



**TÜP BEBEK MERKEZİNE BAŞVURAN HASTALARIN
OOSİT MİKROÇEVRESİNDE MEYDANA
GELEN HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
DEĞİŞİKLİKLERİN FERTİLİZASYON BAŞARISI
İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurhan AKARAS

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ

Doktora Tezi -2017

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

**TÜP BEBEK MERKEZİNE BAŞVURAN HASTALARIN
OOSİT MİKROÇEVRESİNDE MEYDANA GELEN
HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLERİN
FERTİLİZASYON BAŞARISI İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nurhan AKARAS

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ**

ERZURUM

2017

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

**TÜP BEBEK MERKEZİNE BAŞVURAN HASTALARIN
OOSİT MİKROÇEVRESİNDE MEYDANA GELEN HİSTOLOJİK
VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLERİN FERTİLİZASYON
BAŞARISI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurhan AKARAS

Tez Savunma Tarihi : 22.12.2017

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Jale SELLİ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Samet KAPAKİN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Şahin ASLAN (Kafkas Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Turgay DEPREM (Kafkas Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehtap TAN
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi
ERZURUM - 2017**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnfertilite	3
2.1.1. Kadın Kaynaklı İnfertilite Nedenleri	3
2.2. Oksidatif Stres.....	3
2.2.1. Serbest Radikaller	4
2.2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	4
2.2.2.1. Antioksidan Çeşitleri	4
2.2.2.1.1. Endojen Antioksidanlar	4
2.2.2.1.2. Ekzojen Antioksidanlar.....	5
2.2.3. Kadın İnfertilitesi ve Oksidatif Stres	5
2.3. Apoptoz.....	6
2.3.1. Apoptozun Düzenlenmesi ve İndüklenmesi	6
2.4. mTOR	7
2.4.1. mTOR Yapısı ve Aktivasyonu.....	7
2.4.2. mTOR Subselüler Lokalizasyonu ve Diğer Moleküllerle İlişkisi	8
2.4.3. mTOR' un Rol Aldığı Görevler.....	8

2.5. Preklinik Embriyoloji	9
2.5.1. Ovaryum Anatomisi.....	9
2.5.2. Ovaryum Fizyolojisi	10
2.5.2.1. Ovaryal Döngünün Hormonal Düzenlenmesi.....	10
2.5.3. Ovaryumun Embriyolojik Gelişimi	11
2.5.4. Folikülogenez.....	13
2.5.5. Foliküler Gelişimi Etkileyen Faktörler	15
2.5.6. Oositin Gelişimi ve Olgunlaşması	16
2.5.7. Fertilizasyon, Bölünme ve İmplantasyon	18
2.5.7.1. Fertilizasyon.....	18
2.5.7.2. Bölünme.....	19
2.5.7.3. Blastosit Oluşumu.....	19
2.5.7.4. İmplantasyon.....	19
2.6. Klinik Embriyoloji.....	20
2.6.1. Yardımcı Üreme Teknikleri.....	20
2.6.1.1.Ovulasyon İndüksiyonu	20
2.6.1.2. İntra Uterin İnseminasyon (IUI)	20
2.6.1.3. İn Vitro Fertilizasyon (IVF).....	21
2.6.1.4. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)	21
2.6.1.5. Embriyo Transferi.....	21
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Folikül Aspirasyonu ve Oosit Seleksiyonu.....	23
3.2. Folikül Sıvısı ve Kumulus Hücresi Toplanması ve Saklanması.....	24
3.3. Oosit Toplanması ve Kültürü.....	24
3.4. Embriyo Sınıflandırması.....	24

3.4.1. Üçüncü Gün Embriyo Değerlendirmesi	24
3.4.1.1. Blastomerlerin Yapısal Özellikleri	25
3.4.1.2. Perivitellin Alan ve Zona Pellusida Özellikleri	25
3.5. Biyokimya Değerlerinin Ölçümü.....	30
3.5.1. LPO Miktarı'nın Belirlenmesi	30
3.5.2. TOS Ölçümü	30
3.5.3. TAS Ölçümü	30
3.5.4. SOD Aktivitesi'nin Belirlenmesi.....	31
3.5.5. GSH Miktarı'nın Belirlenmesi.....	31
3.6. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	32
3.7. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Biyokimyasal Sonuçlar	35
4.2. İmmünohistokimyasal Sonuçlar	38
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	61
EKLER	74
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	74
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	75

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince sahip olduğu bilgi birikimi ve görüşleriyle beni yönlendiren, her zaman desteklerini hissettiğim çok kıymetli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ'ye şükran ve minnetlerimi sunarım.

Bu süreçte bana her zaman destek olan hocalarım; Sayın Yrd. Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ, Doç. Dr. Mesut Halıcı, Doç. Dr. Jale Selli, Doç. Dr. Özgür Kaynar, Prof. Dr. Samet Kapakin'e teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince laboratuvarında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım; Kamber Kaşalı, Mustafa İleritürk, Tuğba Bal, Özlem Özgül Abuç, Rabia Kabayel, Hilal Atılay, Erdem Toktay, Tuba Karabıyık'a ilgi ve dostluklarını her zaman hissettiğim tüm değerli asistan arkadaşlarıma, katkıları ve sabırlarından ötürü Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli yönetici ve personeline, tüm hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Nurhan AKARAS

ÖZET

Tüp Bebek Merkezine Başvuran Hastaların Oosit Mikroçevresinde Meydana Gelen Histolojik ve Biyokimyasal Değişikliklerin Fertilizasyon Başarısı ile İlişkisinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmada infertilite hastalarında oosit mikroçevresini oluşturan, folikül sıvısındaki biyokimyasal ve kumulus hücrelerindeki histolojik değişimin, oosit sayısı ve gebelik üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metod: Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi İnfertilite Kliniği'ne başvuran 18-35 yaş arası infertilite tedavisi planlanan toplam 50 kadın hasta çalışmaya dahil edilerek oosit sayısına göre; 5'ten az oosit sayısı olan hastalar Grup 1, 5-20 sayıda oosite sahip olan hastalar Grup 2, 20'den fazla oosite sahip olan hastalar Grup 3 olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Oosit toplama işlemi sırasında foliküllerden, foliküler sıvı aspire edildi ve kumulus hücreleri toplandı. Elde edilen foliküler sıvı biyokimyasal (MDA, TOS, TAS, SOD, GSH) analizlerde kullanılmak üzere -80 °C 'de saklandı. Kumulus hücrelerinden yayma preparatlar hazırlanarak kaspaz 3 ve mTOR immünoreaktivitesini ışık mikroskopik düzeyde incelenmek amacıyla immünohistokimyasal boyama yapıldı.

