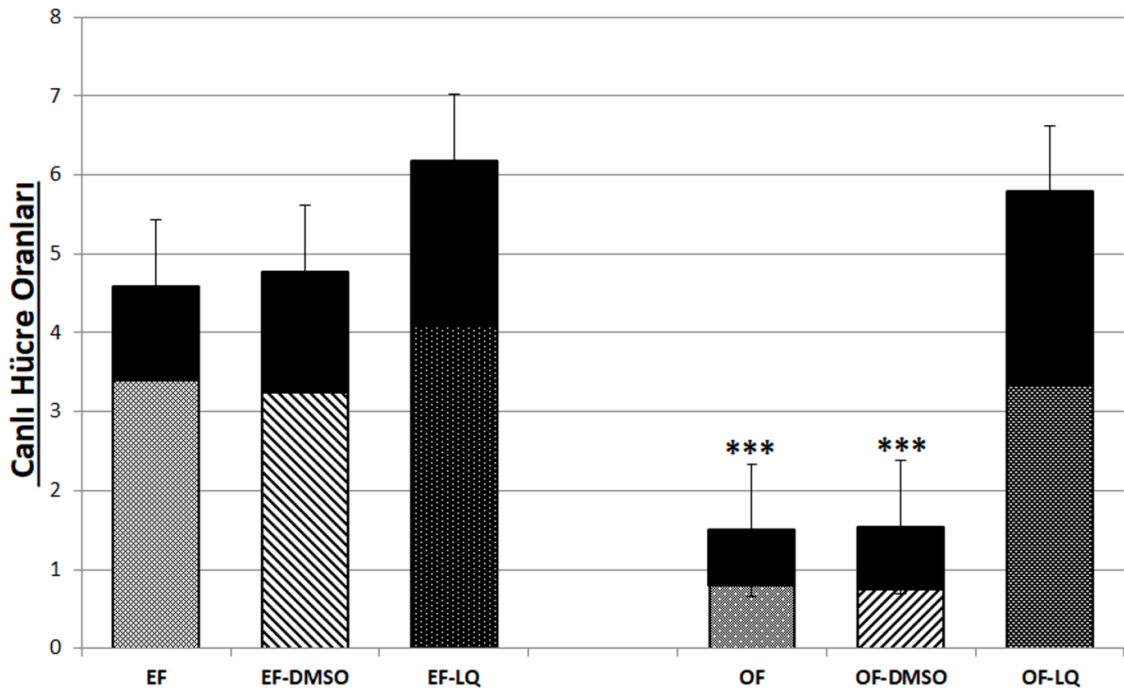
Şekil 4-6: OF ve EF gruplarının normalize edilmiş embriyo sayılarının karşılaştırılması

4.3. Hücre Sayımları Sonuçları

EF, EF-DMSO, EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarının, tripan mavisi boyamasıyla canlı hücre sayımları istatistiksel değerlendirildi. EF ile EF-DMSO ve EF-LQ grupları arasında canlı hücre sayımları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,9997$, $p=0,7282$, Tablo 4-4). OF ve OF-DMSO grupları ile EF, EF-DMSO ve EF-LQ

grupları arasında canlı hücre sayımları arasındaki fark anlamlıydı ($p < 0.001$, Tablo 4-4). OF-LQ grubu ile OF ve OF-DMSO grupları arasındaki fark anlamlıyken ($p < 0.001$, Tablo 4-4), EF, EF-DMSO ve EF-LQ grupları arasındaki fark ise anlamlı bulunmadı ($p=1$, $p=1$ ve $p=0,6664$, Tablo 4-4).

Tablo 4-4: EF, EF-DMSO, EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarının canlı hücre sayımlarını gösteren tablo. EF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar * işareti ile belirtilmiştir ($p < 0,001$).**



4.4. SIRT2 İmmünohistokimya Boyanma Sonuçları

ImageJ görüntü analiz programı ile SIRT2 antikoru boyanma miktarına bakıldığında EF ile EF-DMSO grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,9873$ ve Tablo 4-5). EF ve EF-DMSO grupları arasında AEC kromojeniyle kırmızı renkte işaretlenen immünohistokimya boyanmasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4-7 ve 4-8). EF ve EF-DMSO grupları ile EF-LQ grubu arasındaki SIRT2 antikoru boyanmasına bakıldığında aralarındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0.001$, Tablo 4-5). EF-LQ grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetinin EF ve EF-DMSO gruplarına göre daha koyu ve yaygın bir boyanma göstererek arttığı gözlemlendi (Şekil 4-9).

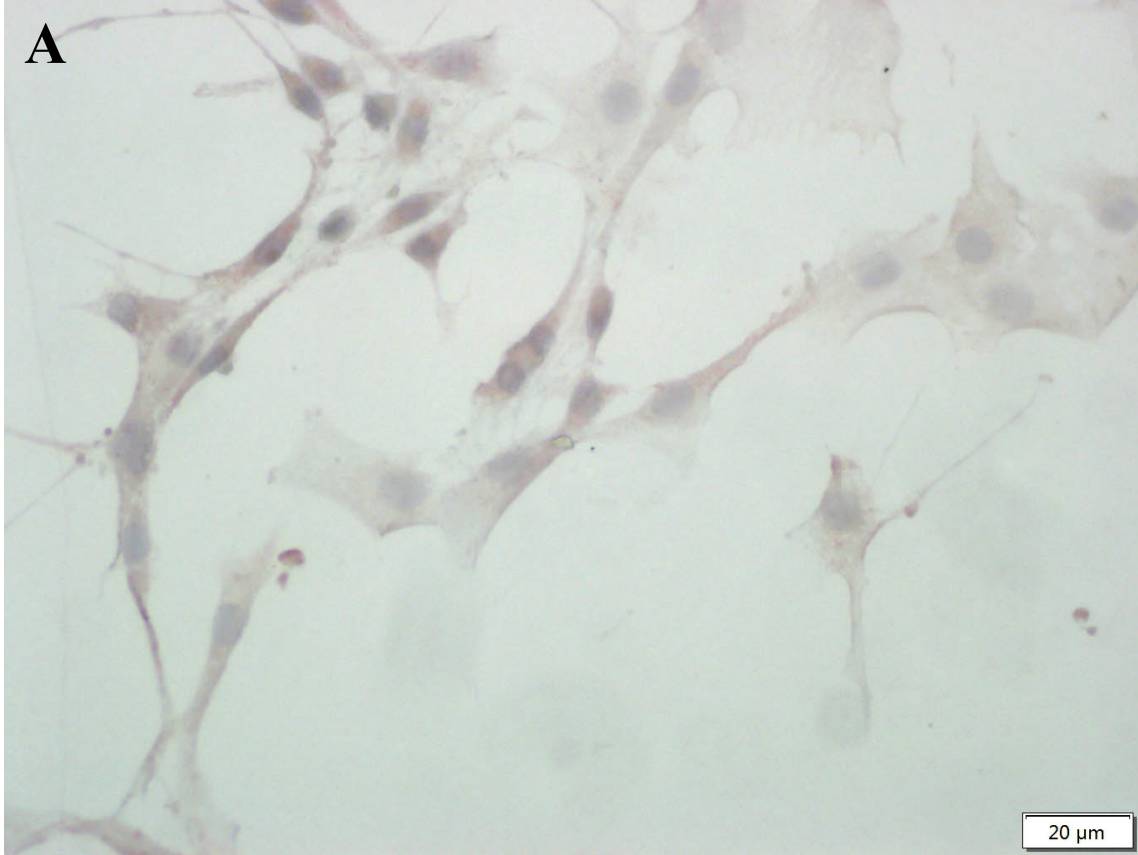
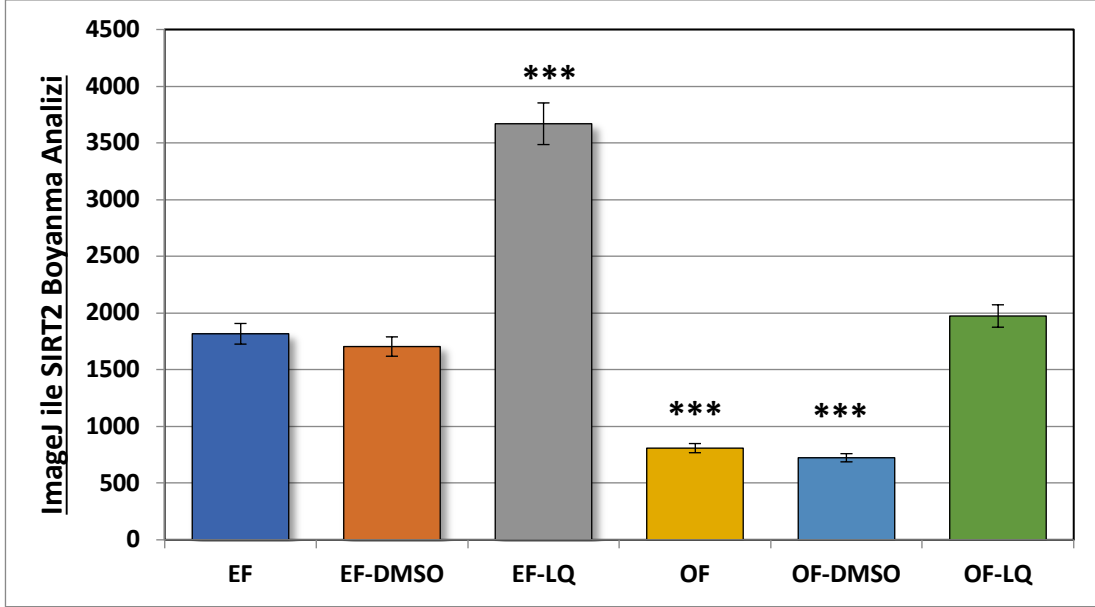
İmmünohistokimyasal olarak OF grubu ile OF-DMSO grubu arasında SIRT2 antikoru boyanma şiddetine bakıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,9966$, Tablo

4-5). OF ve OF-DMSO gruplarının boyanma şiddeti EF grubuna göre daha soluktu (Şekil 4-7, Şekil 4-10, Şekil 4-11). OF ve OF-DMSO grupları ile OF-LQ grubu arasındaki fark ise anlamlı bulundu ($p < 0.001$, Tablo 4-5). EF ve EF-DMSO grupları ile OF ve OF-DMSO grupları SIRT2 antikoru boyanma şiddetine bakıldığında, aralarındaki fark anlamlıyken ($p < 0.001$, Tablo 4-5), OF-LQ grubu ile aralarındaki fark anlamlı değildi ($p = 0,9464$ ve $p = 0,6366$ Tablo 4-5). OF-LQ grubu ile OF ve OF-DMSO gruplarının SIRT2 immünohistokimya boyanması arasındaki fark ise anlamlı bulundu ve daha koyu ve yaygın bir boyanma gösterdi ($p < 0.001$, Şekil 4-10, Şekil 4-11, Şekil 4-12).

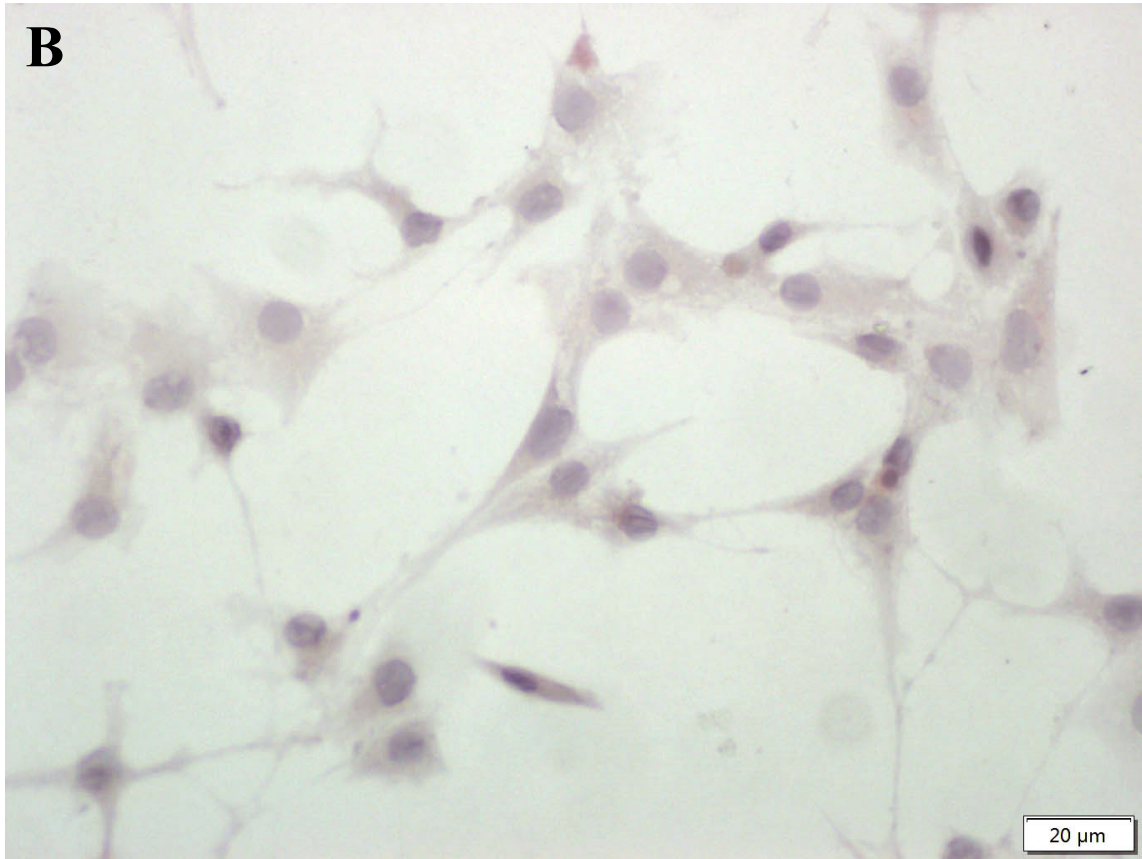
SIRT2 immünohistokimya ve hematoxylin zıt boyamasıyla ışık mikroskopunda, kümülüs granüloza hücrelerinin morfolojik değişiklikleri de incelendi. OF ve OF-DMSO gruplarında dejenerasyon morfolojisi gösteren granüloza hücreleri, piknotik nükleusa ve SIRT2 immünohistokimya boyamasıyla daha soluk boyanmış bir sitoplazmaya ve nükleusa sahipti. Sitoplazmasında apoptozisin belirtilerinden biri olan apoptotik cisimler ve çeşitli büyüklük ve miktarda vakuoller içeren granüloza hücreleri saptandı (Şekil 4-7 ve Şekil 4-8).

EF ve EF-DMSO grubuna ait granüloza hücreleri, genelde oval veya yuvarlak biçimli SIRT2 immünohistokimya boyamasıyla pozitif boyanmış bir sitoplazmaya ve nükleusa sahipti. EF ve EF-DMSO gruplarına ait fuziform, triangular veya iğ şekilli granüloza hücrelerinin, daha sıkı kümeler oluşturduğu gözlemlendi. OF ve OF-DMSO gruplarına göre daha az miktarda apoptotik cisim ve vakuol içerdikleri gözlemlendi (Şekil 4-10 ve Şekil 4-11). EF-LQ grubu ve OF-LQ granüloza hücrelerinin, diğer gruplarına göre apoptotik cisimcik ve vakuol içeren hücre sayısının daha az, vakuol boyutlarının da daha küçük ve az sayıda olduğu görüldü (Şekil 4-9 ve Şekil 4-12).