Bulgular: Foliküler sıvıdaki MDA, TOS seviyeleri; diğer iki gruba karşılaştırdığında Grup 1 hastalarında daha yüksek bulunurken, SOD seviyesinde azalma gözlemlendi ($p<0,05$). Grup 2 hastalarında MDA, TOS seviyesi Grup 3'e kıyasla yüksek bulunurken SOD seviyesinde azalma gözlemlendi ($p<0,05$). TAS, GSH seviyelerinin oosit sayısına bağlı olarak değişmediği izlendi ($p<0,05$). Gebe hastalara ait foliküler sıvılarda tespit edilen MDA seviyesi gebe olmayanlara kıyasla yüksek bulunmasına rağmen farkın istatistiksel düzeyde anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Yapılan immünohistokimyasal boyamalarda mTOR ve kaspaz 3 immünoreaktivitesinin Grup 1'de diğer gruplara göre daha yoğun olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Sonuç olarak mTOR ekspresyonundaki artışın kaspaz 3 yolağını aktive edebileceği ve bu aktivasyonun da oksidatif strese yol açabileceği düşünüldü. Elde ettiğimiz bulgular neticesinde mTOR yolağının oosit sayısı ve gebelik oluşumu üzerine etkisi olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Folikül sıvısı, IVF, kaspaz 3, kumulus hücresi, mTOR.

ABSTRACT

Investigation of the Relationship between Fertilization Success and Histological and Biochemical Changes in Oocyte Microenvironment of Patients in the IVF Center

Aim: To investigate the effect of the chemical changes in the follicular fluid and histological changes in the cumulus cells of the oocyte microenvironment on oocyte number and pregnancy in infertile patients.

Material and Method: A total of 50 female patients who were admitted to Atatürk University Research Hospital Infertility Clinic and planned for infertility treatment between the ages of 18-35 were included in the study patients were divided into 3 groups and according to the number of oocytes; Patients with oocytes less than 5 as Group 1, patients with oocytes 5-20 as Group 2, patients with more than 20 oocytes as Group 3. During oocyte collection process, the follicular fluid was aspirated from the follicles and the cumulus cells were collected. The obtained follicular fluid was stored at -80 ° C for use in biochemical (MDA, TOS, TAS, SOD, GSH) analyzes. Immunohistochemical staining was performed to examine caspase 3 and mTOR immunoreactivity at light microscopic level.

Results: MDA, TOS levels in follicular fluid were higher in Group 1 patients when compared with the other two groups and a decrease in SOD was observed. ($p < 0,05$). In Group 2 patients, MDA, TOS level were found to be higher than Group 3, while SOD level was decreased ($p < 0,05$). TAS, GSH levels did not change depending on oocyte number ($p < 0.05$). Although the MDA level detected in the follicular fluid of pregnant patients was higher than that of non-pregnant women, the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). Immunohistochemical stainings showed that mTOR and caspase 3 immunoreactivity were more intense in Group 1 than in the other groups.

Conclusion: As a result, it was thought that the increase in mTOR expression could activate the Caspase 3 pathway and this activation could lead to oxidative stress. As a result of the findings we have found that mTOR pathway may have effects on oocyte number and pregnancy formation.

Key Words: Caspase 3, cumulus cell, follicular fluid, IVF, mTOR.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP: Adenozin trifosfat

Ca: Kalsiyum

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

CAT: Katalaz

COC: Kumulus ooforus kompleksi

DNA: Deoksiribonükleik asit

FSH: Folikül stimüle edici hormon

GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon

GPx: Glutasyon peroksidaz

GR-az: Glutasyon redüktaz

GSH: İndirgenmiş glutasyon

GSSG: Yükseltgenmiş glutasyon

GST: Glutasyon s- transferaz

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HOCL: Hipoklorik asit

HCG: İnsan koryonik gonadotropin

HSG: Histerosalpingografi

ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

IVF: İn vitro fertilizasyon

IUI: İntra uterin inseminasyon

tPA: Doku plazminojen aktivatörü

LH: Luteinizan hormon

MDA: Malondialdehid

Mg: Magnezyum

MPx: Miyeloperoksidaz

mTOR: Rapamisinin memeli hedefi

OH⁻: Hidroksil iyonu

ROS: Reaktif oksijen türleri

SOD: Süperoksit dismutaz

TAS: Total antioksidan seviyesi

TOS: Total oksidan seviyesi

USG: Ultrason



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Üçüncü gün 8A1 embriyo örneği	26
Şekil 3.2. Üçüncü gün 8A2 embriyo örneği	27
Şekil 3.3. Üçüncü gün 8a3 embriyo örneği	28
Şekil 3.4. Üçüncü gün 8A4 embriyo örneği	29
Şekil 4.2. Gebelik sonuçlarına göre folikül sıvısı biyokimyasal analiz sonuçlarını gösteren grafik.....	38
Şekil 4.3. Kaspaz 3 immünoreaktivitesi için negatif kontrol olarak hazırlanan kumulus hücre yayma preparatı	40
Şekil 4.4. Grup 1'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen kaspaz 3 immünoreaktivitesi.....	41
Şekil 4.5. Grup 2'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen kaspaz 3 immünoreaktivitesi.....	42
Şekil 4.6. Grup 3'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen kaspaz 3 immünoreaktivitesi.....	43
Şekil 4.7. mTOR immünoreaktivitesi için negatif kontrol olarak hazırlanan kumulus hücre yayma preparatı	44
Şekil 4.8. Grup 1'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen mTOR immünoreaktivitesi.....	45
Şekil 4.9. Grup 2'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen mTOR immünoreaktivitesi.....	46
Şekil 4.10. Grup 3'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen mTOR immünoreaktivitesi	47

Şekil 4.11. Gebe olan hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen	
kaspaz 3 immünoaktivitesi.....	48
Şekil 4.12. Gebe olmayan hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde	
görülen kaspaz 3 immünoaktivitesi	49
Şekil 4.13. Gebe olan hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen	
mTOR immünoaktivitesi	50



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Oosit sayısına göre hasta grupları	23
Tablo 3.2. İmmünoreaktif hücre dağılımı ve yoğunluğu	33
Tablo 4.1. Tüm gruplara ait folikül sıvısı biyokimyasal analiz sonuçları.....	36
Tablo 4.2. Gebelik sonuçları pozitif ve negatif olan hastalara ait folikül sıvısı biyokimyasal değerleri ve istatistiksel analizleri	37
Tablo 4.3. Kumulus hücrelerinde kaspaz 3 ve mTOR immünoreaktif dağılımı ve yoğunluğu	39

1. GİRİŞ

İnfertilite farklı toplumlarda çiftlerin yaklaşık %15'ni ilgilendiren, psikolojik ve sosyal sorunlara sebep olan, ciddi ve önemli sağlık sorunlarından biridir.¹ İnfertilite oranları kadınlarda %50 civarında iken, erkeklerde bu oran %40'dır. Açıklanamayan infertilite oranı ise %10-15'tir.² Son yıllarda infertilite oranının artması bu alanda birçok değişiklikleri de yanında getirmiştir. Bu değişikliklerden birisi hastaların sorunlarını gidermesi için yardımcı üreme teknikleri alanında olan gelişmelerdir.³ İnfertil çiftlerin sorunlarının giderilmesi ve teşhis konması için basit ve ucuz tekniklere başvurulması yanında, bazı noktalarda daha kompleks metodlar da kullanılmaktadır.⁴