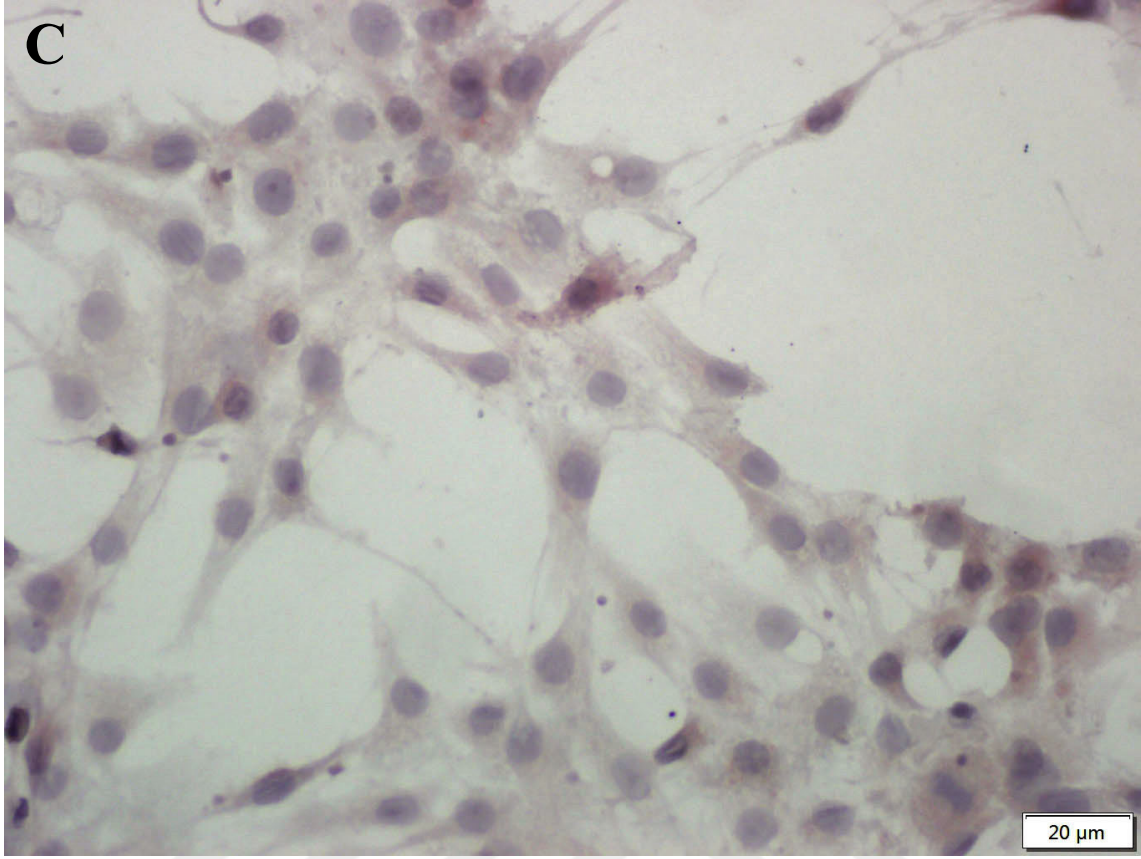
Tablo 4-5: EF, EF-DMSO, EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarının, ImageJ görüntü analiz programı kullanılarak, SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren tablo. EF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar *** işareti ile belirtilmiştir



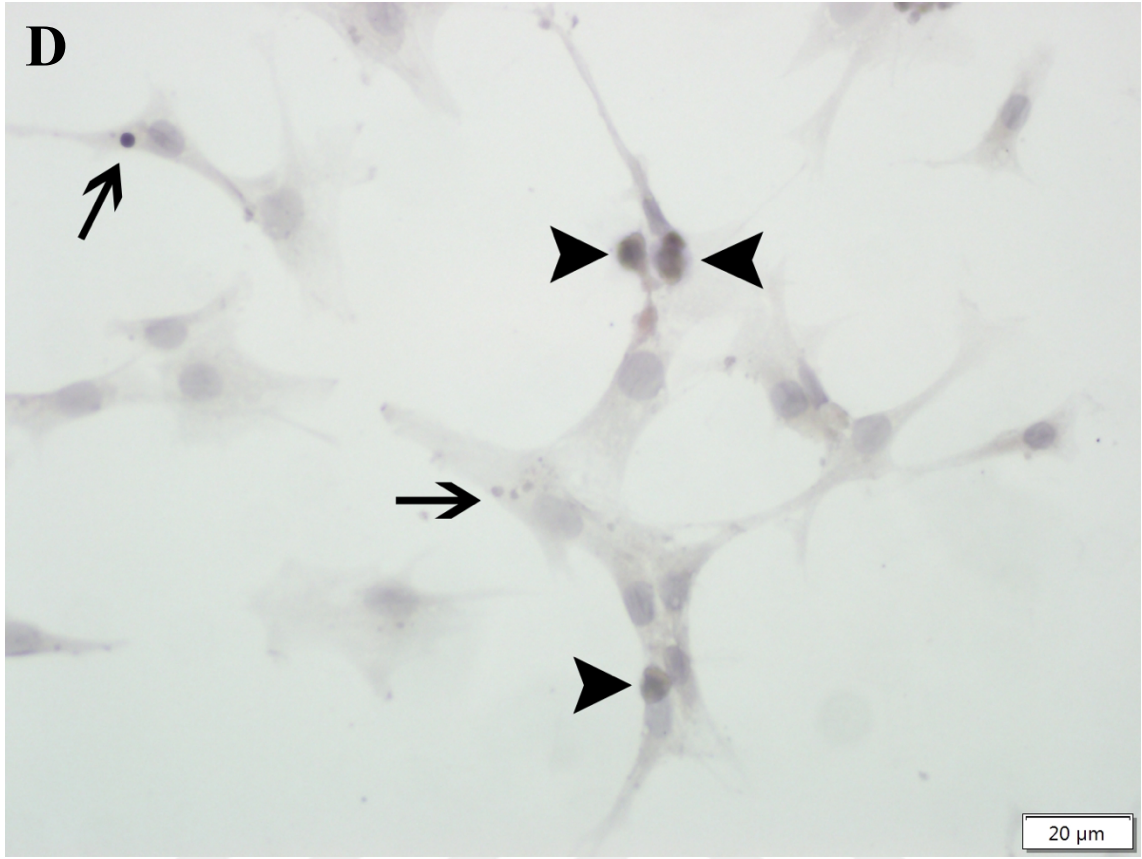
Şekil 4-7: EF grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Bar 20 µm.



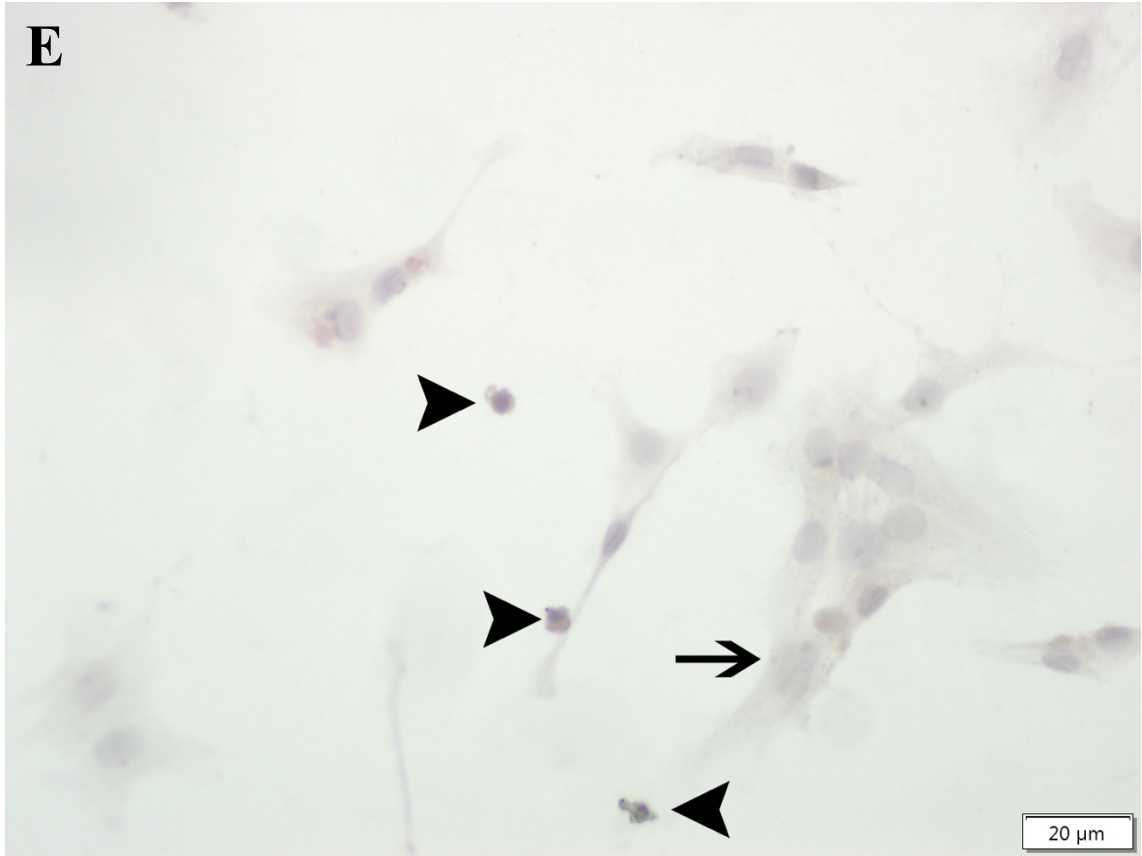
Şekil 4-8: EF-DMSO grubunun SIRT2 immünositokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Bar 20 μm.



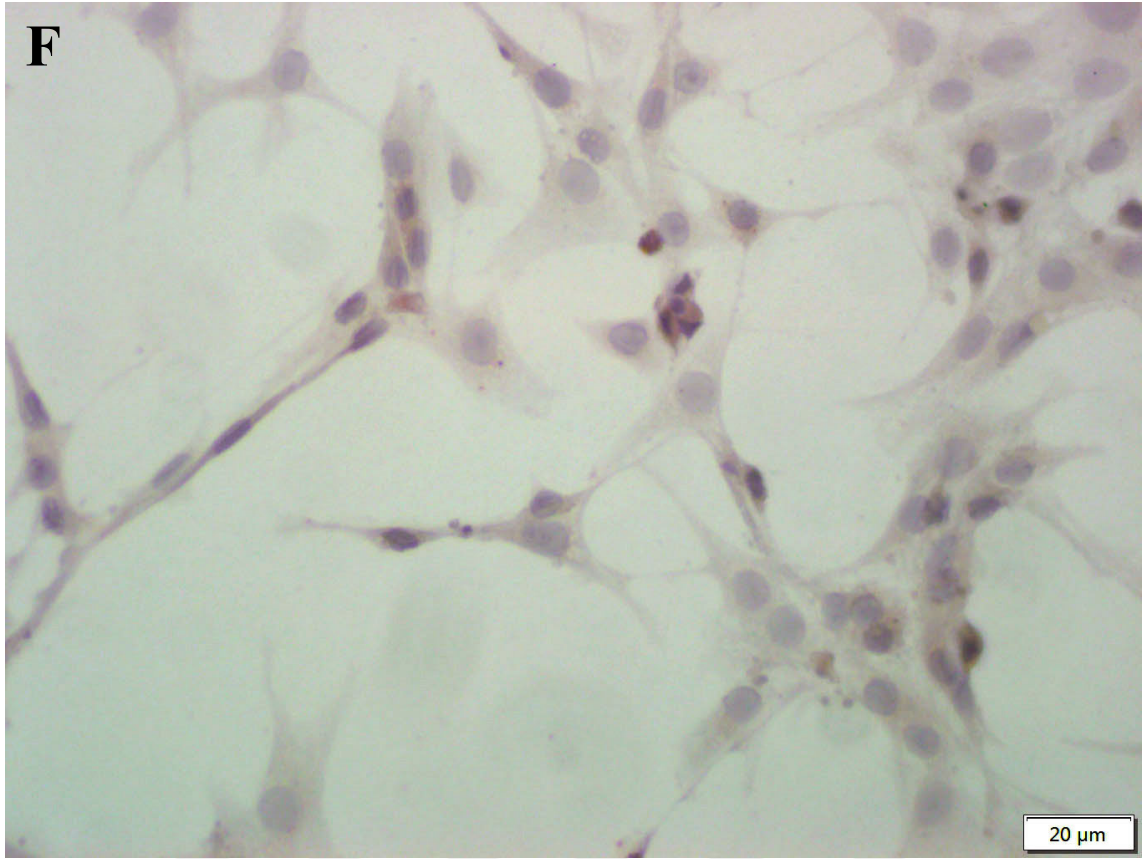
Şekil 4-9: EF-LQ grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Bar 20 µm.



Şekil 4-10: OF grubunun SIRT2 immünositokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Piknotik nukleus ok başları, apoptotik cisimcikler ok ile gösterilmiştir. Bar 20 μm.



Şekil 4-11: OF-DMSO grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Piknotik nükleus ok başları, apoptotik cisimcikler ok ile gösterilmiştir. Bar 20 µm.



Şekil 4-12: OF-LQ grubunun SIRT2 immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Bar 20 μ m.

4.5. Elektron mikroskobu bulguları

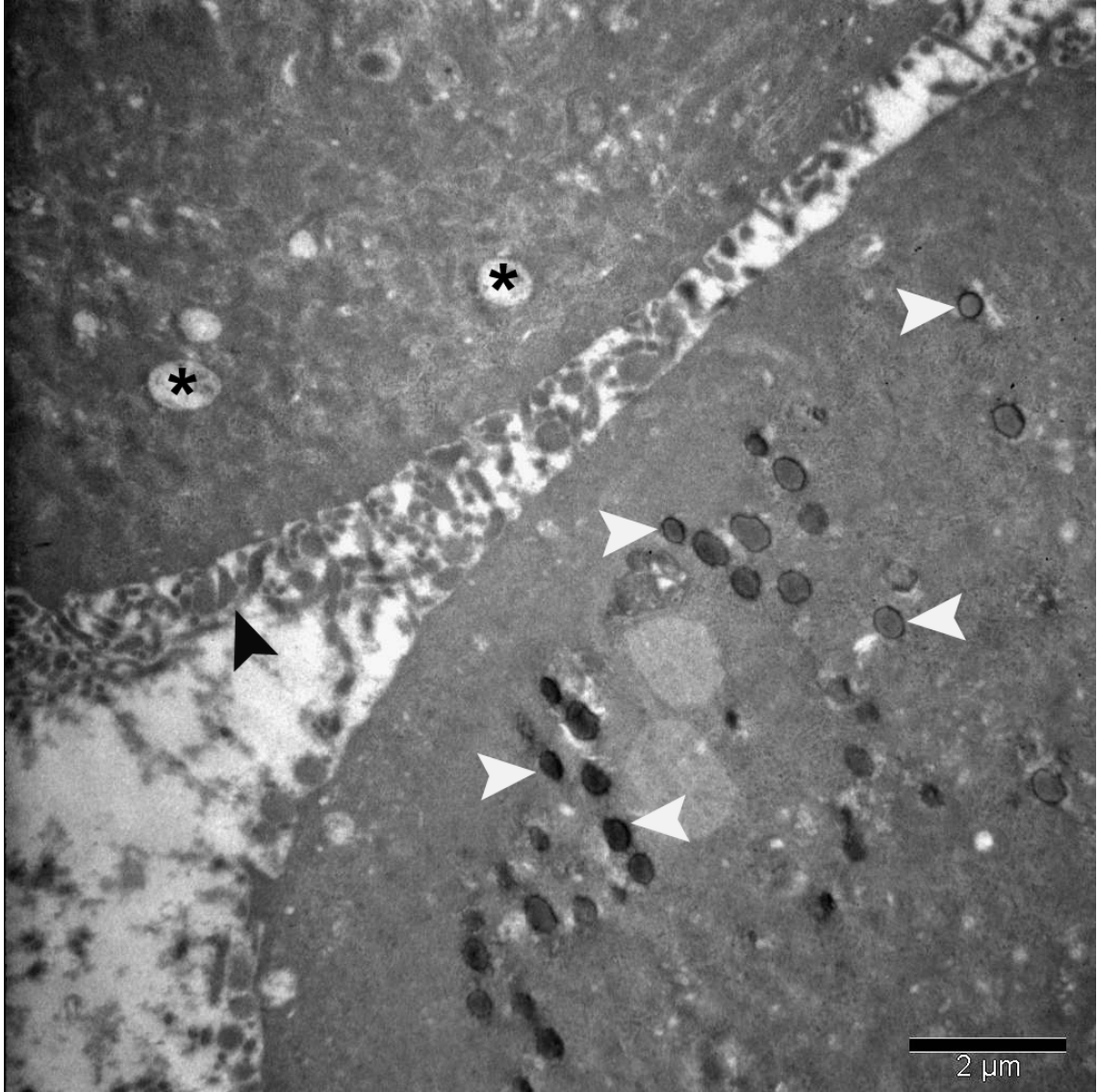
EF ve EF-DMSO gruplarının elektron mikroskobik incelemesinde GH'lerinin büyük bir nukleus ve belirgin bir veya iki nukleolusa sahip oldukları gözlemlendi. Hücre yüzeyinde çok sayıda mikrovilluslar (protrüzyon, uzantılar) mevcuttu (Şekil 4-13). Sitoplazmalarında çeşitli şekillerde oval veya tubuler mitokondriler, düz endoplazmik retikulum sisternaları, ribozomlar ve veziküller gözlemlendi. Steroid sentezleyen hücrelerde gözlenen özelliklerden biri olan sitoplazma boyunca dağılmış koyu lipid damlacıklarından zengin olduğu gözlemlendi. GH'lerinin sitoplazmasında küçük ebatlarda vakuoller gözlemlendi (Şekil 4-14) (Şekil 4-15).

EF-LQ grubunda GH'lerinin büyük bir nukleus ve belirgin bir veya iki nukleolusa sahip oldukları gözlemlendi. Hücre yüzeyinde çok sayıda mikrovillus mevcuttu. Sitoplazmalarında çeşitli şekillerde mitokondriler, düz endoplazmik retikulum sisternaları, ribozomlar ve veziküller gözlemlendi. EF-LQ grubunda sitoplazma boyunca

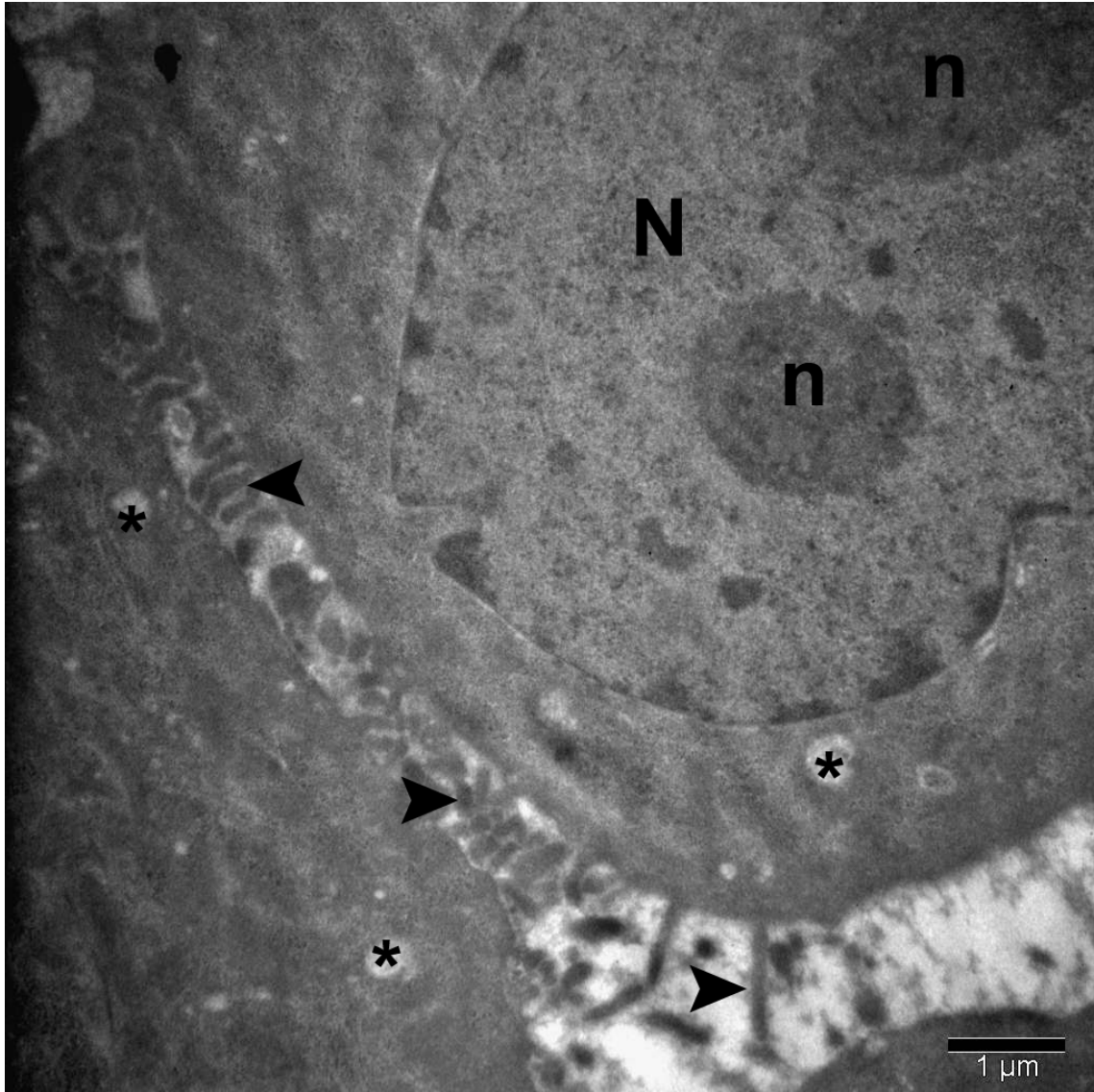
dağılmış, EF ve EF-DMSO gruplarından daha fazla sayıda lipid damlacıklarının olduğu görüldü. GH'lerinin sitoplazmasında küçük ebatlarda vakuoller gözlemlendi (Şekil 4-16).

OF ve OF-DMSO gruplarının elektron mikroskopik incelemesinde GH 'lerinin kontürleri düzensiz, girintili ve çıkıntılı büyük bir nukleus ve belirgin bir veya iki nukleolusa sahip oldukları gözlemlendi. Hücre yüzeyinde az sayıda mikrovillus mevcuttu. Sitoplazmalarında çeşitli şekillerde oval veya tubuler mitokondriler, düz endoplazmik retikulum sisternaları, ribozomlar ve veziküller gözlemlendi. EF, EF-DMSO, EF-LQ ve OF-LQ gruplarına göre sitoplazmayı kaplayan daha büyük ve az sayıda lipid damlacıklarının olduğu gözlemlendi. GH'lerinin sitoplazmasının büyük bir kısmını kaplayan oldukça büyük ebatlarda vakuoller olduğu gözlemlendi (Şekil 4-17) (Şekil 4-18).

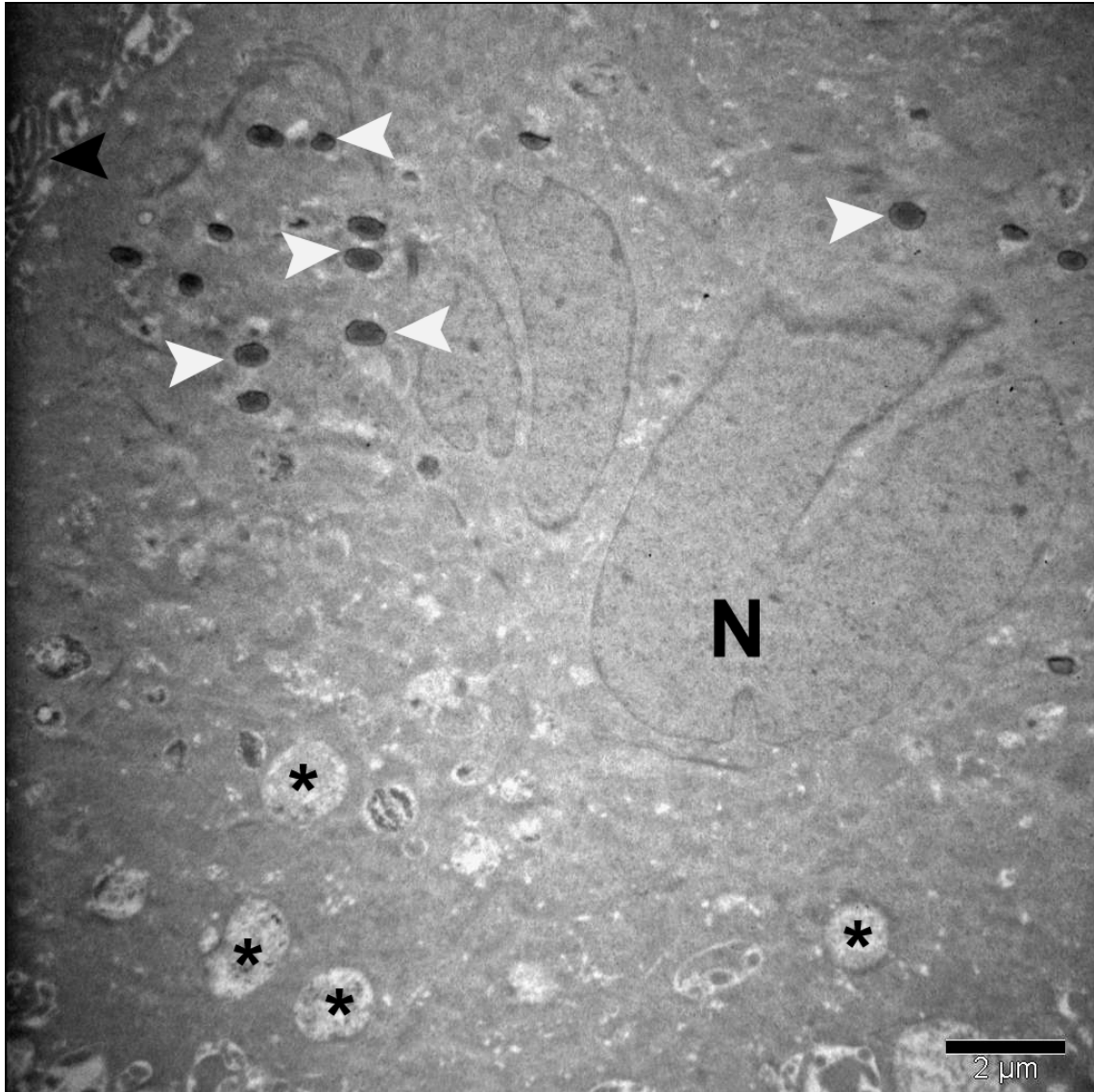
OF-LQ grubunda GH'lerinin büyük bir nukleus ve belirgin bir veya iki nukleolusa sahip oldukları gözlemlendi. Hücre yüzeyinde OF ve OF-DMSO gruplarından daha fazla sayıda ve uzun mikrovilluslar mevcuttu. Sitoplazmalarında çeşitli şekillerde mitokondriler, düz endoplazmik retikulum sisternaları, ribozomlar ve veziküller gözlemlendi. OF-LQ grubunda sitoplazma boyunca dağılmış, OF ve OF-DMSO gruplarından daha fazla sayıda lipid damlacıklarının olduğu görüldü. OF-LQ grubunda OF ve OF-DMSO gruplarına göre daha az sayıda küçük ebatlarda vakuoller ve birkaç büyük ebatlı vakuol gözlemlendi (Şekil 4-19) (Şekil 4-20).



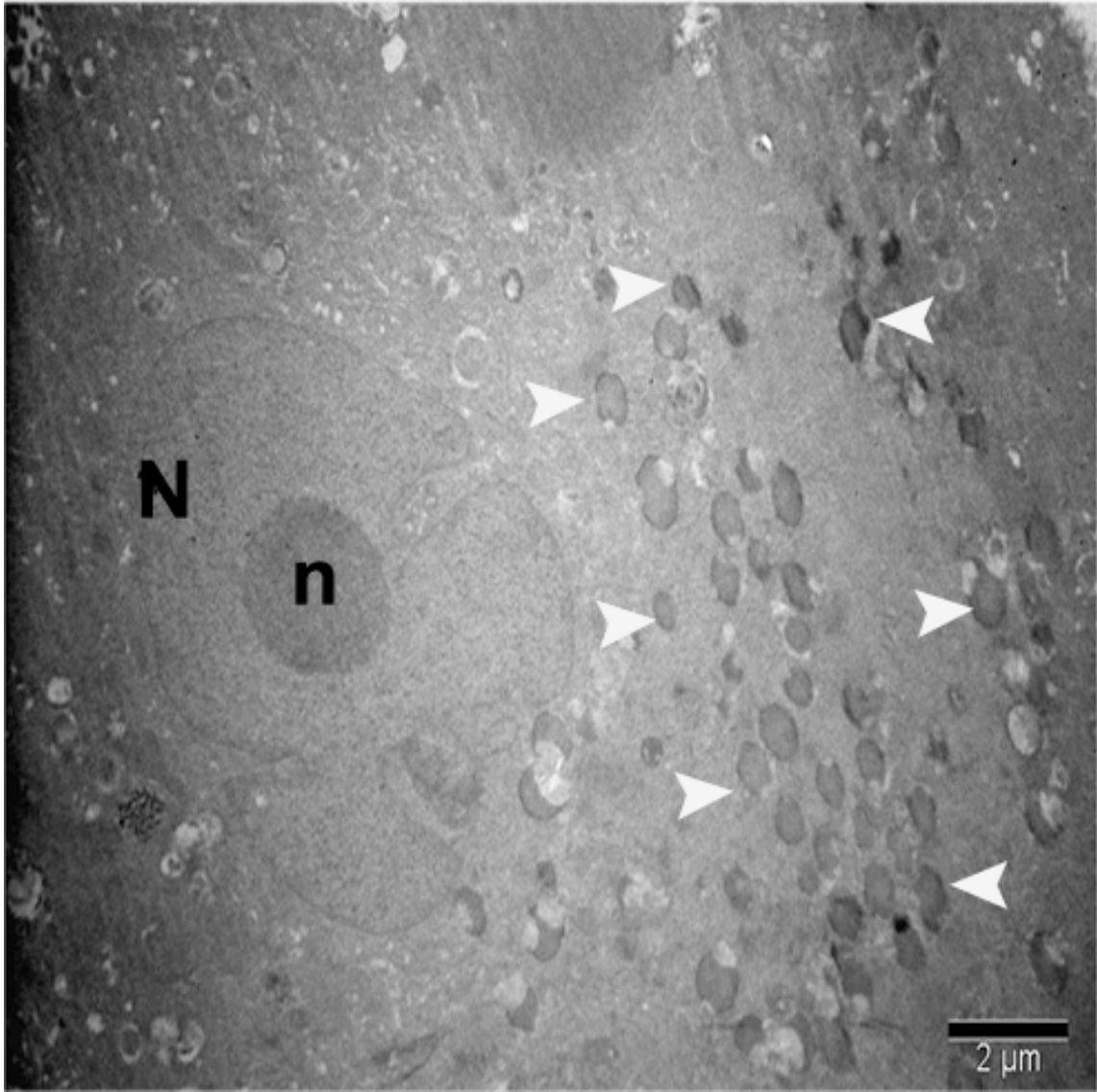
Şekil 4-13: EF grubuna ait GH 'nin elektron mikroskopik görüntüsü görülmektedir. Lipid damlacığı (beyaz okbaşı), vakuol (asterisk), mikrovillus (siyah okbaşı).