Bütün biyolojik olaylarda olduğu gibi, folikül sıvısındaki kimyasal yapı da fizyolojik karakteri belirler. Folikül sıvısı ve kumulus hücrelerinin, folikül gelişimi ve oosit maturasyonunda önemli rolleri vardır. Folikül sıvı içeriği, kan plazması, teka, oosit ve kumulus hücrelerinden salgılanan bileşenlerle doludur.⁵ Folikül duvarındaki geçirgenlik ve kumulus hücre salgı kapasitesi folikül sıvı ortamına biyokimyasal değişkenlik kazandırır. Bu biyokimyasal değişkenlik steroid sentezi ve oosit gelişimini yakından ilgilendirir. İşte bu kimyasal içeriği, şekerler, hormonlar, proteinler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidanlar oluşturur. Son zamanlarda bu içeriklerden ROS'ların üreme ile ilişkisi hakkında yapılan çalışmalar büyük önem kazanmıştır.⁶ Erkeklerde ROS'lar ile ilgili yapılan çalışmalar kadınlardakinden daha fazla bulunmaktadır. ROS'un kadın infertilitesi üzerine olan etkisi halen tartışma konusudur. Hücrelerin normal hayatını sürdürebilmesi için antioksidan ve oksidan arasında denge olmalıdır. Bu denge bozukluğunun oosit, embriyo gelişimi, gebelik üzerine olan etkisi ve hangi mekanizma ile etkilediği hakkında yeterince bilgi yoktur.⁶

Oosit çevresindeki diğer önemli etmenlerden biri de ovulasyon aşamasında LH'nin pik yapmasıyla diğer granüloza hücrelerinden ayrılan kumulus ooforus (COC)

hücreleridir. Bu hücreler folikülogenez süresince bölünmede, oosit çekirdek ve sitoplazma maturasyonunda önemlidir.⁷ Kumulus hücreleri fiziki desteğin yanı sıra, oosite gerekli Adenozin trifosfat (ATP) için de besin sağlar.⁸ Oositin maturasyonu boyunca kumulus hücrelerin çoğalması kumulus hücre apoptozuna sebebiyet vermektedir. Bu sürecin oosit maturasyonu, embriyo oluşumu ve gebeliğe kadar birçok aşamayı etkilediğine dair tartışmalar vardır.^{9,10} Kumulus hücre otofajisi apoptotik hücre ölümünü etkileyerek foliküler atreziye neden olur. Bu otofajinin regülasyonunda rapamisinin memeli hedefinin (mTOR) rolü belirsizliğini korumaktadır.¹¹

mTOR, 290 kDA ağırlığında serin treonin kinaz enzimidir.¹² Bu enzim farklı komplekslerle birlikte translasyon ve transkripsiyon düzenlenmesi, glukoz metabolizması, aktin hücre organizasyonu, ribozom biyogenezi, otofaji, stres, immün sistem hücre etkinliğinin düzenlenmesi gibi hücre için hayati birçok görevde rol oynar. Yapılan çalışmalarda mTOR' un folikül stimüle edici hormona (FSH) duyarlı olduğu ve granüloza hücre proliferasyonunu etkilediği gösterilmiştir. Bu yolak sitoplazmik olarak ifade edildiğinde, metafaz aşamasındaki mitotik iplikçiklerde ya da sitokinez esnasında bu bölgeye yakın olan kasılma halkasında bulunduğu gösterilmiştir. Bu yerleşim bölünme esnasında mTOR' un önemini vurgular.^{13,14}

Bu çalışmadaki amacımız, İn Vitro Fertilizasyon (IVF) merkezlerine başvuran infertil kadın hastalardan alınan folikül sıvı içeriğindeki oksidan-antioksidan değişiminin, kumulus hücrelerindeki apoptoz ve mTOR yolağı ile ilişkisini araştırmak ve elde edilen bulguları oosit sayısı ve gebelik oranları ile karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

İnfertilite dünya çapında çiftlerin yaklaşık yüzde 15' ini etkileyen bir problemdir¹⁵ ve 1 yıl süresince düzenli ve korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalamama durumu olarak tanımlanır. Bunun aksine sağlıklı çiftlerin yaklaşık %85-90'ında ilk altı ay içinde gebelik gerçekleşmektedir.¹⁶ İnfertilite kendi içerisinde iki ayrı başlıkta değerlendirilir. Bu ayrım daha önce gebelik oluşmamışsa primer infertilite, en az bir gebelik oluşmuş ise sekonder infertilite olarak adlandırılır.^{17,18}

İnfertilite nedenleri Dünya Sağlık Örgütünün standart tanısal protokolleri kullanarak oluşturduğu verilere göre incelendiğinde; ovulatuvar disfonksiyon %15, tubal ve peritoneal patolojiler %30–40, erkeğe ait faktörler %30–40 oranında görülür. Uterusa ait patolojiler nadirdir ve geri kalan olgular ise çoğunlukla açıklanamayan infertilite olarak tanımlanır.¹⁹

2.1.1. Kadın Kaynaklı İnfertilite Nedenleri

Kadına bağlı infertilitenin nedenleri aşağıdaki gibi sıralanmaktadır.

- Oosit üretimindeki anormallikler
- Tubal faktör
- Servikal faktör infertilitesi
- Endometriozis
- Uterin faktörler
- İmmunolojik faktörler
- Açıklanamayan infertilite.^{16,19-30}

2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif denge hücrede düzenli olarak serbest radikallerin meydana gelmesi ve ortadan kaldırılması halidir. Bu dengenin bozulması halinde, ROS'ların oluşum ve

ortadan kaldırılması hızındaki değişim, patolojik sonuçlar doğurmakta, bunun yanında birçok hastalıkta kritik rol oynamaktadır. Bu dengenin bozulması ve hasarların oluşması süreci oksidatif stres denen durumu ortaya koymaktadır.³¹

2.2.1. Serbest Radikaller

Eşleşmemiş bir veya daha fazla elektronu bulunan moleküller ve atomlara serbest radikaller adı verilir. Elektronların eşleşmemiş hali serbest radikallerin reaktifliğini artırmaktadır. Metabolizmadaki serbest radikallerin büyük çoğunluğu oksijen ihtiva eder ve bunlar ROS olarak tanınır. Bu sınıfta bulunanlar; hidroksil radikali (OH⁻), süperoksit, peroksil radikali, hidroperoksil radikali, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve lipid peroksitleridir. Diğerleri ise; nitrik oksit, azot dioksit, merkezi radikaller, tiyol radikalleri, peroksil radikalleri, alkoksi radikalleri şeklindedir.^{30,31} ROS'lar, endojen ve ekzojen olmak üzere iki kaynaktan türer. Ekzojen kaynaktan gelenler; radyasyon, çevresel durumlar, aromatik aminler, organoklorinler, antinoplastik ajanlar, stres, bağımlılık yapan hallerdir. Endojen kaynaktan türeyenler ise; mitokondri, iskemi-reperfüzyon, endoplazmik retikulum, sitokrom p450, inflamasyon, peroksizom, prostaglandinler şeklinde sıralanır.³²⁻³⁷

2.2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROS'un zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için organizmada savunma mekanizmaları meydana gelmektedir. Bu oluşan mekanizmaya antioksidan sistemleri adı verilir. Antioksidanların etkileri toplayıcı etki (scavenging), bastırıcı etki (quencher), onarıcı etki (repair), zincir kırıcı etki (chain breaking) olarak sıralanır.²⁰

2.2.2.1. Antioksidan Çeşitleri

2.2.2.1.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen kaynaklı antioksidanlar aşağıdaki gibi sıralanmaktadır.