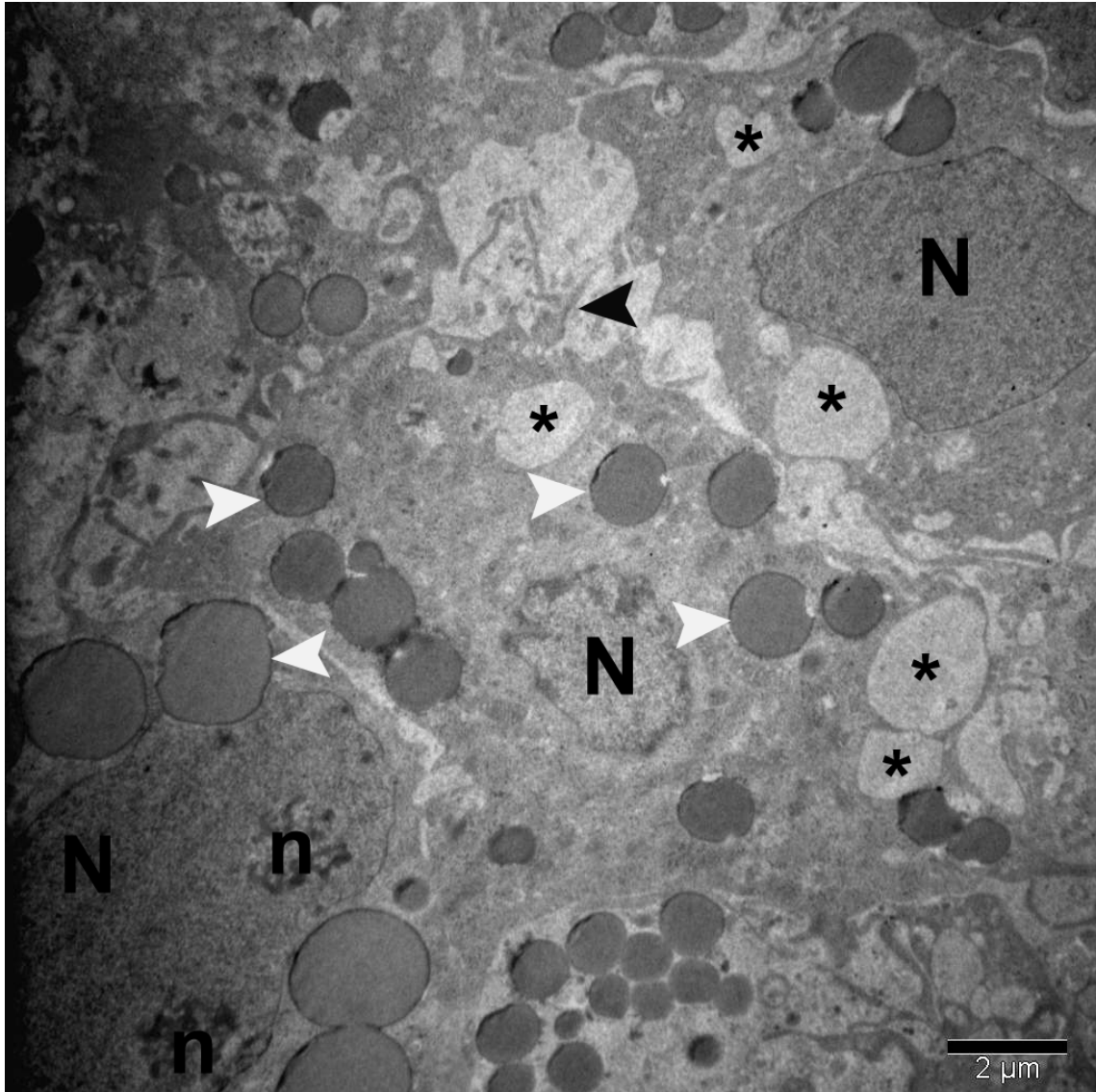
Şekil 4-14: EF grubuna ait GH 'nin elektron mikroskopik görüntüsü görülmektedir. Nukleus (N) nukleolus (n), vakuol (asterisk), mikrovillus (siyah okbaşı)



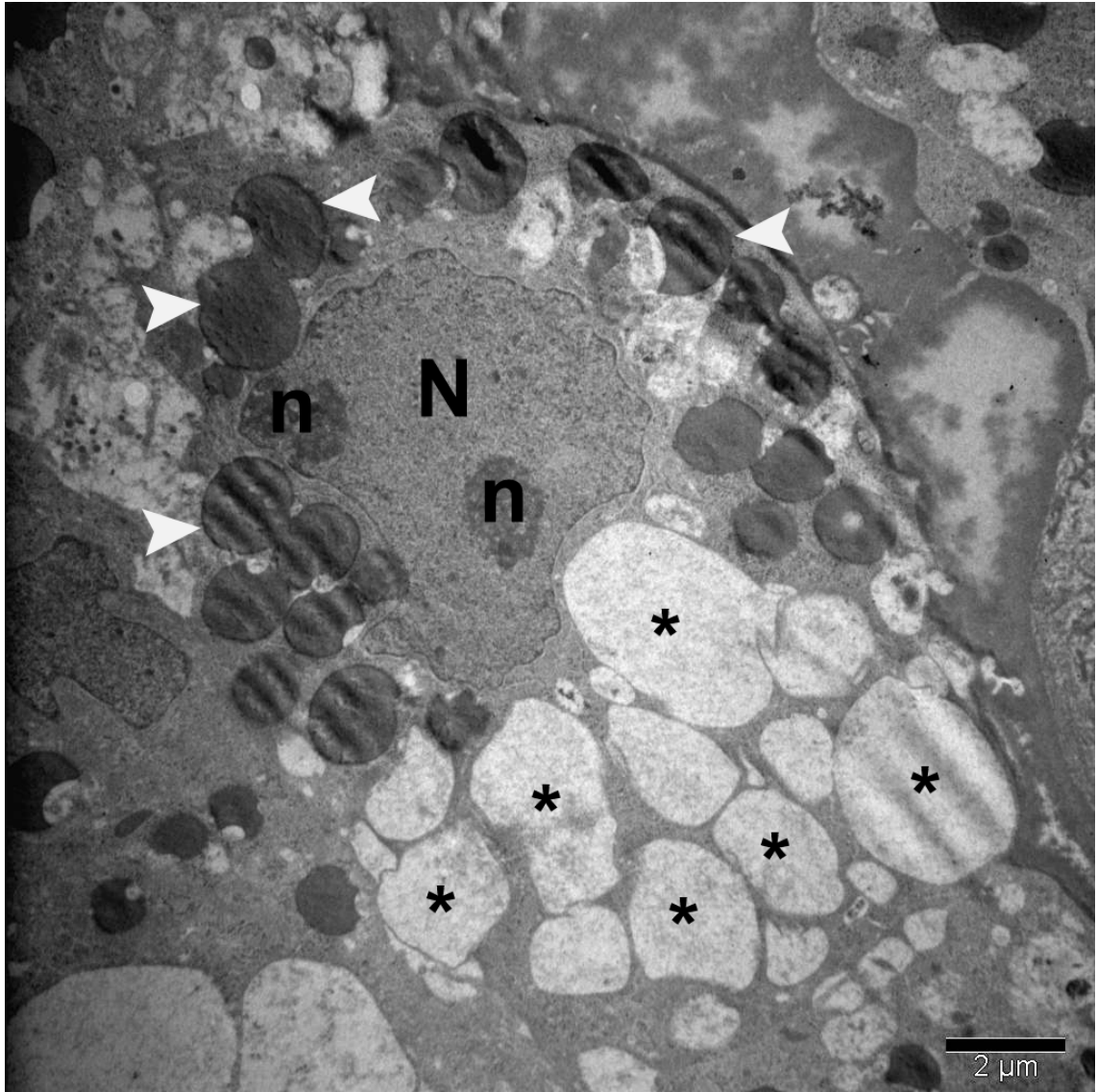
Şekil 4-15: EF-DMSO grubuna ait GH 'nin elektron mikroskopik görüntüsü görülmektedir.



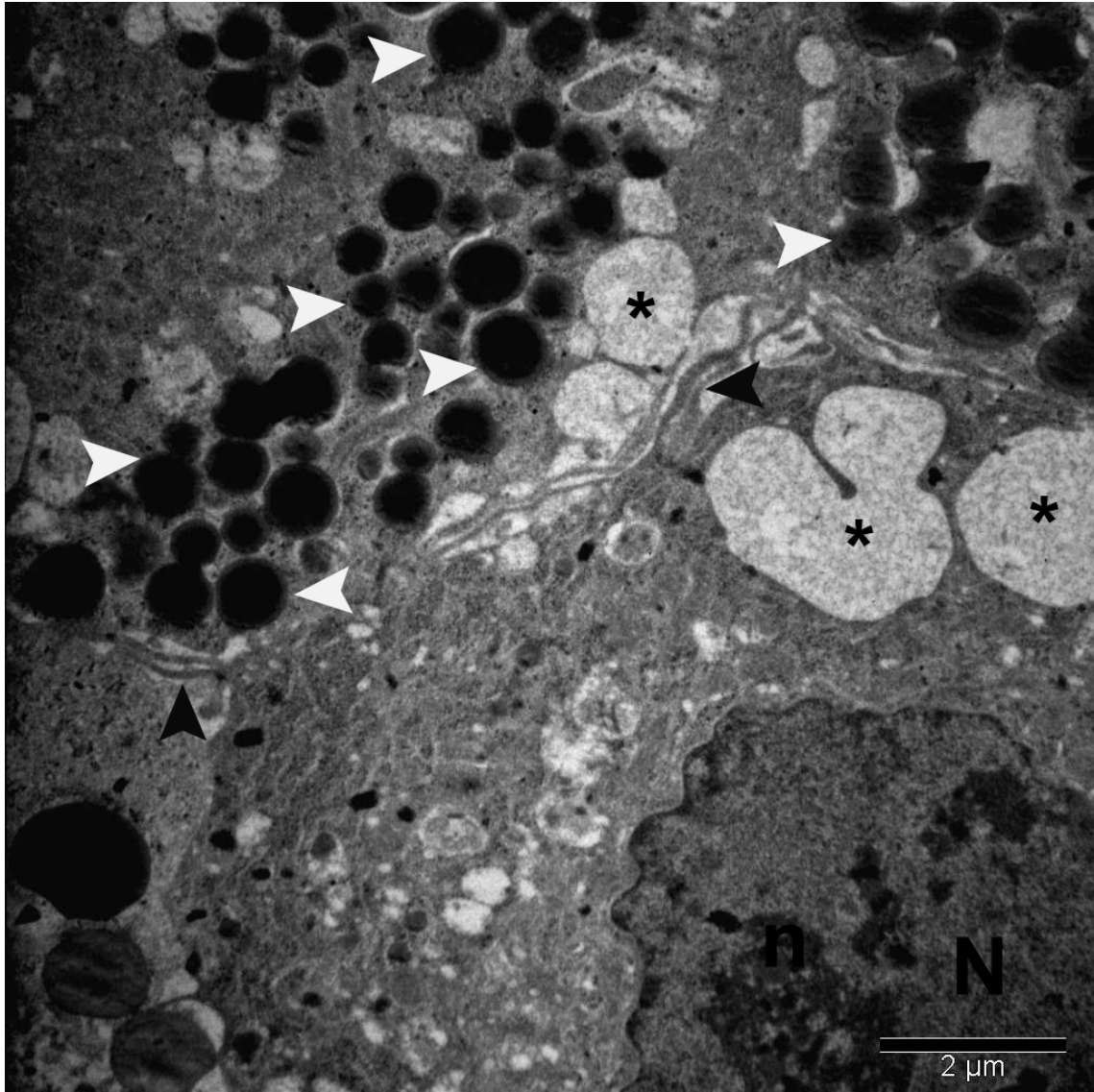
Şekil 4-16: EF-LQ grubuna ait GH ‘nin elektron mikroskopik görüntüsü görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).



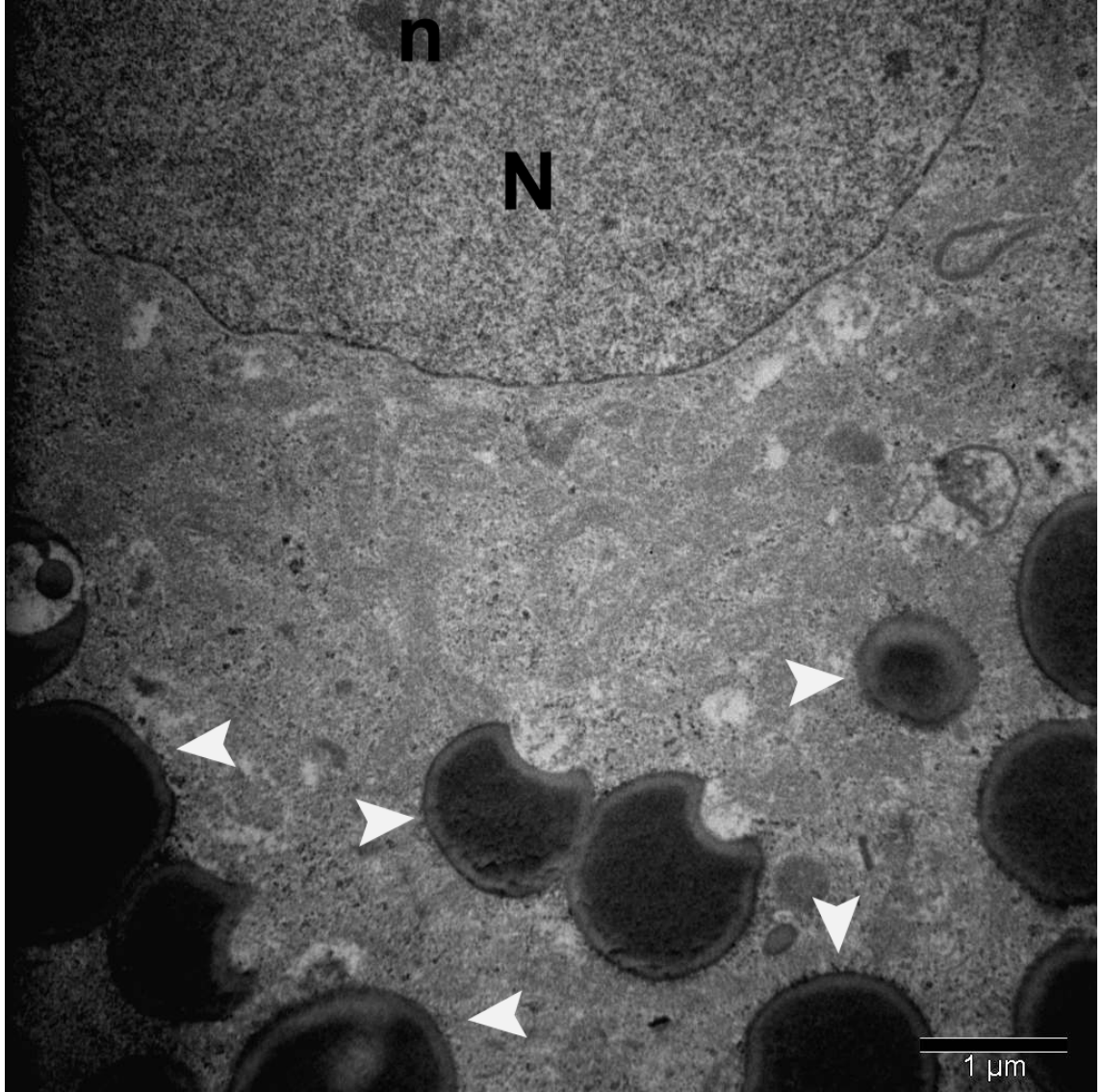
Şekil 4-17: OF grubuna ait GH ‘lerinin elektron mikroskopik görüntüsü görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), mikrovillus (siyah okbaşı), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).



Şekil 4-18: OF-DMSO grubuna ait GH 'lerinin elektron mikroskopik görüntüsü görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).



Şekil 4-19: OF-LQ grubuna ait GH 'lerinin elektron mikroskopik görüntüsü görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), mikrovillus (siyah okbaşı), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).



Şekil 4-20: OF-LQ grubuna ait GH ‘nin elektron mikroskopik görüntüsü görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), vakuol (asterisk) ve lipid damlacığı (beyaz okbaşı).

5. TARTIŞMA

Kadınlarda görülen infertilite her geçen gün artan bir sağlık sorunudur (Jaber et al., 2022; Meccariello, 2022; X. Zhang et al., 2022). Dünya geneline bakıldığında 185 milyondan fazla insanın infertiliteden muzdarip olduğu görülmektedir ve çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerdedir. Doğurganlık çağındaki kadınlarda infertilite prevalansının batı dünyasında her yedi çiftten biri ve gelişmekte olan ülkelerde her dört çiftten biri olduğu tahmin edilmektedir. İnfertilite ABD’li kadınların %8,8’ini etkilerken, bazı bölgelerde infertilite oranları %30’lara kadar çıkmaktadır (Carson & Kallen, 2021; Vander Borcht & Wyns, 2018). Doğurganlığın en güçlü negatif prediktif faktörü kadınların gebe kalma yaşının artışı ve yaşlanmadır. Yaşam tarzı, beslenme, genetik ve çevresel faktörler gibi diğer faktörlerin de bunda artan bir rol oynadığına inanılmaktadır (R. L. Krisher, 2013).

On iki aylık düzenli korunmasız cinsel ilişkiden sonra gebelik elde edilememesi olarak tanımlanan infertilitenin genellikle 15 ila 49 yaş arasındaki kadınlar arasında görüldüğü bilinmektedir. İnfertil çiftlerin %85’inde normal fizyolojideki tanımlanabilir anormallikler; sıklıkla önemli fiziksel rahatsızlıklar, duygusal stres veya altta yatan hastalıklar gibi hastalıklar saptanmaktadır. İnfertilitenin en yaygın nedenleri ovulatuvar disfonksiyon, erkek faktörü infertilitesi ve tubal bozukluklardır (Carson & Kallen, 2021). İnfertil tanısı konmuş çiftlerin %30-40’ında erkeğe bağlı, %40-50’sinde ise kadına bağlı nedenlerin olduğu görülmektedir (Satar, 2013). Bu durum infertilite olgularının yarısından azına erkek infertilitesinin neden olduğunu göstermektedir (Kütükoğlu, 2019). İVF merkezlerinde LQ’nun başta granüloza hücreleri için alternatif bir medyum ajanı olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmak amacıyla yaptığımız çalışmamızda 18 yaş ve üzeri 35 hastanın %57,14’ünde OF infertilitesi ve %42,86’sında EF infertilitesi tespit edilmiştir. Bu oranlar literatürde rapor edilen OF ve EF tanımlı olguların oranlarına benzerdir ve bu nedenle hasta popülasyonumuzu OF ve EF infertiliteli hastalardan seçtik ve oosit-kümüllüs kompleksinden elde edilen granüloza hücrelerini çalışmaya dahil ederek iki grup arasında karşılaştırdık.

Yaşlanma kadınlarda üremeyi etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Ahmed et al., 2019). Maternal yaşın ilerlemesi ile birlikte hem oosit sayısı hem de oosit kalitesi azalmaktadır (Llonch et al., 2021; Mikwar, MacFarlane, & Marchetti, 2020; Moghadam, Moghadam, Hemadi, & Saki, 2022; S. U. Park, Walsh, & Berkowitz,

2021). 30-35 yaş arası kadınlarda doğurganlıktaki azalma yavaş ve sabit bir şekilde olurken, bu düşüş 35 yaşından sonra yumurtalık rezervindeki ve oosit kalitesindeki azalmaya bağlı olarak hızlanır. İVF ünitelerinde yapılan çalışmalar, annenin yaşının klinik sonuçları etkileyen faktörlerin başında geldiğini göstermektedir (Tan, Lau, Loh, & Tan, 2014). Amerika Birleşik Devletlerinde YÜT ünitesine başvuran 120.000'den fazla kişinin katıldığı bir çalışmada 35 yaşından küçük kadınlarda embriyo transferi başına düşen başarılı gebelik oranı %43,2 iken, 41-42 yaşındaki kadınlarda bu oran %15,1 ve 42 yaşından büyük kadınlarda bu oranın %5,9'a düştüğü görülmüştür (Wright, Schieve, Reynolds, & Jeng, 2002). Yaşa bağlı oluşan oosit kalitesinin düşüşünden, mitokondri hasarı (Almansa-Ordenez, Bellido, Vassena, Barragan, & Zambelli, 2020) ve gen ekspresyonunu etkileyen epigenetik değişiklikler (Chamani & Keefe, 2019) gibi birçok biyolojik yolağın sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda yaş ve oosit sayısı arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır. Hastaların yaşları ilerledikçe elde edilen oosit sayılarının azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca OF grubundaki olguların yaş ortalamasının, EF grubundaki olguların yaş ortalamasından anlamlı derecede büyük olduğu saptandı.

İmplantasyon potansiyeli daha yüksek olan embriyo seçimi, YÜT ünitelerindeki infertilite tedavilerinin en büyük zorluklarından biri olmuştur. Bu seçim oosit ve embriyoların morfolojik kriterlerine göre belirlenmektedir (Assou, Haouzi, De Vos, & Hamamah, 2010). Bunun yanı sıra kümülüs granüloza hücrelerinin folikül gelişimi ve oositlerin büyümesindeki kritik rolü nedeniyle, birkaç çalışma oosit kalitesinin kümülüs granüloza hücrelerinin canlılığı tarafından belirlendiğini göstermiştir (Kahraman et al., 2018; Turathum et al., 2021). Kaliteli oositin kullanılması İVF sonuçlarını olumlu yönde etkilemektedir, ancak hangi oositin seçileceği hala bir sorun oluşturmaktadır. Kümülüs-granüloza hücreleri oosit için gerekli olan besinlerin ve sinyal moleküllerinin üretilmesini sağlarlar (Taghizabet et al., 2018). Kümülüs granüloza hücrelerinin oositin değerlendirilmesi ve mikro çevrenin iyileştirilmesi amacıyla kullanılması indirekt olarak İVF sonuçlarına katkı sağlayabilir. Bu nedenle bizde çalışmamızda, OF ve EF tanıli hastalardan toplanan kümülüs-oosit kompleksleri embriyoloji laboratuvarımızda stereo mikroskop altında incelenmiş ve temiz (kansız) ve uygun olanların kümülüs granüloza hücreleri değerlendirmeye alınmıştır.

Yapılan çalışmalar ileri gebelik yaşına sahip kişilerde oosit gelişimi sırasında artan intrafoliküler ROS ve antioksidan mekanizmalardaki eksikliğin, kümülüs

granüloza hücrelerindeki mitokondri fonksiyonu değiştirerek ATP üretimini azalttığını göstermektedir (Dumesic et al., 2015; Taugourdeau et al., 2019). İleri yaşın granüloza hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen bazı çalışmalar süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan etkiye sahip enzimlerin yaşla beraber azaldığını bildirmiştir (Qian et al., 2016; Tatone et al., 2006). Çalışmamızda OF ve EF gruplarının her ikisinde de folikül, oosit ve MII oosit sayılarında yaş ile beraber fark edilen bir etki izlenmiştir. Fakat OF grubunda folikül ve oosit sayılarının, EF grubuna göre daha düşük olması, OF infertilitesinin etkilerini açıkça ortaya koymaktadır.

Oosit foliküler mikro çevre içinde birkaç tabakadan oluşan granüloza hücreleri ile çevrilidir. Bu folikül hücreleri folikülogenez ile beraber mural ve kümülüs granüloza hücrelerine farklılaşırlar. Kümülüs granüloza hücreleri oosite daha yakın yerleşimli bulunurlar ve oositle iletişim halindedirler (Barrett & Albertini, 2010). Hem mural hem de kümülüs granüloza hücreleri oosite besin desteği ve olgunlaşmasını sağlayan faktörler salgılayarak oositin gelişimine katkıda bulunmaktadır. Oositi çevreleyen kümülüs granüloza hücreleri, oosit matürasyonuna yardım ederken aynı zamanda oositi sistemik hastalıkların ve çevresel etmenlerin zararlı etkilerine karşı korurlar (Da Broi et al., 2018). Ayrıca granüloza hücrelerinin kendi antioksidan enzim sistemlerine sahip olması oositi oksidatif stresin neden olduğu hasara karşı da korumaktadır (Cetica, Pintos, Dalvit, & Beconi, 2001). Bu nedenle IVF prosedürleri ile elde edilen kümülüs granüloza hücrelerinin morfolojisi ve sayısı, oositin gelişimsel yeterliliğinin değerlendirilmesinde, embriyo ve gebelik sonuçlarının belirlenmesinde biyo-belirteç olarak kullanılmaktadır (Assidi, Dieleman, & Sirard, 2010; Assou et al., 2010; Li, McKenzie, & Matzuk, 2008). Bu nedenle çalışmamızda hem OF hem de EF grubundaki granüloza hücrelerinin morfolojileri, dejenerasyonları, piknotik nükleus veya apoptotik cisimler ile vakuollerin varlığı ayrıntılı olarak incelenmiştir. LQ uygulanan EF ve OF gruplarının granüloza hücrelerinde, diğer gruplara göre apoptotik cisimcik ve vakuol sayısının daha az olduğu ve vakuol boyutlarının da daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Bu da LQ'nun hücrelerin canlılığını koruyarak apoptozu önlediğini düşündürmüştür.

Son yıllarda, GH'lerde lipit metabolizmasına karşı da artan bir ilgi görülmüştür. GH'lerde lipit metabolizmasının insanda ve diğer memelilerde ovaryum folikül gelişimini sürdürmek için gerekli olduğuna dair kanıtlar vardır (Campbell, Onions, Kendall, Guo, & Scaramuzzi, 2010; Elis et al., 2015; Hu & Qiao, 2011) Lipid metabolizması, foliküler gelişim için önemli olan granüloza hücrelerinin işlevlerinin

düzenlenmesine katılır (X. Chen et al., 2020). Lipid damlacıkları (LD'ler), enerji üretimi, membran biyogenez ve sinyal moleküllerinin sentezi için kullanılan lipidlerin depolanmasında yerleşik bir işleve sahiptir (Liao et al., 2022). Buna rağmen, GH'lerde lipid metabolizmasının omurgalı ovaryum fonksiyonlarını kontrol eden temel mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir (X. Chen et al., 2020). Bizde çalışmamızda OF ve OF-DMSO gruplarının elektron mikroskopik incelemesinde granüloza hücrelerinin sitoplazmasında az sayıda ve büyük çaplı lipid damlacıkları olduğunu gözlemledik. EF, EF-DMSO ve EF-LQ gruplarının elektron mikroskopik incelemesinde granüloza hücrelerinin sitoplazmasında fazla sayıda ve küçük çaplı lipid damlacıkları olduğunu saptadık. OF-LQ grubunda ise lipid damlacıklarının sayıca arttığını ve boyutlarının küçüldüğünü gözlemledik. EF, EF-DMSO ve EF-LQ gruplarında sayıca fazla ve yeni sentezlenmiş küçük çaplı lipid damlacıklarının olması granüloza hücrelerinin aktif bir metabolizmaya sahip olduğunu göstermektedir. OF ve OF-DMSO gruplarının granüloza hücrelerinde ise sayıca az ve yaşlı büyük çaplı lipid damlacıklarının olması inaktif metabolizmaya sahip olduğunu gösterirken, OF-LQ grubunda lipid damlacıklarının sayıca artması çaplarının küçülmesi bize LQ'nun metabolizma üzerinde olumlu etkileri olduğunu düşündürmektedir.

Kümüls granüloza hücreleri, bilindiği üzere çeşitli parakrin sinyal yolları aracılığıyla oosit matürasyonu için gerekli olan besinleri sağlamaktadır (Mehlmann, 2005). Perez ve ark.'ları kümüls granüloza hücrelerinin Fas/Fas ligand (FasL) yolağı aracılığı ile oosit yaşlanması sürecini aktive etmede rol aldıklarını göstermişlerdir. Fas/FasL yolağı farklı türdeki hücrelerde hücre ölümünü indükler (Dhein, Walczak, Bäuml, Debatin, & Krammer, 1995; Ju et al., 1995; Matsumura et al., 1998; Poulaki, Mitsiades, & Mitsiades, 2001). Metalloproteinazların aracılık ettiği FasL bölünmesi sonucu kümüls granüloza hücrelerinde FasL'nin çözülebilir formu açığa çıkar ve NADPH oksidaz bağımlı mekanizmalarla ROS miktarını artırır. Artan ROS oositteki Fas'ı aktive ederek kaspaz 3 üzerinden oosit fragmentasyonuna ve apoptozuna neden olur. Zhu ve ark.'ları, yaşlanan oositin etrafındaki kümüls granüloza hücrelerinden FasL 'nin çözülebilir formunun sekrete edildiğini, ayrıca fonksiyonel bir FasL olmadığında oosit yaşlanmasının da olmadığını göstermiştir (Zhu et al., 2015). Çalışmamızda OF grubunda granüloza hücre canlılığının, EF grubuna kıyasla azaldığını ve bunun altında yatan nedenlerden bir tanesinin de ROS'un yukarıda bahsedilen sinyal yollarını aktive ederek apoptozu indüklemesi olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle

de çalışmamızda anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-proliferatif ve östrojenik etkileri olan LQ'yu kullandık ve EF-LQ ile OF-LQ gruplarında apoptoz morfoloji açısından olumlu etkileri olduğunu gözlemledik.

İnfertilite ile ilgili çalışmalara bakıldığında, kümülüs granüloza hücrelerinin oksidatif stres gibi nedenlere bağlı çeşitli mekanizmalarla zarar görmesinin ve apoptozunun; oosit kalitesini, fertilizasyon ve gebelik oranlarını düşürdüğü gözlemlenmiştir (Høst, Gabrielsen, Lindenberg, & Smidt-Jensen, 2002; Kong et al., 2021; K. S. Lee et al., 2001; Li et al., 2008; Uyar, Torrealday, & Seli, 2013). Çalışmamızda özellikle OF grubundaki granüloza hücrelerinin sitoplazmasında apoptozisin belirtilerinden biri olan apoptotik cisimler ve çeşitli büyüklük ve miktarda vakuoller saptanması yukarıdaki bilgileri doğrulamaktadır.

Sirtuinler, son zamanlarda vücut homeostazı için anahtar metabolik sensörler olarak ortaya çıkmış olan bir NAD⁺ bağımlı deasetilaz ailesidir. Memelilerde sirtuin ailesinin yedi üyesi vardır ve SIRT 1-7 olarak adlandırılır. SIRT1, SIRT2 ve SIRT3 'ün, oositin postovulatuvar yaşlanmasında koruyucu etkileri olduğu ortaya çıkmıştır. İçlerinden SIRT2, glukoneogenezin hız sınırlayıcı enzimi olan fosfoenolpiruvat karboksikinaz 1'in proteasomal bozunmasını engelleyerek karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (North & Verdin, 2007). SIRT2'nin son zamanlarda mitoz ve metabolizma üzerinde önemli etkileri olduğu gösterilmiştir. Oosit sitoplazmasında ve çekirdekte yer alan SIRT2 mayoz evresinde bol miktarda bulunmuş ve blastosist evresine kadar ekspresyonu giderek azalmıştır (Xu, He, et al., 2019). SIRT2 inhibitörleri ile tedavi, oosit olgunlaşmasının önlenmesi ve düşük kaliteli oositlerin oluşumu ile sonuçlanmıştır. Konfokal tarama ve kantitatif analiz sonuçları, SIRT2 inhibisyonunun spindl/kromozom morfolojisinde belirgin kusurları indüklediğini ve a-tubulin hiperasetilasyonuna yol açtığını göstermiştir. Özellikle, SIRT2 inhibisyonu, oosit mayozu sırasında kortikal granüllerin, endoplazmik retikulumun ve mitokondrinin normal dağılımını bozarak sitoplazmik olgunlaşmayı engellediği belirlenmiştir. Ayrıca SIRT2 inhibitörüne maruz kalmanın, hücre içi ROS birikmesine, ATP üretiminin düşmesine ve oositlerde mitokondri membran potansiyelinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bütün bu çalışmalar SIRT2'ye bağlı deasetilasyon aktivitesinin oosit kalitesi üzerine nasıl etki ettiğine dair potansiyel mekanizmalar hakkında bilgi sağlamaktadır (Xu, Wu, et al., 2019). Redoks reaksiyonlarında faaliyet gösteren FOXO3a, SIRT2 tarafından deasetillenebilir, böylece

antioksidan savunmaların aktivasyonunu (örn. Süperoksit dismutaz) ve hücrel stres altında proapoptotik moleküllerin yukarı regülasyonunu destekler. Ayrıca SIRT2, bir substrat olarak p53'ü de kullanabilir. Ek olarak, SIRT2'nin son zamanlarda hücre dışı oksidatif hasara yanıt olarak glukoz-6-fosfat dehidrojenazın asetilasyon durumunu değiştirdiği ve böylece ana hücre içi indirgeyicilerden biri olan NADPH'nin mevcudiyetini düzenlediği bildirilmiştir (Tatone et al., 2006; H. Wang, Jo, Oh, & Kim, 2017). SIRT2, p65 alt birimini lizin 310'da deasetiller ve bunun sonucunda hücre proliferasyonunu baskılayarak ve immün ve inflamatuvar yanıtları düzenleyerek NF- κ B'ye bağlı sinyalleşmeyi de etkiliyor gibi görünmektedir. Azaltılmış SIRT2 seviyeleri, değiştirilmiş tübülün asetilasyonunun bir etkisi olarak oositin postovulatuvar yaşlanmasına katkıda bulunabilir (Tatone et al., 2006). *SIRT2* geni knockdown yapılan koyunlardan elde edilen granüloza hücrelerinin incelendiği güncel bir çalışmada SIRT2 inhibitörü uygulandığında oosit olgunlaşma oranının azaldığı, bir SIRT2 aktivatörü olan resveratrol uygulandığında ise olgunlaşma oranını arttırdığı gösterilmiştir (Fang et al., 2022). Koyun granüloza hücrelerinde SIRT2'nin knockdownı, oosit olgunlaşma oranını da düşürmüş ve hücre göçü ve bölünme yeteneğinin azalmasına, oksidatif apoptoza, anormal mitokondri gen ekspresyonuna, mitokondri membran potansiyeli ve ATP seviyesinin düşüşüne ve mitofaji seviyesinin artışına yol açmıştır. SIRT2'nin aşırı ekspresyonu, mitokondri membran potansiyelini, ATP seviyesini ve mitokondri fonksiyonu iyileştirmiştir. Ayrıca, granüloza hücrelerinde SIRT2 yıkımının, p-ERK1/2'yi düzenleyerek progesteron salgılanmasını desteklediği gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma, SIRT2'nin ovaryen granüloza hücrelerinin işlevini düzenleyerek, özellikle mitokondri işlevini etkileyerek koyun oosit olgunlaşması için kritik olduğunu göstermiştir (Fang et al., 2022). Literatür bulgularından yola çıkarak kurguladığımız çalışmamızda SIRT2 immunoreaktivitesi granüloza hücrelerinde immunohistokimyasal teknikle incelenmiştir. LQ uygulanan OF ve EF gruplarında SIRT2 immünoreaktivitelerinin, uygulanmayan gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. LQ uygulanmayan OF ve OF-DMSO gruplarının granüloza hücreleri SIRT2 ile daha soluk boyanmış bir sitoplazmaya ve nukleusa sahip olduğu izlenmiştir.