- Katalaz (CAT)
- Süperoksit Dismutaz (SOD)

- Glutasyon (GSH)
- Glutasyon Redüktaz (GR-az)
- Glutasyon Peroksidaz (GPx)
- Glutasyon S- Transferaz (GST)
- Myeloperoksidaz (MPx).^{20,38-40}

2.2.2.1.2. Ekzojen Antioksidanlar

Askorbik asit, tokoferol, β -karoten, soya fasulyesi, demir redoks döngüsü, sitokinler, ebselen, sodyum benzoat, rekombinant SOD, troloks c, bütillenmiş hidroksitoluen, propilgalat, nötrofil adezyon inhibitörleri ekzojen antioksidanları arasında yer almaktadır.^{20,37,40,41}

2.2.3. Kadın İnfertilitesi ve Oksidatif Stres

Granüloza hücreleri, teka hücreleri ve oosit folikül sıvısında ROS oluşumuna neden olur. Oksidatif stres ve antioksidanlar, oosit maturasyonu, folikülogenezis, fertilizasyon, ovulasyon gibi fizyolojik olaylarda rol oynarlar. Granüloza hücrelerinden oluşan ROS'un fertilizasyon başarısını düşürdüğüne dair çalışmalar vardır.³⁷ Granüloza hücrelerinde bulunan antioksidanların ise oosit maturasyonunda önemli rolü vardır. Folikül sıvısı, oosit için mikroçevre oluşturur. Mikroçevrenin karakterinin değişmesi embriyo kalitesi, fertilizasyon ve gebelik oluşumu ile alakalıdır. Fakat mikroçevrede meydana gelen değişikliklerin kadın infertilitesine hangi mekanizma ile etki ettiği açık değildir. Foliküler sıvıda granüloza hücreleri tarafından üretilen östrojen hormonu antioksidan savunma mekanizmasına katkıda bulunur. Bu hormon lipid peroksidasyonunu inhibe eden antioksidan gibi davranır.³⁸ Son yıllarda yapılan bir çalışmada, embriyo kültür ortamlarında TAS ölçümü yapılmış ve özellikle kötü kalitedeki embriyolarda TAS seviyesinin daha düşük olduğu saptanmıştır.³⁹

2.3. Apoptoz

Apoptoz programlı bir şekilde hücrenin ölüme gitmesi anlamına gelmektedir. Apoptozda fonksiyonu bozulmuş ve yaşlanmış hücreler, membran bütünlüğü bozulmadan ortadan kaldırılır.⁴² Bir hücrenin ömür süreci, bölünmesi ve fonksiyonundaki düzen, hücrenin etkileşimde bulunduğu faktörlere bağlıdır. Bu faktörler iç ve dış faktörler şeklinde ayrılır.⁴³

Apoptoz sürecinde hücre içinde morfolojik ve biyokimyasal olarak bazı değişimler meydana gelir. Bu değişimler ilk olarak çekirdekte DNA fragmentasyonu ile başlar. Bu olay geri dönüşümsüzdür. Kalsiyum (Ca) ve Magnezyum (Mg) bağımlı olarak gerçekleşen bu olay nükleusun birkaç parçaya bölünmesi ile sonuçlanır. İkincil olarak da hücrenin hacminde azalma meydana gelir. Bu azalma sitoplazmanın büzülmesi ile olur. Ribozomlar kümeleşir ve endoplazmik retikulum sarmal hali alır. Hücredeki diğer bir değişim mitokondrial bozulmadır. Öncelikle mitokondirin yapısında değişimler meydana gelir. Daha sonra elektron zincirinde yıkılma gözlenir. Ardından sitokrom c sitoplazmaya salınarak yıkıcı bazı enzimleri aktif hale getirir. Bu olay Bcl2 geni etkisi altında meydana gelir. Daha sonra hücre membranında değişimler gözlenir. Bu oluşumun sebebi membran aracılıklı bazı moleküllerin yer değişiminden kaynaklıdır. En son basamakta ise apoptotik cisimler oluşur ve bunlar hızlıca fagosite olurlar. Bundan dolayı inflamatuvar yanıt meydana getirmezler.⁴⁴⁻⁴⁶

2.3.1. Apoptozun Düzenlenmesi ve İndüklenmesi

Apoptozun indüklenmesinde iç ve dış faktörler etkindir. İç faktörler başlıca onkogenler, p53 geni ve beslenme bozukluğu şeklinde sınıflandırılabilir. Dış faktörler ise hücre içerisinde Ca miktarındaki artış, Fas/Fas ligand aktifleşmesi, ROS, ilaçlar, büyüme faktörleri (TNF, CSF, NGF), bazı antijenler şeklinde sıralanabilir. Apoptozun düzenlenmesinde p53 geni, p21 geni, Bcl2/bax ailesi ve kaspazlar görev alır.⁴¹ Herhangi

bir hasar durumunda p53 geni aktifleşir ve doğrudan DNA'ya bağlanır. Bu olayın ardından bölünmenin hazırlık evresinde hücre G1 safhasında durdurulur. Tamir için zaman kazandırır. Eğer hasar fazla ise hücre apoptoza gönderilir. Bu olaylar ayrıca p21 geninin de kontrolü altında gerçekleşir.⁴⁶ İkinci bir düzenleyici olan Bcl2/bax ailesi proapoptotik ve antiapoptotik diye ikiye ayrılır. Bcl2 mitokondrinin dış membranına yerleşik bulunur ve iyon geçişini regüle eder. Bax ise sitoplazmada yerleşiktir. Bu proteinler hasar halinde membrana gelerek porlar meydana getirirler.⁴⁷ Başka bir düzenleyici ise sistein proteazlar olarak bilinen kaspazlardır. Bunlar hücrede inaktif halde beklerler. Apoptozun son evresinde aktifleşir ve hücrenin yapılarının katlanmasında rol oynarlar.^{48,49} Apoptozun indüklenmesine gelince FAS ve tümör nekroz faktör reseptörü hücre membranında ölüm reseptörü olarak görev yaparlar. Bunlar ölüm domainlerine bağlanırlar. Domainler sitoplazma ile etkileşimdedir. Bu domainler kaspaz 8'i aktive eder ve ardından kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozu başlatırlar.^{46,47}

2.4. mTOR

2.4.1. mTOR Yapısı ve Aktivasyonu

Klinikte sirolimus olarak bilinen *Streptomyces Hygroscopicus* bakterisinin oluşturduğu bir moleküldür. mTOR; mTOR1 ve mTOR2 diye iki ayrı kompleks oluşturma yeteneğine sahiptir.⁵⁰

mTOR, 290 kDA ağırlığında serin/treonin kinaz olup, fosfodilinozitol-3-kinaz ilişkili kinaz ailesine aittir. Bu ailenin üyeleri hücre siklusu, hücre büyümesi ve DNA hasarı kontrol noktaları gibi hücrenin esas işlevlerinde rol alırlar. mTOR molekülü besin, stres, enerji değişimi ve büyüme faktörlerindeki bazı dalgalanmalara göre cevap oluşturur. Bu molekülün aktivitesi azaldığında hücre hacmi küçülür, proliferasyon azalır ve bundan dolayı mTOR inhibitörleri kanser tedavisinde kullanılırlar.⁵¹