Fizyolojik seviyelerin üzerindeki ROS'un granüloza hücre ölümüne ve sonrasında besinlerin ve canlılığın devamını sağlayan faktörlerin oosite geçişinin bozulmasıyla da oositin ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Luo et al., 2020; Tiwari et al., 2016).

Standart in vitro kültür koşulları oosit kalitesini ve embriyonik gelişimi olumsuz etkileyen başlıca nedenlerden biri olarak kabul edilen ROS miktarını artırır (Leoni & Naitana, 2018). ROS ve ona bağlı oluşan oksidatif hasarı en aza indirmek için kültür medyumlarına antioksidan maddelerin eklenmesi oosit ve embriyoların kalitesini arttırarak ve İVF sonuçlarını olumlu yönde etkileyebilir. Bu amaçla çeşitli ajanların oosit ve embriyo üzerindeki etkisini incelemek için birçok çalışma yapılmıştır. Kim ve ark. domuzdan elde edilen kümülüs granüloza hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, melatonin ile kültüre edilen hücrelerin daha az apoptoza uğradığını ve bu etkiyi süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerini arttırarak ve FAS ligandı azaltarak yaptığını bildirmişlerdir (M. K. Kim et al., 2013). Sirotkin ve ark. hem domuz hem de ineklerden elde edilen granüloza hücrelerinde güçlü bir antioksidan olan quersetin uygulamasının apoptozu engellediğini göstermişlerdir (Sirotkin et al., 2019). Bu antioksidanların dışında kültür medyumlarında; anjiotensin, atriyal natriüretik peptid (Montrezor, Piccinato, Collares, Vireque, & e Silva, 2015), dihidroepiandrostenedion (Tsui, Wang, Lin, & Li, 2017), hyaluronan (Fancsovits et al., 2015), genistein ve yeşil çay ekstresi (Roychoudhury et al., 2018) ve benzeri ajanların kullanımı ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. *Glycyrrhiza radix*'ten izole edilerek elde edilen LQ geleneksel Çin tıbbında oldukça yaygın olarak kullanılan bir flavonoiddir ve anti-inflamatuvar, anti-apopitotik, antioksidan, anti-alerjik, anti-proliferatif ve östrojenik olmak üzere birçok aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Y. W. Kim et al., 2008; S. M. Park et al., 2015; Y. W. Shin et al., 2007; S. P. Zhang, Zhou, Liu, & Cai, 2009). LQ'nun granüloza hücreleri üzerindeki koruyucu etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu açıdan ön deneyler sonucunda belirlenen 40 µM konsantrasyonunda LQ'nun, hem OF hem de EF hastalarından elde edilen kümülüs granüloza hücreleri üzerindeki olumlu etkisi in vitro ortamda karşılaştırılmalı olarak inceleyen çalışmamız özgün bir nitelik taşımaktadır.

LQ oksidatif stres kaynaklı sinyal yollarını etkili bir şekilde engelleyen veya durduran güçlü bir ROS temizleyicisidir (Huang & Chan, 2017). LQ'nun, AMP ile aktive olan protein kinazı aktive ederek ROS seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (Jung et al., 2017). Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplarından hidrojen iyonunu ROS'lara vermesi sayesinde serbest radikal üretimini azaltmaktadır (C. H. Huang et al., 2019). Ayrıca H₂O₂ üretimini inhibe ederek ve süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin aktivitelerini arttırarak da antioksidan etki göstermektedir (S.

M. Park et al., 2015; Tao et al., 2016). Bu etkilerinin yanı sıra LQ kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonunu önleyerek apoptozu engeller (Huang & Chan, 2017). LQ'nun östrojen reseptör β agonisti etki gösterdiği de bildirilmiştir (Kupfer et al., 2008). LQ'nun kadın üreme sistemi üzerindeki etkilerini değerlendiren literatür verileri oldukça azdır. Bizim çalışmamızda LQ'nun insan kümülüs-granüloza hücreleri üzerinde kullanılmasıyla özellikle ovulatuvar faktörlü hastalarda hücreler üzerinde olumlu etkiler olduğu gösterilmiştir.

Oosit ve onu çevreleyen granüloza hücreleri tarafından üretilen ROS, ovulasyon, korpus luteum formasyonu ve oosit matürasyonu için fizyolojik bir öneme sahiptir. Ancak ROS'un aşırı birikimi, üretim ve yıkım arasındaki dengeyi bozarak oksidatif strese ve bunun sonucunda DNA, lipid ve protein hasarına neden olarak hücrenin ölümüne neden olur (Agarwal et al., 2005; He et al., 2016). Ayrıca oksidatif stres tek başına DNA hasarına neden olarak apoptozu başlatabilir (Turathum et al., 2021). Hem deneysel hem de klinik çalışmalar oksidatif stresin, açıklanamayan infertilite (Salmon, Richardson, & Pérez, 2010; Y. Wang, Sharma, Falcone, Goldberg, & Agarwal, 1997), polikistik over sendromu (Victor et al., 2011) ve endometriozis (Mier-Cabrera, Jiménez-Zamudio, García-Latorre, Cruz-Orozco, & Hernández-Guerrero, 2011) vb. gibi infertiliteye neden olan hastalıkların patofizyolojisinde rol aldığını bildirmiştir (Agarwal et al., 2012). Bu nedenle çalışmamızda infertil hastalardan elde ettiğimiz granüloza hücrelerinde, antioksidan enzim miktarını artırarak oksidatif stresi ve inflamasyonu azalttığı bildirilen SIRT2 reaktivitesini inceledik ve anti-hiperlipidemik, anti-inflamatuvar, anti-oksidan, anti-allerjik ve östrojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilen LQ'nun granüloza hücrelerindeki etkilerini araştırdık. SIRT2 immunoreaktivitesinin özellikle LQ uygulanan hem OF hem de EF gruplarında diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit ettik. Bu da SIRT2'nin antioksidan etkisinin infertil hastalarda LQ yardımıyla tetiklenebileceğini göstermektedir.

Blastosistlerin LQ ile ön inkübasyonunun sitrinin kaynaklı apoptozu ve hem in vitro hem de in vivo olarak preimplantasyon ve implantasyon sonrası embriyonik gelişimin bozulmalarını açıkça önlediği bulunmuştur. Ayrıca 20 μ M'den büyük dozlarda LQ'nun, Okratoksin-A'nın (bazı gıda ürünlerinde bulunan bir mikotoksin bileşeni) tetiklediği ROS oluşumunu ve fare blastokistlerinde çeşitli apoptotik parametreleri inhibe ettiğini gösterildi. LQ, hücre içi aşırı ROS oluşumunun baskılanması yoluyla embriyonik gelişim üzerindeki sitotoksik etkileri etkili bir şekilde

hafiflettiği de rapor edilmiştir. Artan yaşa ve oksidatif stres hasarına karşı azalan savunmaların bir kanıtı olarak hücrel modifikasyonlar gerçekleşir ve bunlar ultrastrüktürel düzeyde kanıtlanmıştır (Tatone et al., 2006). Birçok infertilite çalışmasında da granüloza hücrelerine iyi gelebilecek substratlar denenmiş ve bu substratların bu hücelere olan etkileri elektron mikroskopik olarak incelenmiştir. Bazen apoptoz benzeri membran tomurcuklanmaları, kromatin yoğunlaşması ve vakuolizasyonun karakteristik özelliklerini sergileyen morfoloji izlenirken, bazen apoptotik hücre boyutlarında bir azalma olmasına rağmen, nükleus-sitoplazma oranında bir değişiklik olmaması, apoptotik değişiklikler nedeniyle hem çekirdekte hem de sitoplazmada büzülmenin meydana geldiğini gösteren bulgularla karşı karşıya kalınmıştır (Chitnis et al., 2008; J. De Bruin et al., 2004). Ancak şu ana kadar literatürde LQ'nun granüloza hücreleri üzerindeki etkisini elektron mikroskopik bulgularıyla tartışan bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda LQ uygulanan EF tanılı hastalarda kümülüs granüloza hücrelerinin şekil ve boyutlarının nispeten birbirine benzer olduğu, belirgin oval bir nükleus ve bir veya birden fazla nükleolusa sahip olduğu izlenmiştir. OF-LQ grubu kümülüs granüloza hücrelerinin boyut farklılıklarının daha az olduğu, çoğu hücrenin ovale yakın bir şekle sahip olduğu görüldü. Ayrıca LQ uygulanan OF grubundaki kümülüs granüloza hücrelerinin nispeten daha az sayıda vakuol içerdiği ve lipid damlacıklarının göreceli şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak maternal yaşın ilerlemesi ile birlikte oksidatif stres, organel hasarı ve gen ekspresyonunu etkileyen epigenetik değişiklikler nedeniyle hem oosit sayısı hem de oosit kalitesi azalmakta ve infertilite oranı giderek artmaktadır. Kümülüs-granüloza hücreleri oosit için gerekli olan besinlerin ve sinyal moleküllerinin üretilmesini sağlarlar. Kaliteli oositin kullanılması infertilite tedavisinin sonuçlarını olumlu yönde etkilemektedir. Oosit ve embriyoların kalitesini arttırmak için ROS ve ona bağlı oluşan oksidatif hasarı en aza indirmek için kültür medyumlarına antioksidan maddelerin eklenmesi fertilizasyon ihtimalini artırır. LQ'da oksidatif stres kaynaklı sinyal yollarını etkili bir şekilde engelleyen veya durduran güçlü bir ROS temizleyicisidir. Ayrıca anti-inflamatuar, anti-apoptotik, antioksidan, anti-alerjik, anti-proliferatif ve östrojenik olmak üzere birçok aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak LQ'nun kadın üreme sistemi üzerindeki etkilerini değerlendiren literatür verileri oldukça az olup granüloza hücreleri üzerindeki koruyucu ve bunun infertilite üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu açıdan LQ'nun kümülüs

granüloza hücreleri üzerindeki etkisini in vitro ortamda karşılaştırılmalı olarak inceleyen çalışmamız özgün bir nitelik taşımaktadır. Çalışmamızda LQ'nun özellikle ovulatuvar faktörlü infertil hastalarda granüloza hücreleri üzerinde olumlu etkileri olduğu, SIRT2 immunohistokimyasal analizleri ve elektron mikroskopik bulguları eşliğinde gösterilmiştir. LQ'nun oosit ve granüloza hücrelerinde apoptotik süreçler üzerindeki spesifik etkilerinin altında yatan çeşitli düzenleyici mekanizmaları saptayabilmek için daha ileri ve geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- Abedini Najafabadi, A. (2016). Elucidation of the biological roles of Wnt5a signaling in follicle development.
- Ackert, C. L., Gittens, J. E., O'Brien, M. J., Eppig, J. J., & Kidder, G. M. (2001). Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Developmental biology*, 233(2), 258-270.
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 10, 49. doi:10.1186/1477-7827-10-49
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 28. doi:10.1186/1477-7827-3-28
- Ahmed, T. A., Ahmed, S. M., El-Gammal, Z., Shouman, S., Ahmed, A., Mansour, R., & El-Badri, N. (2019). Oocyte aging: the role of cellular and environmental factors and impact on female fertility. *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 8*, 109-123.
- Akbaribazm, M., Goodarzi, N., & Rahimi, M. (2021). Female infertility and herbal medicine: An overview of the new findings. *Food science & nutrition*, 9(10), 5869-5882.
- Al-Gubory, K. H., Fowler, P. A., & Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(10), 1634-1650. doi:10.1016/j.biocel.2010.06.001
- Almansa-Ordóñez, A., Bellido, R., Vassena, R., Barragan, M., & Zambelli, F. (2020). Oxidative stress in reproduction: A mitochondrial perspective. *Biology (Basel)* 9: 1–21. In.
- Anik, I., Kokturk, S., Genc, H., Cabuk, B., Koc, K., Yavuz, S., . . . Anik, Y. (2011). Immunohistochemical analysis of TIMP-2 and collagen types I and IV in experimental spinal cord ischemia–reperfusion injury in rats. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 34(3), 257-264.
- Arora, M. (2013). Cell culture media: a review. *Mater methods*, 3(175), 24.
- Assidi, M., Dieleman, S. J., & Sirard, M.-A. (2010). Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. *Reproduction*, 140(6), 835.
- Assou, S., Haouzi, D., De Vos, J., & Hamamah, S. (2010). Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 16(8), 531-538.
- Ávila, J., González-Fernández, R., Rotoli, D., Hernández, J., & Palumbo, A. (2016). Oxidative stress in granulosa-lutein cells from in vitro fertilization patients. *Reproductive Sciences*, 23(12), 1656-1661.
- Bajpe, P., Prahallad, A., Horlings, H., Nagtegaal, I., Beijersbergen, R., & Bernards, R. (2015). A chromatin modifier genetic screen identifies SIRT2 as a modulator of response to targeted therapies through the regulation of MEK kinase activity. *Oncogene*, 34(4), 531-536.
- Barrett, S. L., & Albertini, D. F. (2010). Cumulus cell contact during oocyte maturation in mice regulates meiotic spindle positioning and enhances developmental competence. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(1), 29-39.

- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272(33), 20313-20316. doi:10.1074/jbc.272.33.20313
- Bi, X., Ye, Q., Li, D., Peng, Q., Wang, Z., Wu, X., . . . Jiang, F. (2019). Inhibition of nucleolar stress response by Sirt1: A potential mechanism of acetylation-independent regulation of p53 accumulation. *Aging cell*, 18(2), e12900.
- Biase, F. H., & Kimble, K. M. (2018). Functional signaling and gene regulatory networks between the oocyte and the surrounding cumulus cells. *BMC genomics*, 19(1), 1-13.
- Bouraki, G., Metallinou, C., Simopoulou, M., Charalabopoulos, K., & Asimakopoulos, B. (2012). Comparison of nine media in the culture of human ovarian granulosa lutein cells. *In Vivo*, 26(5), 823-825.
- Brinster, R. (1963). A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Experimental cell research*, 32, 205.
- Brinster, R., & Biggers, J. (1965). In-vitro fertilization of mouse ova within the explanted fallopian tube. *Reproduction*, 10(2), 277-279.
- Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2001). Definition and causes of infertility. *Reproductive biomedicine online*, 2(1), 173-185.
- Campbell, B. K., Onions, V., Kendall, N. R., Guo, L., & Scaramuzzi, R. J. (2010). The effect of monosaccharide sugars and pyruvate on the differentiation and metabolism of sheep granulosa cells in vitro. *Reproduction*, 140(4), 541-550. doi:10.1530/rep-10-0146
- Cao, L.-J., Hou, Z.-Y., Li, H.-D., Zhang, B.-K., Fang, P.-F., Xiang, D.-X., . . . Ma, Y.-X. (2017). The ethanol extract of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) protects against triptolide-induced oxidative stress through activation of Nrf2. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *Jama*, 326(1), 65-76. doi:10.1001/jama.2021.4788
- Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G., & Beconi, M. (2001). Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB life*, 51(1), 57-64.
- Chamani, I. J., & Keefe, D. L. (2019). Epigenetics and female reproductive aging. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 473.
- Chang, A. S., Dale, A. N., & Moley, K. H. (2005). Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, 146(5), 2445-2453.
- Chen, L., Russell, P., & Larsen, W. (1993). Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular reproduction and development*, 34(1), 87-93.
- Chen, X., Huang, K., Hu, S., Lan, G., Gan, X., Gao, S., . . . Wang, J. (2020). FASN-Mediated Lipid Metabolism Regulates Goose Granulosa Cells Apoptosis and Steroidogenesis. *Front Physiol*, 11, 600. doi:10.3389/fphys.2020.00600
- Chitnis, S. S., Navlakhe, R. M., Shinde, G. C., Barve, S. J., D'Souza, S., Mahale, S. D., & Nandedkar, T. D. (2008). Granulosa cell apoptosis induced by a novel FSH binding inhibitory peptide from human ovarian follicular fluid. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(11), 961-968.