2.4.2. mTOR Subselüler Lokalizasyonu ve Diğer Moleküllerle İlişkisi

Hücre içinde çekirdek, mitokondri, golgi aygıtı, endoplazmik retikulum ve sitoplazmada yerleşiktir. mTOR1 (mTOR, raptor ve mLST8) negatif düzenleyicileri (FKBP38, PRAS40) ve pozitif düzenleyicileri (RHEP, Rag) ile ilişki kurmaktadır. İkinci kompleks olan mTOR2 (mTOR, Rictor (MAVO3), Sin1, LST8) protor1/protor2 ile bağlantı kurar.^{50,51}

2.4.3. mTOR' un Rol Aldığı Görevler

Translasyon

Translasyon sürecinin başlangıcı ve devamını aktive eder. Kompleks 1, eIF4E bağlayıcı proteinler ile cap-bağımlı translasyonu başlatır. Fosforile olan 4E-BP1, eIF4E'yi serbest bırakır. Sonrası eIF4E, eIF4G ile ilişki kurarak translasyonu indükler. Kompleks 1, S6K'yı C ucundan fosforiller. Tamamen bir aktivasyon için S6K'nın mTOR1 tarafından fosforilasyonu ve fosfoinozitid-bağımlı kinaz tarafından aktivasyonu şarttır. Aktive olan S6K, eIF4B'nin fosforilasyonu, programlı hücre ölümü protein (PDCD4) ve cEF2 kinaz ile translasyonu başlatır.³²

Ribozom Biyogenezi

mTOR1, tRNA'ların taşınımını ve ribozomların sentezini sağlar. Rapamisin RNA polimeraz I, II, III bağımlı tRNA'ların gen transkripsiyonunu inhibe eder. mTOR ribozom sentezini translasyon seviyesinde kontrol eder. mTOR Pol I ve transkripsiyonel faktör 1A noktasını kontrol eder. Rapamisin ise TIT-1A'nın aktivasyonunu azaltır ve komplekslerin yapısını bozar.⁵²

Besin Taşınımı

mTOR çeşitli besin taşıyıcılarını kontrol eder ve bu yollar besinlerin alınımını sağlar. Memelilerde Akt IPKB- mTOR1 yolu, glukoz, aminoasit, demir, lipoprotein için

spesifik taşıyıcıların hücre yüzey ekspirasyonunu kontrol eder. mTOR hasarı hücre fizyolojisinin bozukluğuna ve fazla glukoz alımına sebep olur.^{32,52}

Otofaji

mTOR makrotofajinin inhibitörüdür. Açlık olduğunda katabolik süreç için vakuollerle dağıtılır. İnsan ve farede rapamisin makrotofajiyi indükler. mTOR1, bir otofaji inhibitörü gibi rol oynar.⁵³

mTOR ve Kadın Üreme Sistemi

mTOR sinyal iletilişinin ergenlik başlangıcı ve gonadotropin salgılanmasında önemli rolü vardır. mTOR proteinin inhibitörlerinden rapamisinin LH salınımını azalttığıyla ilgili bilgiler mevcuttur. mTOR folikül büyümesinde, mitoz bölünmede aktif rol oynar. mTOR'un aktif formu olan fosforile mTOR mitoz, G2/M fazında yüksek düzeyde bulunur. Bu durum granüloza hücre çoğalmasında önemini vurgular. mTOR ve p-mTOR'un granüloza hücrelerinin büyümesi ve proliferasyonunda rol oynadıkları bilinmekle beraber protein ekspresyonunu sağlayan tek yolak bu değildir.⁵⁰⁻⁵³

2.5. Preklinik Embriyoloji

2.5.1. Ovaryum Anatomisi

Ovaryum, uzunluğu 3 cm, genişliği 1,5-2 cm olan, 1cm kalınlıkta ve pelvisin yan tarafında *fossa ovarica* çukurunda yer alır. Ovaryumların ön tarafında, kan damarlarının ve sinirlerin girip çıktığı hilus adı verilen bölge bulunur. Kan damarlarını ovaryumlara ileten bir periton kıvrımı olan mezovaryum, ovaryumu uterusun yan tarafından uzanan broad ligamentine bağlar. Ovaryumun üst tarafı suspansör ligamentle pelvik duvara, alt tarafı ise ovarian ligament ile uterusu bağlanır. Puberteden önce ovaryumun yüzeyi düz bir yapıdadır. Üreme döneminde ise düzensiz bir hal alır. Postmenapozal dönemde, ovaryum boyutları üreme çağındakinden daha küçüktür.⁵⁴

2.5.2. Ovaryum Fizyolojisi

Folikül oluşumu intrauterin hayatta meydana gelirken, steroidogenez puberte ile başlar. Bu iki aşamada puberteyle birlikte, birbiriyle ilişki içinde devam eder. Kadın hormonal sistemi, üç ayrı hormon grubundan oluşur:

1. Gonodotropin Serbestleştirici Hormon (GnRH)
2. Hipofiz ön lobu hormonları olan FSH ve LH'dır.

Bu hormonların her ikisinde hipotalamusta sentezlenen GnRH etkisiyle salgılanırlar.

3. Ovaryum hormonları: Östrojen ve progesteron. Hipofiz ön lobundan salınan FSH ve LH'nin etkisiyle ovaryumlar tarafından salgılanırlar. 28 günde bir bu hormonların salınımları değişiklik gösterir. Her evrede farklı hızlarda hormon salgılanır.²⁰

2.5.2.1. Ovaryal Döngünün Hormonal Düzenlenmesi

Pubertede döneminde başlayan oosit oluşumu menapoz döneminde son bulur. İnsanda ovulasyon menstrüasyonun başlangıcından sonraki 13-14. günlerde gerçekleşir. Her 28 günde bir oosit atılır ve bu olaya ovaryal döngü denir. Bu döngü 3 fazdan oluşur;⁵⁵

- Foliküler faz,
- Ovulasyon fazı,
- Luteal faz.

Foliküler fazın ilk safhasında FSH ve LH etkisiyle 10-20 adet primordial folikül gelişmeye başlar. Döngünün 8-10. günlerinde başlıca etken hormon olan FSH folikül büyümesini etkiler. FSH, teka ve granüloza hücrelerine etki ederek foliküler lümene östrojen salınımını sağlar. FSH'ın yüksek seviyesi, sekonder foliküllerin granüloza hücrelerinin bölünme, farklılaşma ve canlı kalabilmelerini sağlar. Böylece bu foliküller LH'ya yanıt olarak lüteinize olma özelliği kazanırlar. İleri sekonder foliküler fazda, LH'nin etkisiyle progesteron salgılaması artmaya başlar ve folikül lümeninde östrojen toplanmaya başlar. Bununla beraber LH değeri yükselmesiyle, folikül her daim büyüme