- Choi, E. M., Suh, K. S., & Lee, Y. S. (2014). Liquiritigenin restores osteoblast damage through regulating oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Phytotherapy research*, 28(6), 880-886.
- Chronopoulou, E., & Harper, J. C. (2015). IVF culture media: past, present and future. *Human reproduction update*, 21(1), 39-55.
- Control, C. f. D., & Prevention. (2014). National public health action plan for the detection, prevention, and management of infertility. *Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control and Prevention*, 1.
- Couse, J. F., Yates, M. M., Deroo, B. J., & Korach, K. S. (2005). Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology*, 146(8), 3247-3262. doi:10.1210/en.2005-0213
- Çelik, A. S., & Kırca, N. (2018). Prevalence and risk factors for domestic violence against infertile women in a Turkish setting. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 231, 111-116.
- Da Broi, M., Giorgi, V., Wang, F., Keefe, D., Albertini, D., & Navarro, P. (2018). Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(5), 735-751.
- De Bruin, J., Dorland, M., Spek, E., Posthuma, G., Van Haaften, M., Looman, C., & Te Velde, E. (2004). Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biology of reproduction*, 70(2), 419-424.
- de Bruin, J. P., Dorland, M., Spek, E. R., Posthuma, G., van Haaften, M., Looman, C. W., & te Velde, E. R. (2002). Ultrastructure of the resting ovarian follicle pool in healthy young women. *Biol Reprod*, 66(4), 1151-1160. doi:10.1095/biolreprod66.4.1151
- Dhein, J., Walczak, H., Bäuml, C., Debatin, K.-M., & Krammer, P. H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*, 373(6513), 438-441.
- Diaz, F., Wigglesworth, K., & Eppig, J. (2007). Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. *Developmental biology*, 305(1), 300-311.
- Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J. J., Khan, S., Jiang, H., . . . Choi, B. H. (2011). Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*, 334(6057), 806-809.
- Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and sterility*, 103(2), 303-316.
- Elis, S., Desmarchais, A., Maillard, V., Uzbekova, S., Monget, P., & Dupont, J. (2015). Cell proliferation and progesterone synthesis depend on lipid metabolism in bovine granulosa cells. *Theriogenology*, 83(5), 840-853. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.019
- Fancsovits, P., Lehner, A., Murber, A., Kaszas, Z., Rigo, J., & Urbancsek, J. (2015). Effect of hyaluronan-enriched embryo transfer medium on IVF outcome: a prospective randomized clinical trial. *Archives of gynecology and obstetrics*, 291(5), 1173-1179.
- Fang, X., Xia, W., Li, S., Qi, Y., Liu, M., Yu, Y., . . . Wang, Z. (2022). SIRT2 Is Critical for Sheep Oocyte Maturation through Regulating Function of Surrounding Granulosa Cells. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 5013.

- Fidler, A. T., & Bernstein, J. (1999). Infertility: from a personal to a public health problem. *Public Health Rep*, 114(6), 494-511. doi:10.1093/phr/114.6.494
- Fishel, S. (2018). First in vitro fertilization baby-this is how it happened. *Fertil Steril*, 110(1), 5-11. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.03.008
- Frye, R. A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 273(2), 793-798.
- Gartner, L. P. (2017). *Textbook of Histology* (Vol. 4th Ed.): Elsevier.
- Gilchrist, R., Ritter, L., & Armstrong, D. (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal reproduction science*, 82, 431-446.
- Goldberg, J. M., Falcone, T., & Attaran, M. (2007). In vitro fertilization update. *Cleveland Clinic journal of medicine*, 74(5), 329.
- Gomes, P., Outeiro, T. F., & Cavadas, C. (2015). Emerging role of sirtuin 2 in the regulation of mammalian metabolism. *Trends in pharmacological sciences*, 36(11), 756-768.
- Grazul-Bilska, A. T., Reynolds, L. P., & Redmer, D. A. (1997). Gap junctions in the ovaries. *Biology of reproduction*, 57(5), 947-957.
- Green, S. E. (2015). *In Vitro Comparison of Estrogenic Activities of Popular Women's Health Botanicals*. University of Illinois at Chicago,
- Grzelak, A., Rychlik, B., & Bartosz, G. (2001). Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media. *Free Radic Biol Med*, 30(12), 1418-1425. doi:10.1016/s0891-5849(01)00545-7
- Hagen, T. M., Yowe, D. L., Bartholomew, J. C., Wehr, C. M., Do, K. L., Park, J. Y., & Ames, B. N. (1997). Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3064-3069. doi:10.1073/pnas.94.7.3064
- Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., . . . Blander, G. (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic β cells. *Cell*, 126(5), 941-954.
- Hajirahimkhan, A., Simmler, C., Dong, H., Lantvit, D. D., Li, G., Chen, S. N., . . . Bolton, J. L. (2015). Induction of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) by Glycyrrhiza Species Used for Women's Health: Differential Effects of the Michael Acceptors Isoliquiritigenin and Licochalcone A. *Chem Res Toxicol*, 28(11), 2130-2141. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00310
- He, Y., Deng, H., Jiang, Z., Li, Q., Shi, M., Chen, H., & Han, Z. (2016). Effects of melatonin on follicular atresia and granulosa cell apoptosis in the porcine. *Molecular Reproduction and Development*, 83(8), 692-700.
- Hess, K. A., Chen, L., & Larsen, W. J. (1999). Inter- α -inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biology of reproduction*, 61(2), 436-443.
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & de Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food chemistry*, 121(3), 691-696.
- Hollman, P., & Katan, M. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 51(8), 305-310.
- Høst, E., Gabrielsen, A., Lindenberg, S., & Smidt-Jensen, S. (2002). Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation,

- maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, 77(3), 511-515.
- Hu, W., & Qiao, J. (2011). Expression and regulation of adipocyte fatty acid binding protein in granulosa cells and its relation with clinical characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrine*, 40(2), 196-202. doi:10.1007/s12020-011-9495-9
- Huang, C. H., & Chan, W. H. (2017). Protective Effects of Liquiritigenin against Citrinin-Triggered, Oxidative-Stress-Mediated Apoptosis and Disruption of Embryonic Development in Mouse Blastocysts. *Int J Mol Sci*, 18(12). doi:10.3390/ijms18122538
- Huang, C. H., Wang, F. T., & Chan, W. H. (2019). Prevention of ochratoxin A-induced oxidative stress-mediated apoptotic processes and impairment of embryonic development in mouse blastocysts by liquiritigenin. *Environ Toxicol*, 34(5), 573-584. doi:10.1002/tox.22724
- Huang, C. H., Wang, F. T., & Chan, W. H. (2019). Prevention of ochratoxin A-induced oxidative stress-mediated apoptotic processes and impairment of embryonic development in mouse blastocysts by liquiritigenin. *Environmental toxicology*, 34(5), 573-584.
- Ilbay, G., Balıkcı, A., Köktürk, S., Yılmaz, M. Y., Ates, N., Baydemir, C., & Balcı, S. (2022). Neonatal Tactile Stimulation Downregulates Dendritic Spines in Layer V Pyramidal Neurons of the WAG/Rij Rat Somatosensory Cortex. *Neural Plasticity*, 2022.
- Infertility, W. (1991). A tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. *Programme on material and child health and family planning division of family health*. Geneva: World Health Organization.
- Jaber, D. J., Basheer, H. A., Albsoul-Younes, A. M., Elsalem, L. M., Hamadneh, J. M., Dweib, M. K., & Ahmedah, H. T. (2022). Prevalence and predictive factors for infertility-related stress among infertile couples: A cross-sectional study from Jordan and the occupied Palestinian territories. *Saudi Med J*, 43(10), 1149-1156. doi:10.15537/smj.2022.43.10.20220411
- Jahromi, B. N., Farrokhnia, F., Tanideh, N., Kumar, P. V., Parsanezhad, M. E., & Alaei, S. (2019). Comparing the effects of glycyrrhiza glabra root extract, a cyclooxygenase-2 inhibitor (celecoxib) and a gonadotropin-releasing hormone analog (diphereline) in a rat model of endometriosis. *International Journal of Fertility & Sterility*, 13(1), 45.
- Ji, Y., Hu, W., Jin, Y., Yu, H., & Fang, J. (2021). Liquiritigenin exerts the anti-cancer role in oral cancer via inducing autophagy-related apoptosis through PI3K/AKT/mTOR pathway inhibition in vitro and in vivo. *Bioengineered*, 12(1), 6070-6082. doi:10.1080/21655979.2021.1971501
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29(4), 557-568. doi:10.1016/j.beem.2015.04.008
- Ju, S.-T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., Ei-Khatib, M., Sherr, D. H., . . . Marshak-Rothstein, A. (1995). Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*, 373(6513), 444-448.
- Jung, E. H., Lee, J. H., Kim, S. C., & Kim, Y. W. (2017). AMPK activation by liquiritigenin inhibited oxidative hepatic injury and mitochondrial dysfunction induced by nutrition deprivation as mediated with induction of farnesoid X receptor. *Eur J Nutr*, 56(2), 635-647. doi:10.1007/s00394-015-1107-7

- Kahraman, S., Çetinkaya, C. P., Çetinkaya, M., Tüfekçi, M. A., Ekmekçi, C. G., & Montag, M. (2018). Is there a correlation between follicle size and gene expression in cumulus cells and is gene expression an indicator of embryo development? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 1-10.
- Kala, M., Shaikh, M. V., & Nivsarkar, M. (2017). Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reprod Med Biol*, 16(1), 28-35. doi:10.1002/rmb2.12013
- Kaur, R., Kaur, H., & Dhindsa, A. S. (2013). Glycyrrhiza glabra: a phytopharmacological review. *International journal of pharmaceutical Sciences and Research*, 4(7), 2470.
- Khan, I., Kim, S. W., Lee, K.-L., Song, S.-H., Mesalam, A., Chowdhury, M., . . . Kong, I.-K. (2017). Polydatin improves the developmental competence of bovine embryos in vitro via induction of sirtuin 1 (Sirt1). *Reproduction, Fertility and Development*, 29(10), 2011-2020.
- Kidder, G. M., & Mhawi, A. A. (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 123(5), 613-620.
- Kierszenbaum, A. L. (2019). *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology* (Vol. 5th Ed.): Elsevier.
- Kim, M. K., Park, E. A., Kim, H. J., Choi, W. Y., Cho, J. H., Lee, W. S., . . . Yoon, T. K. (2013). Does supplementation of in-vitro culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS? *Reproductive biomedicine online*, 26(1), 22-29.
- Kim, Y. W., Kang, H. E., Lee, M. G., Hwang, S. J., Kim, S. C., Lee, C. H., & Kim, S. G. (2009). Liquiritigenin, a flavonoid aglycone from licorice, has a choleric effect and the ability to induce hepatic transporters and phase-II enzymes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(2), G372-381. doi:10.1152/ajpgi.90524.2008
- Kim, Y. W., Lee, S. M., Shin, S. M., Hwang, S. J., Brooks, J. S., Kang, H. E., . . . Kim, S. G. (2009). Efficacy of sauchinone as a novel AMPK-activating lignan for preventing iron-induced oxidative stress and liver injury. *Free Radic Biol Med*, 47(7), 1082-1092. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.018
- Kim, Y. W., Zhao, R. J., Park, S. J., Lee, J. R., Cho, I. J., Yang, C. H., . . . Kim, S. C. (2008). Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol*, 154(1), 165-173. doi:10.1038/bjp.2008.79
- Ko, Y. H., Kwon, S. H., Hwang, J. Y., Kim, K. I., Seo, J. Y., Nguyen, T. L., . . . Jang, C. G. (2018). The Memory-Enhancing Effects of Liquiritigenin by Activation of NMDA Receptors and the CREB Signaling Pathway in Mice. *Biomol Ther (Seoul)*, 26(2), 109-114. doi:10.4062/biomolther.2016.284
- Kong, P., Yin, M., Tang, C., Zhu, X., Bukulmez, O., Chen, M., & Teng, X. (2021). Effects of early cumulus cell removal on treatment outcomes in patients undergoing in vitro fertilization: a retrospective cohort study. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 669507.
- Krebs, H. A., & Henseleit, K. (1932). Untersuchungen uber die Harnstoffbildung im Tierkörper.
- Krisher, R. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science*, 82(suppl_13), E14-E23.
- Krisher, R. L. (2013). In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. *Annu Rev Anim Biosci*, 1(1), 393-417.

- Kuhl, W. (1941). Untersuchungen über die Cytodynamik der Furchung und-
Frühentwicklung des Eies der weißen Maus.
- Kupfer, R., Swanson, L., Chow, S., Staub, R. E., Zhang, Y. L., Cohen, I., & Christians, U. (2008). Oxidative in vitro metabolism of liquiritigenin, a bioactive compound isolated from the Chinese herbal selective estrogen beta-receptor agonist MF101. *Drug Metab Dispos*, 36(11), 2261-2269. doi:10.1124/dmd.108.021402
- Kütükoğlu, K. (2019). *Erkek faktörlü infertil olgularda embriyo gelişiminin değerlendirilmesi*. Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
- Lasienė, K., Vitkus, A., Valančiūtė, A., & Lasys, V. (2009). Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina*, 45(7), 509.
- Lee, J. W., Hyun, M. K., Kim, H. J., & Kim, D. I. (2021). Acupuncture and herbal medicine for female infertility: an overview of systematic reviews. *Integr Med Res*, 10(3), 100694. doi:10.1016/j.imr.2020.100694
- Lee, K. S., Joo, B. S., Na, Y. J., Yoon, M. S., Choi, O. H., & Kim, W. W. (2001). Clinical assisted reproduction: cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 18(9), 490-498.
- Lemasters, J. J., & Nieminen, A. L. (1997). Mitochondrial oxygen radical formation during reductive and oxidative stress to intact hepatocytes. *Biosci Rep*, 17(3), 281-291. doi:10.1023/a:1027332611839
- Leoni, G. G., & Naitana, S. (2018). Ovine granulosa cells isolation and culture to improve oocyte quality. In *Epithelial Cell Culture* (pp. 95-106): Springer.
- Lewis, W. H., & Gregory, P. (1929). Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science*, 69(1782), 226-229.
- Li, Q., McKenzie, L. J., & Matzuk, M. M. (2008). Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Molecular Human Reproduction*, 14(12), 673-678.
- Liang, F., Zhang, H., Gao, H., Cheng, D., Zhang, N., Du, J., . . . Yin, L. (2021). Liquiritigenin decreases tumorigenesis by inhibiting DNMT activity and increasing BRCA1 transcriptional activity in triple-negative breast cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*, 246(4), 459-466. doi:10.1177/1535370220957255
- Liao, P. C., Yang, E. J., Borgman, T., Boldogh, I. R., Sing, C. N., Swayne, T. C., & Pon, L. A. (2022). Touch and Go: Membrane Contact Sites Between Lipid Droplets and Other Organelles. *Front Cell Dev Biol*, 10, 852021. doi:10.3389/fcell.2022.852021
- Lin, Y.-H., Hwang, J.-L., Seow, K.-M., Huang, L.-W., Chen, H.-J., & Tzeng, C.-R. (2009). Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 19(2), 165-170.
- Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M., & Guarente, L. (2005). Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21313-21320.
- Liu, F., Day, M., Muñiz, L. C., Bitran, D., Arias, R., Revilla-Sanchez, R., . . . Brandon, N. J. (2008). Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci*, 11(3), 334-343. doi:10.1038/nn2057
- Liu, Y., Xie, S., Wang, Y., Luo, K., Wang, Y., & Cai, Y. (2012). Liquiritigenin inhibits tumor growth and vascularization in a mouse model of HeLa cells. *Molecules*, 17(6), 7206-7216. doi:10.3390/molecules17067206

- Llonch, S., Barragán, M., Nieto, P., Mallol, A., Elosua-Bayes, M., Lorden, P., . . . Payer, B. (2021). Single human oocyte transcriptome analysis reveals distinct maturation stage-dependent pathways impacted by age. *Aging cell*, 20(5), e13360. doi:10.1111/ace1.13360
- Luo, M., Yang, Z. Q., Huang, J. C., Wang, Y. S., Guo, B., & Yue, Z. P. (2020). Genistein protects ovarian granulosa cells from oxidative stress via cAMP-PKA signaling. *Cell Biology International*, 44(2), 433-445.
- Machlin, L. J., & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb j*, 1(6), 441-445.
- Manjula, R., Anuja, K., & Alcaín, F. J. (2021). SIRT1 and SIRT2 activity control in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 585821.
- Mantikou, E., Youssef, M. A., van Wely, M., van der Veen, F., Al-Inany, H. G., Repping, S., & Mastenbroek, S. (2013). Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Human reproduction update*, 19(3), 210-220.
- Martín-Romero, F. J., Miguel-Lasobras, E. M., Domínguez-Arroyo, J. A., González-Carrera, E., & Alvarez, I. S. (2008). Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod Biomed Online*, 17(5), 652-661. doi:10.1016/s1472-6483(10)60312-4
- Matsumura, R., Umemiya, K., Kagami, M., Tomioka, H., Tanabe, E., Sugiyama, T., . . . Okumura, K. (1998). Glandular and extraglandular expression of the Fas-Fas ligand and apoptosis in patients with Sjögren's syndrome. *Clinical and experimental rheumatology*, 16(5), 561-568.
- McLaren, A., & Biggers, J. (1958). Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryos. *Nature*, 182(4639), 877-878.
- Meccariello, R. (2022). Central and Local Modulators of Reproduction and Fertility: An Update. *Int J Mol Sci*, 23(9). doi:10.3390/ijms23095285
- Mehlmann, L. M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130(6), 791-799.
- Meng, F. C., & Lin, J. K. (2019). Liquiritigenin Inhibits Colorectal Cancer Proliferation, Invasion, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Decreasing Expression of Runt-Related Transcription Factor 2. *Oncol Res*, 27(2), 139-146. doi:10.3727/096504018x15185747911701
- Merry, B. (2002). Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(11), 1340-1354.
- Mersereau, J. E., Levy, N., Staub, R. E., Baggett, S., Zogovic, T., Chow, S., . . . Leitman, D. C. (2008). Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor beta agonist. *Mol Cell Endocrinol*, 283(1-2), 49-57. doi:10.1016/j.mce.2007.11.020
- Mescher, A. L. (2016). *Junqueira's Basic Histology* (Vol. 14th Ed.): McGraw-Hill.
- Mier-Cabrera, J., Jiménez-Zamudio, L., García-Latorre, E., Cruz-Orozco, O., & Hernández-Guerrero, C. (2011). Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 118(1), 6-16.
- Mikwar, M., MacFarlane, A. J., & Marchetti, F. (2020). Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 785, 108320. doi:10.1016/j.mrrev.2020.108320

- Moghadam, A. R. E., Moghadam, M. T., Hemadi, M., & Saki, G. (2022). Oocyte quality and aging. *JBRA Assist Reprod*, 26(1), 105-122. doi:10.5935/1518-0557.20210026
- Montrezor, L., Piccinato, C., Collares, C., Vireque, A., & e Silva, A. R. (2015). Effects of angiotensin II, atrial natriuretic peptide and endothelin-1 on proliferation and steroidogenic output of bovine granulosa cells cultured in a chemically defined system. *Animal reproduction science*, 152, 8-16.
- Moore, K. L. (2013). *The Developing Human Clinical Oriented Embryology* (Vol. 9th Ed.): Elsevier.
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2018). *The developing human-e-book: clinically oriented embryology*: Elsevier Health Sciences.
- Morgan, J. F., Morton, H. J., & Parker, R. C. (1950). Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 73(1), 1-8.
- North, B. J., & Verdin, E. (2007). Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PloS one*, 2(8), e784.
- Park, S. M., Ki, S. H., Han, N. R., Cho, I. J., Ku, S. K., Kim, S. C., . . . Kim, Y. W. (2015). Tacrine, an oral acetylcholinesterase inhibitor, induced hepatic oxidative damage, which was blocked by liquiritigenin through GSK3-beta inhibition. *Biol Pharm Bull*, 38(2), 184-192. doi:10.1248/bpb.b14-00430
- Park, S. U., Walsh, L., & Berkowitz, K. M. (2021). Mechanisms of ovarian aging. *Reproduction*, 162(2), R19-r33. doi:10.1530/rep-21-0022
- Pawlina, W. (2016). *Histology A Text and Atlas Correlated With Cell and Molecular Biology* (Vol. 7th Ed.): Wolters Kluwer Health.
- Poulaki, V., Mitsiades, C. S., & Mitsiades, N. (2001). The role of Fas and FasL as mediators of anticancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates*, 4(4), 233-242.
- Qian, Y., Shao, L., Yuan, C., Jiang, C.-Y., Liu, J., Gao, C., . . . Liu, J.-Y. (2016). Implication of differential peroxiredoxin 4 expression with age in ovaries of mouse and human for ovarian aging. *Current Molecular Medicine*, 16(3), 243-251.
- Qu, Z., Ma, X., Huang, S., Hao, X., Li, D., Feng, K., & Wang, W. (2020). SIRT2 inhibits oxidative stress and inflammatory response in diabetic osteoarthritis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*, 24, 2855-2864.
- Ramalingam, M., Kim, H., Lee, Y., & Lee, Y.-I. (2018). Phytochemical and pharmacological role of liquiritigenin and isoliquiritigenin from Radix Glycyrrhizae in human health and disease models. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 348.
- Roychoudhury, S., Halenar, M., Michalcova, K., Nath, S., Kacaniova, M., & Kolesarova, A. (2018). Green tea extract affects porcine ovarian cell apoptosis. *Reproductive biology*, 18(1), 94-98.
- Ruder, E. H., Hartman, T. J., Blumberg, J., & Goldman, M. B. (2008). Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*, 14(4), 345-357. doi:10.1093/humupd/dmn011
- Sadler, T. W. S.-R. S. L. T. K. B. J. I. H. (2019). Langman's medical embryology. Retrieved from <http://meded.lwwhealthlibrary.com/book.aspx?bookid=2487>
- Salmon, A. B., Richardson, A., & Pérez, V. I. (2010). Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radical Biology and Medicine*, 48(5), 642-655.

- Salustri, A., Fulop, C., Camaioni, A., & Hascall, V. (2004). Oocyte-granulosa cell interactions.
- Satar, D. A., Gençdal, Servet. (2013). Sperm değerlendirmesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(4), 532-542. doi:<https://doi.org/10.17827/aktd.29343>
- Schoenwolf. (2008). *Larsen's Human Embryology* (Vol. 4th Ed.): Elsevier.
- Shamsi, M., Nejati, V., Najafi, G., & Pour, S. K. (2020). Protective effects of licorice extract on ovarian morphology, oocyte maturation, and embryo development in PCOS-induced mice: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 18(10), 865.
- Sharma, R., Biedenharn, K. R., Fedor, J. M., & Agarwal, A. (2013). Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 66.
- Shin, S. M., Cho, I. J., & Kim, S. G. (2009). Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3 β inhibition downstream of poly(ADP-ribose)polymerase-LKB1 pathway. *Mol Pharmacol*, 76(4), 884-895. doi:10.1124/mol.109.058479
- Shin, Y. W., Bae, E. A., Lee, B., Lee, S. H., Kim, J. A., Kim, Y. S., & Kim, D. H. (2007). In vitro and in vivo antiallergic effects of Glycyrrhiza glabra and its components. *Planta Med*, 73(3), 257-261. doi:10.1055/s-2007-967126
- Showell, M. G., Mackenzie-Proctor, R., Jordan, V., & Hart, R. J. (2017). Antioxidants for female subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, 7(7), Cd007807. doi:10.1002/14651858.CD007807.pub3
- Sirotkin, A. V., Hrabovszká, S., Štochmal'ová, A., Grossmann, R., Alwasel, S., & Harrath, A. H. (2019). Effect of quercetin on ovarian cells of pigs and cattle. *Animal reproduction science*, 205, 44-51.
- Song, J., Yang, B., Jia, X., Li, M., Tan, W., Ma, S., . . . Feng, L. (2018). Distinctive roles of sirtuins on diabetes, protective or detrimental? *Frontiers in Endocrinology*, 9, 724.
- Speroff, L., & Fritz, M. A. (2005). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*: lippincott Williams & wilkins.
- Strauss III, J. F., Modi, B., & McAllister, J. M. (2014). Defects in ovarian steroid hormone biosynthesis. *Cellular endocrinology in health and disease*, 285-309.
- Su, Y.-Q., Sugiura, K., & Eppig, J. J. (2009). *Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism*. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine.
- Suh, J. H., Heath, S. H., & Hagen, T. M. (2003). Two subpopulations of mitochondria in the aging rat heart display heterogenous levels of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 35(9), 1064-1072. doi:10.1016/s0891-5849(03)00468-4
- Szamatowicz, M. (2016). Assisted reproductive technology in reproductive medicine - possibilities and limitations. *Ginekol Pol*, 87(12), 820-823. doi:10.5603/gp.2016.0095
- Taghizabet, N., Khalili, M. A., Anbari, F., Agha-Rahimi, A., Nottola, S. A., Macchiarelli, G., & Palmerini, M. G. (2018). Human cumulus cell sensitivity to vitrification, an ultrastructural study. *Zygote*, 26(3), 224-231. doi:10.1017/s0967199418000138
- Tan, T. Y., Lau, M. S. K., Loh, S. F., & Tan, H. H. (2014). Female ageing and reproductive outcome in assisted reproduction cycles. *Singapore medical journal*, 55(6), 305.

- Tang, Z. R., Zhang, R., Lian, Z. X., Deng, S. L., & Yu, K. (2019). Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. *Cells*, 8(10). doi:10.3390/cells8101123
- Tao, W., Dong, Y., Su, Q., Wang, H., Chen, Y., Xue, W., . . . Chen, G. (2016). Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway. *Behav Brain Res*, 308, 177-186. doi:10.1016/j.bbr.2016.04.039
- Tatone, C., Carbone, M., Falone, S., Aimola, P., Giardinelli, A., Caserta, D., . . . Amicarelli, F. (2006). Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*, 12(11), 655-660.
- Taugourdeau, A., Desquirit-Dumas, V., Hamel, J.-F., Chupin, S., Boucret, L., Ferré-L'Hotellier, V., . . . Reynier, P. (2019). The mitochondrial DNA content of cumulus cells may help predict embryo implantation. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(2), 223-228.
- Teng, Y.-B., Jing, H., Aramsangtienchai, P., He, B., Khan, S., Hu, J., . . . Hao, Q. (2015). Efficient demyristoylase activity of SIRT2 revealed by kinetic and structural studies. *Scientific reports*, 5(1), 1-8.
- Tesařik, J., Pilka, L., Drahorad, J., Čechová, D., & Veselský, L. (1988). The role of cumulus cell-secreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability: implication in IVF. *Human reproduction*, 3(1), 129-132.
- Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A. N., Ali, I., Singh, A. K., . . . Chaube, S. K. (2015). Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis*, 20(8), 1019-1025.
- Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A. N., Singh, A. K., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2016). Involvement of reactive oxygen species in meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes. *Reactive Oxygen Species*, 1(2), 110-116.
- Tompkins, A. J., Burwell, L. S., Digerness, S. B., Zaragoza, C., Holman, W. L., & Brookes, P. S. (2006). Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia-reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition. *Biochim Biophys Acta*, 1762(2), 223-231. doi:10.1016/j.bbadis.2005.10.001
- Tripathi, A., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2013). An increase of granulosa cell apoptosis mediates aqueous neem (*Azadirachta indica*) leaf extract-induced oocyte apoptosis in rat. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 3(1), 27.
- Tsui, K.-H., Wang, P.-H., Lin, L.-T., & Li, C.-J. (2017). DHEA protects mitochondria against dual modes of apoptosis and necroptosis in human granulosa HO23 cells. *Reproduction*, 154(2), 101-110.
- Turathum, B., Gao, E. M., & Chian, R. C. (2021). The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*, 10(9). doi:10.3390/cells10092292
- Uçan, Ö., Taşçı, S., & Ovayolu, N. (2008). Eleştirel düşünme ve hemşirelik. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 3(7), 17-27.
- Uhde, K., van Tol, H. T., Stout, T. A., & Roelen, B. A. (2018). Metabolomic profiles of bovine cumulus cells and cumulus-oocyte-complex-conditioned medium during maturation in vitro. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
- Usta E, Köktürk S., Doğan S, Altun A, Bulgurcuoğlu Kuran S, Karahan F. . (24 Oct. 2022). THE EFFECTS OF LIQUIRITIGEN ON THE LUKEMIA

- INHIBITORY FACTOR RECEPTOR IN GRANULOSA CELLS OF INFERTILE PATIENTS. . *Journal of Advanced Research in Health Sciences [Internet]*. doi: <https://doi.org/10.26650/JARHS2022-1129686>
- Uyar, A., Torrealday, S., & Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and sterility*, 99(4), 979-997.
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*, 62, 2-10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012
- Vanderhyden, B., Macdonald, E., Nagyova, E., & Dhawan, A. (2003). Evaluation of members of the TGF β superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. *Reprod Suppl*, 61, 55-70.
- Vaquero, A., Scher, M. B., Lee, D. H., Sutton, A., Cheng, H.-L., Alt, F. W., . . . Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes & development*, 20(10), 1256-1261.
- Veiga-Santos, P., Reignault, L. C., Huber, K., Bracher, F., De Souza, W., & De Carvalho, T. M. U. (2014). Inhibition of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins) causes growth arrest and activates both apoptosis and autophagy in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 141(6), 814-825.
- Victor, V. M., Rocha, M., Banuls, C., Alvarez, A., de Pablo, C., Sanchez-Serrano, M., . . . Hernandez-Mijares, A. (2011). Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(10), 3115-3122.
- Vollenhoven, B., & Hunt, S. (2018). Ovarian ageing and the impact on female fertility. *F1000Res*, 7. doi:10.12688/f1000research.16509.1
- Walf, A. A., Koonce, C. J., & Frye, C. A. (2008). Estradiol or diarylpropionitrile administration to wild type, but not estrogen receptor beta knockout, mice enhances performance in the object recognition and object placement tasks. *Neurobiology of learning and memory*, 89(4), 513-521.
- Wang, D., Lu, J., Liu, Y., Meng, Q., Xie, J., Wang, Z., & Teng, L. (2014). Liquiritigenin induces tumor cell death through mitogen-activated protein kinase- (MPAKs-) mediated pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Res Int*, 2014, 965316. doi:10.1155/2014/965316
- Wang, H., Jo, Y.-J., Oh, J. S., & Kim, N.-H. (2017). Quercetin delays postovulatory aging of mouse oocytes by regulating SIRT expression and MPF activity. *Oncotarget*, 8(24), 38631.
- Wang, S., He, G., Chen, M., Zuo, T., Xu, W., & Liu, X. (2017). The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 4371714. doi:10.1155/2017/4371714
- Wang, Y., Sharma, R. K., Falcone, T., Goldberg, J., & Agarwal, A. (1997). Importance portance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertility and sterility*, 68(5), 826-830.
- Wang, Y. P., Zhou, L. S., Zhao, Y. Z., Wang, S. W., Chen, L. L., Liu, L. X., . . . Zhang, J. Y. (2014). Regulation of G 6 PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *The EMBO journal*, 33(12), 1304-1320.
- Whittingham, D. (1968). Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature*, 220(5167), 592-593.

- Wojsiat, J., Korczyński, J., Borowiecka, M., & Żbikowska, H. M. (2017). The role of oxidative stress in female infertility and in vitro fertilization. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 71(0), 359-366. doi:10.5604/01.3001.0010.3820
- Wright, V., Schieve, L., Reynolds, M., & Jeng, G. (2002). Division of Reproductive Health. *National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Assisted reproductive technology surveillance—United States*, 1-24.
- Wyndham, N., Marin Figueira, P. G., & Patrizio, P. (2012). A persistent misperception: assisted reproductive technology can reverse the "aged biological clock". *Fertil Steril*, 97(5), 1044-1047. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.02.015
- Xu, D., He, H., Jiang, X., Hua, R., Chen, H., Yang, L., . . . Li, Q. (2019). SIRT2 plays a novel role on progesterone, estradiol and testosterone synthesis via PPARs/LXR α pathways in bovine ovarian granular cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 185, 27-38.
- Xu, D., Wu, L., Jiang, X., Yang, L., Cheng, J., Chen, H., . . . Li, Q. (2019). SIRT2 inhibition results in meiotic arrest, mitochondrial dysfunction, and disturbance of redox homeostasis during bovine oocyte maturation. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1365.
- Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99-117.
- Yeste, M., Jones, C., Amdani, S. N., Patel, S., & Coward, K. (2016). Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? *Human reproduction update*, 22(1), 23-47.
- Zhang, S. P., Zhou, Y. J., Liu, Y., & Cai, Y. Q. (2009). Effect of liquiritigenin, a flavanone existed from *Radix glycyrrhizae* on pro-apoptotic in SMMC-7721 cells. *Food Chem Toxicol*, 47(4), 693-701. doi:10.1016/j.fct.2008.12.015
- Zhang, X., Guan, Q., Yu, Q., Xiao, W., Chen, Z., Dong, C., . . . Xia, Y. (2022). Estimating the effects of policies on infertility prevalence worldwide. *BMC Public Health*, 22(1), 1378. doi:10.1186/s12889-022-13802-9
- Zhu, J., Zhang, J., Li, H., Wang, T.-Y., Zhang, C.-X., Luo, M.-J., & Tan, J.-H. (2015). Cumulus cells accelerate oocyte aging by releasing soluble Fas ligand in mice. *Scientific reports*, 5(1), 1-8.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

OVULATUAR FAKTÖRLÜ İNFERTİL HASTALARIN GRANÜLOZA
HÜCRELERİNDE LİQUİRİTİGENİN'İN ETKİLERİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE ELEKTRON MİKROSKOBİK
İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 20	% 18	% 3	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 8
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
3	9lib.net İnternet Kaynağı	% 2
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
5	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
7	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	abakus.inonu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1