ve gelişme için FSH'dan bağımsız hale gelir. Östrojen seviyesi ile adeno hipofizden FSH salınımı arasında ters ilişki oluşmasıyla östrojen seviyesindeki artma FSH hormonunu inhibe eder. Bu foliküler döngü sonucunda sadece bir folikül tam olarak olgun hale gelir ve atılır. Ovulasyon aşamasında LH pik yaparken FSH minimal yükselir. Ovulasyon esnasında LH steroidojenik fonksiyon için menstrüel döngünün ortasında salınır. LH reseptörleri teka interna hücrelerinde bulunur ve teka hücreleri LH artmasıyla androjen üretimini artırır. FSH reseptörü ise granüloza hücrelerinde bulunur ve bu hücreler bu hormona yanıt olarak androjen-östrojen dönüşümünü artırır. Östradiol seviyesinin dolaşımında artması, hipotalamik-hipofizer aks organlarında döngünün ortasındaki gonadotropin salınımını sağlayarak, olgun folikülün periovulatuvar evreye geçişine neden olur. Ovulasyonun döngüsü sonunda luteal faz başlar, bununla birlikte granüloza ve teka hücreleri korpus luteumu oluşturmak için değişikliğe uğrarlar. Korpus luteum östrojen ve progesteron hormonunu salgılar. Bu hormonların etkisiyle endometrium tabakası sekretuar aşamaya girer. Bu aşama embriyonun tutunması için hazırlık fazıdır. LH menstrüel evre boyunca, korpus luteumun gelişmesinden ve devamlılığından sorumludur. Fertilizasyon başarısız olduğunda, LH seviyesi düşer ve korpus luteum dejenere olur. Fertilizasyon ve implantasyon başarılı olduğu zaman ise, korpus luteum progesteron ve östrojenleri salgılamayı sürdürür. LH'nin preovulatuvar dönemdeki salınımından önce ovaryumda üretilen başlıca hormon östrojendir. Granüloza ve teka hücrelerinin luteinize olması sonucunda bu hücrelerden salgılanan başlıca hormon progesterondur.^{55,56}

2.5.3. Ovaryumun Embriyolojik Gelişimi

Gonadlar gelişimin 7. haftasına kadar ki döneme kadar erkek veya dişi olarak morfolojik özelliklere sahip değildir. Bu dönem farklanmamış dönem olarak adlandırılır. 5. haftada başlayan gonadal gelişme, mezonefrozun mezotelde kalınlaşması ile ilk oluşur. Gonadal kabarıklık sölom epitelin çoğalmasıyla ve mezeşimin artmasıyla oluşur. Bu

epitel altındaki mezenşimin artmasıyla mezenkimal blastem meydana gelir. Bunun sonucunda mezonefroz ile dorsal mezenter ortasındaki çizginin iki kenarında longitudinal birer çift kabartı meydana gelir ve buna da genital kabartılar adı verilir. Primordial hücreler gelişiminin 21. gününde, vitellüs kesesinin endodermal hücrelerinden oluşur. Bu hücreler 5. haftada bağırsağın dorsal mezenteri hizasında gonadal kabartıya doğru göç ederler. 6. haftada ise o alanı tamamen istila ederler. Primordial hücrelerin etkisiyle artan gonadal kabartı, sölom epiteli mezenşimi içine doğru bu hücrelerin kordonlarını meydana getirir ve kordonların içine doğru yerleşir. Sonuçta gonadda korteks ve medulla oluşur. Döllenmeyi izleyen 21. günün sonunda primordial hücreler vitellus kesesinin allantoise yakın duvarında endodermal hücrelerin ortasında görünür. Bu germ hücreleri 5.haftada gruplar halinde veya teker teker arka mezenterde ve somatik hücrelerle sıkı ilişki içerisinde bulunurlar.^{56,57}

Bu evreden sonra cinsiyet kordonları oluşur. Primitif kordonlar ovaryumun medulla yüzeyinde düzensiz gruplara bölünmesiyle rete ovariyi meydana getirir. 7-8. haftada meydana gelen kortikal kordonlar, altındaki mezenşim dokusunun içerisine doğru girer. Buraya yerleşen primordial germ hücrelerindeki artışa karşılık, gonadal büyüklüğü arttırmak için somatik içerikte de hiperplazi olur. 7. haftada cinsiyet farklılaşmasının oluşmasıyla korteks ilerlerlerken, medulla geriler. Bu dönemde, kortikal kordonların boylarının artmasıyla primordial hücreler içlerine girer. 16. hafta da bu hücreler zamanla oogonyumlara dönüşürken, germ hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden de folikül hücreleri oluşur. 9. haftadan sonra farklılaşma oluşmaya başlar. 12-13. haftada oositler oluşur. Bu oluşumla birlikte mayoz bölünme de başlar ve çekirdek değişimleri olur. Çekirdek etrafında organeller yoğunlaşır ve mitokondri sayısı artar, sentriyollerin etrafını golgi aparatı sarar.⁵⁶⁻⁵⁹

2.5.4. Folikülogenez

Tek katlı kübik epitel ile kaplı olan over epiteli altında bulunan bağ dokusuna tunika albuginea denir. Alt tarafta ise korteks ve medulla tabakaları oluşur. Overin korteksinde primordial foliküller bulunur ve gelişimini aynı yerde devam ettirir. Gebeliğin 6-8 haftalarında germ hücrelerindeki mitoz bölünme artar. 16-20 haftada oogoniumların sayısı 5-7 milyona çıkar. Bundan sonra ise atrezi ile sayıları düşmeye başlar. Kalan oogoniumlar ise mayoza girer ve profaz 1 diploten safhasında puberteye kadar beklerler. Bu aşamadaki foliküller, oosit ve öncül granüloza hücrelerinden oluşan primordial foliküllerdir. Bu foliküllerin sayısı puberteye girince 40 bine düşerler. Bu dönemde her siklusta 5-15 kadar folikül gelişir. Folikül hücreleri, puberte dönemi ile birlikte gonadotropinlerin etkisi sonucu, önce tek katlı ardından çok katlı kübik hücelere dönüşerek primer folikülleri meydana getirir. Daha sonraki evrede oosit ve granüloza hücreleri glikoprotein salgılayarak granüloza hücreleri ile aralarına zona pellusida denen kılıf oluştururlar. Granüloza hücreleri arasında boşluklar oluşur ve bu boşluklar birleşip tek bir boşluk olan antrumu oluşturur. Folikül adı artık sekonder ya da antral folikül adını alır. Bazal lamina granüloza hücreleri dışında yer alır. Bazal laminanın yüzeyindeki stromal hücrelerden de teka eksterna ve teka interna tabakaları gelişir. İleri seviyeki foliküller graaf folikülü adını alır ve içinde geniş antrum vardır.⁵⁸

Gelişme döneminde birçok folikül gelişir, fakat bunlardan bir tanesi dominanttır. Bu dominant folikül ovulasyon aşamasına kadar gelişir. Ovulasyondan hemen önce oosit birinci mayoz bölünmeyi tamamlar. Sonuçta zona ile oosit arasına 1. polar cisim atar. Bu evrede artık sekonder oosit oluşur. Ovulasyon gerçekleştikten sonra kalan folikül hücrelerinden geçici olarak korpus luteum oluşur. Ovulasyon aşamasına gelemeyen foliküller dejenere olur ve korpus atretikum meydana getirir. Korpus luteumdaki granüloza hücreleri LH ve FSH reseptörü kazanırlar. Daha sonra antral boşluk kanla dolar, ardından

yerini bağ doku alır. Ayrıca granüloza hücreleri granüloza lutein hücrelerine ve bu hücreler androstenedion ve östrojen salgılar. Döllenme gerçekleşmezse bu hücreler androstenedion ve östrojen salgılanması 14 gün sürer. Olduğu takdirde ise gebeliğin 9-10. haftasına kadar salgıya devam eder. Teka internada bulunan hücreler ise teka luteini meydana getirir. Gebelik oluşmadığı takdirde korpus luteum geriler ardından korpus albicans gelişir.⁵³⁻⁶³

Kumulus Hücreleri

Antrumun içerisinde, primer oosit, primer oosit etrafındaki zona pellusida ve granüloza hücrelerinden oluşan çıkıntı şeklinde bir yapı bulunur. Bu yapıya kumulus ooforus kompleksi denir. LH'nin pik yapmasıyla granüloza hücreleri ayrılmaya başlar. Oositi çevreleyen ve onu folikül duvarına sabitleyen granüloza hücrelerine kumulus ooforus adı verilir.^{58,63} Granüloza hücrelerinin en iç tabakasına ise korona radiata denir. Antral boşluğu kaplayan granüloza hücreleri ise mural granüloza hücreleri adını alır. Granüloza ve kumulus hücreleri oosit gelişimini tamamlaması için birçok göreve sahiptir. Kumulus hücreleri ve oosit arasındaki bağlantıyı *gap junctionlar* yapar. Oolemma mikrovillusları ve korona hücreleri sitoplazmaları arasında moleküller, karşılıklı geçiş yapar. Oositin büyümesi ve metabolik sürecinin ilerlemesi için granüloza hücreleri şarttır. Buna ek olarak bu hücreler oositin mayoz bölünmesini tamamlamasında da rol oynar.^{53,54}

Kumulus hücrelerinin başka bir fonksiyonu sperm kapasitasyonunu etkilemesidir. Ayrıca bu hücreler oositi, apoptoz ve oksidatif stres gibi çeşitli etkenlerden korur. Granüloza membranı dışında ise teka interna ve eksterna bulunur. Granüloza ve teka hücreleri ortasında bazal lamina yer alır.

Ovaryum içerisinde gelişen oositlerin büyüme ve olgunlaşmasında sadece kendi salgıları değil etrafındaki somatik hücrelerinde etkisi vardır. Antral folikül evresinde granüloza hücreleri hem konumları hem görevleri itibarı ile farklılaşmaya başlarlar. Bu

faklılaşma LH'ın pik yapması ile meydana gelir. LH'ın pik yapması mayozun kaldığı yerden devamını sağlar. Bölünmenin devamı ile birlikte granüloza hücrelerinde de salgısal değişimler başlar. Bu değişimler antral kaviteyi çeviren hücrelerde genelde etkindir. Ayrıca steroid hormon üretiminin yanı sıra oosit ile yakın ilişkili hücrelerdir. Kumulus hücreleri ise LH reseptörü çok az bulunduran veya bulundurmeyen ve LH pikinden etkilenmeyen hücrelerdir. Ayrıca uzantıları ile oosit ooplazması ile yakın ilişki içindedirler. Bu hücreler hem endokrin hem de parakrin salgı yaparlar.⁴⁷

Kumulus hücreleri hakkında mayotik maturasyon ve kumulus hücre genişlemesi ile ilgili çalışmalar çoktur. Kumulus hücre apoptoz artışı ile oosit gelişimine katkıları vardır. Kumulus hücreleri gap junction bağlantılar ile hem kendi aralarında hemde oositle aralarında bağlantı kurarlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kumulus hücrelerinin oosit maturasyonunda, fertilizasyon ve embriyo gelişimi hakkında öngörü oluşturacak sonuçlara varılmıştır. Ayrıca bu hücrelerin metabolik düzenlemede, sperm kapasitasyonunda, mayotik maturasyon için sinyalizasyonda önemli etkileri vardır. Oositi gelişimi için kumulus hücre çoğalması ve genişlemesi ve apoptozu gerekir. Kumulus hücre genişlemesi hyaluronik asit tarafından desteklenir.^{47,61,62}

2.5.5. Foliküler Gelişimi Etkileyen Faktörler

Folikül gelişiminde birçok faktör ve hormon rol alır (GnRH, FSH, LH, AMH, GDF9, BMP6, BMP7, BMP15, EGF, bFGF, c-Kit vs) . Bu faktörler granüloza, oosit veya teka kaynaklı olabilir. Antimüllerian hormon dominant folikül seçilmesinde katkıda bulunur, diğer folikülleri atreziye sürükler.⁶³ Primordiyal folikülden primer folikül gelişmesi gonadotropinlere bağlı değildir. İlk etkin faktörler kit ligand ve bazik fibroblast büyüme faktörleridir. Primer folikül sonucunda foliküllerin sonraki gelişiminde gonadotropinler ile büyüme faktörleri etkindir. Tüm bu faktörler denge ve uyum içinde çalışır.⁶³ Granüloza hücrelerinden salgılanan östrojen, menstrüel siklus sonunda LH

üzerindeki negatif geri bildirim etkisine zıt olarak, önce pozitif geri bildirim sonucu LH salgısını uyarır. LH ovulasyon ve progesteron salınımında rol oynar. LH artışı ile oosit maturasyonu başlar ve LH pik yapınca ovulasyon gerçekleşir. Progesteron, LH hormonları proteolitik enzimleri ve prostaglandinleri aktifleştirerek folikül duvarındaki kollajen tabakasının yıkılmasını, kumulus hücre genişlemesini, sonunda ovulasyonu meydana getirir. LH granüloza hücresindeki adenilat siklazı aktive eder ve bununla birlikte cAMP'yi artırır. Artan cAMP mitojen aktive edici protein kinazı aktive eder ve bununla birlikte mayoz bölünme ilerler. Artan cAMP granüloza hücrelerinde steroid sentez ve salınımını artırır. Zamanla oosit ve granüloza hücreleri arasında *gap junctionlarda* azalma başlar ve sonuçta cAMP'nin oosit içerisine girişi azalır. Böylece cAMP mayozu durdurur. cAMP doku plazminojen aktivatörünün (tPA) sentezlenmesini sağlar. tPA, plazminojeni plazmine dönüştürür. Folikül duvarındaki, kollajeni, laminini, fibrini, fibronektin yıkılmasını plazmin kolaylaştırır. Bu aşamada atılan oosit metafaz II aşamasında bulunur. Atılan oosit eğer döllenir ise mayoz tamamlanır. Döllenmez ise de atılan oosit dejenere olur.⁶³⁻⁶⁷

2.5.6. Oositin Gelişimi ve Olgunlaşması

Oosit, pubertenin başlangıcı ile FSH ve LH hormonlarının etkisi sonucu gelişmeye başlar. Oositin olgunlaşması ve gelişmesi etrafındaki granüloza hücrelerinin kontrolü altındadır. Ovulasyondan yaklaşık 2 gün önce oosit etrafındaki zona pellusida polispermiyi önlemek için bazı değişimler geçirir. Oosit hücresinin döllenebilmesi için matür olması şarttır (Oosit döllenmesi gerçekleşince metafaz II tamamlanır). Primer oositin başlarda oolemması düzgün iken daha matür oositte ondüleli hal alır ve yüzeyinde mikrovilluslar görülmeye başlar. Bu mikrovilluslar oositin, granüloza hücrelerinin sitoplazması ile ilişki kurmaya yardımcı olur.⁶²

Oositteki germinal vezikül belli büyüklüğe gelince mayoz 1 tamamlanır. Ardından primer oositte, endoplazmik retikulum organeli tarafından kortikal granüller oluşturulur ve golgi aygıtında şekillenir. Fertilizasyon gerçekleşikten sonra zonanın hemen altında bulunan bu granüller degranüle olur ve polisperminin engellenmesinde görev alır. Zona pellusida oosit olgunlaştıkça kalınlaşır. Zona pellusida tabakası üç tane glikoproteinden oluşur. Bunlardan zona pellusida 3, spermin akrozomal reaksiyonunu başlatır. Zona pellusida 2, kalsiyum aracılıklı kortikal granüllerin salınımını sağlar. Üçüncüsü ise zona pellusida 1 adı verilen glikoproteindir.^{63,64}

Oosit gelişimindeki diğer bir evrede oositin maturasyonudur. Maturasyon önce germinal vezikülün membranın yıkılması ile başlar. Ardında kromozomlar oolemma altına doğru mitoz mekiğini oluştururlar. Oositin bölünmesini profaz 1’de durduran faktör oosit maturasyon inhibitörüdür. Tam tersi bölünmeyi aktive eden başka bir faktör ise maturasyon başlatıcı faktör adı verilen ve germinal vezikül yıkılmasında etken olan moleküldür.⁶²⁻⁶⁷

Granüloza Hücrelerinde Apoptoz

Ovaryumdaki apoptoz hem fetal dönemde hem yetişkin dönemde meydana gelir. Granüloza hücre apoptozu protein sentezine bağımlı bir olaydır. Apoptozun en çok uyarıldığı dönem interfaz safhasındaki G1 ve S arası geçiş sürecidir. Granüloza hücrelerindeki apoptoz genelde iki yolakla meydana gelir. Bunlardan ilki p53 proteininin uyardığı mekanizmadır. Bu yolak Bcl2-Bax proteinlerinde meydana gelen değişimlerle oluşur.⁴⁵ Diğer mekanizma ise Granzim B’nin düzenlenmesi veya kaspaz (3, 6, 7) aktivasyonu ile uyarılması sonucu meydana gelir. Fakat bu mekanizmaların hangi durumlarda meydana geldiği henüz açıklanamamıştır. Granüloza hücrelerinde TNF α ’nın uyarımı sonucunda, BID’in aktivasyonu ve sitokrom c’nin serbest kalmasını sağlar. Glukokortikoidler, FGF, ve leptin gibi uyarıcılar hücreyi yıkıma karşı korumak için Bcl2

ve MDM2'yi düzenleyerek p53 tarafından uyarılan apopitoza karşı korur. Bir başka molekül de cAMP yolağıdır. Bu molekül Granzim B'yi aktive ederek perforin yardımı ile salınır ve direkt ölüm substratlarını uyarır. Gonadotropinler ise Mitogen-Aktive Edici Protein Kinaz (MAPK)'ı aktive ederek apoptotik sinyali ortadan kaldırır.^{45,47}

Granüloza Hücreleri Apopitozunda Rol Oynayan Kaspazlar

Proteaz enzim ailesinden olan kaspazlar ovaryum apopitozunda primer rol oynar. Granüloza hücre yüzey reseptörleri ve Bcl-2 ailesi üzerinden aktive olurlar. Proteaz enzimlerinden kaspaz 3 atretik kumulus hücrelerinde ve luteal hücrelerde görülür. Kaspazların aktifleşmesinde en önemli rolü gonadotropinler üstlenir. Kaspazların en önemli etkisi DNA fragmentasyonuna sebep olan enzimleri aktive etmesidir. Granüloza hücrelerinde apopitoz *Proteaz apoptosis activating factor-1 (Apaf-1)* ve sitoplazmaya salınan sitokrom c, kaspaz 9 ile indüklenir ve kaspaz 3 ile başlatır.⁴⁷

2.5.7. Fertilizasyon, Bölünme ve İmplantasyon

2.5.7.1. Fertilizasyon

Fertilizasyon erkek ve dişi gametlerin birleşmesiyle gerçekleşir. Sperm hücresi dişi genital kanalında 24 saat canlılığını sürdürebilir. Spermier genital sisteme girdiğinde döllenme yeteneğine sahip olmadığı için kapasitasyon kazanır. Dişi genital yollarında kapasitasyon 6-7 saatte gerçekleşir. Bu esnada spermierin akrozom etrafındaki glikoprotein kılıfı proteinleri ve seminal plazma proteinleri uzaklaşır. Kapasitasyon sonrası akrozom değişimleri meydana gelir. Akrozom değişimleri sırasında tripsin ve hyaluronidaz enzimi salgılanır.⁶⁸

Dişi genital kanalına bırakılan yaklaşık 200–300 milyon spermden sadece 300–500 tanesi yumurtaya ulaşabilir. Fakat bunlardan bir tanesi sadece ovumu döller. Oosit etrafındaki zona pellusida, akrozom tarafından salgılanan enzimler sayesinde delinir. Sperm zona ile etkileşime girdiğinde zonada bir takım değişmeler olur. Bu değişim,

ovum hücresinden lizozomal enzimlerin salınmasını sağlar ve zona pellusidayı değişime uğratır. Bu olaya ‘zona reaksiyonu’ denir. Bu sayede birçok spermden sadece bir tanesi penetre olur. Penetre olan sperm baş ve kuyrukla içeri girer. Ardından mayoz 2 tamamlanır. Girişle birlikte oosit sitoplazmasında kortikal değişimler olur ve mayoz 2 tamamlandıktan sonra bir oosit ve bir tane polar cisimcik atılır. Döllenme sonucu erkek ve dişi pronükleusları oluşur ve daha sonra kaynaşır, nükleuslarda DNA iki katına çıkar ve 46 kromozomlu hücre oluşur.^{65,68}

2.5.7.2. Bölünme

Döllenme sonrası oluşan zigot mitoz geçirir ve hücrenin hacmi bölünme devam ettikçe küçülür. Bu hücrelere blastomer adı verilir. Birkaç bölünme sonrası blastomer sayısı artar, 8 hücreli evrede iken kompaksiyon gerçekleşir ve zigot 16 hücreli evreye ulaşır ve buna morula denir. Bu evrede merkezi yerleşimli hücrelere iç hücre kitlesi denirken, dışardakine de dış hücre kitlesi denir. Bu hücre kitleleri daha sonra embriyo dokuları oluşturacaktır.⁶⁸

2.5.7.3. Blastosit Oluşumu

Embriyo uterusu girdiğinde içeriye sıvı girmeye başlar ve hücreler arasında boşluk oluşur bu boşluğa blastosöl adı verilir. İç hücre kitlesine de embriyoblast denir. Daha sonra zona ortadan kalkar ve embriyo uterusu tutunmaya başlar.⁶⁸

2.5.7.4. İmplantasyon

Embriyo döllendikten sonraki 6. günde trofoblast hücreleri endometriuma tutunur ve oradaki hücrelere penetre olur. Penetrasyon trofoblast hücreleri tarafından salgılanan proteolitik enzimler sayesinde sağlanır. Böylece 7. günde mukoza tabakasına gömülmeye başlar.^{68,69}

2.6. Klinik Embriyoloji

2.6.1. Yardımcı Üreme Teknikleri

2.6.1.1.Ovulasyon İndüksiyonu

Her menstrüal siklusta bir tek dominant folikül gelişir. İndüksiyon da ise birden fazla folikül geliştirilerek gebelik şansı artırılır. İndüksiyon için birçok protokol vardır. Fakat genel itibarıyla kullanılan ilaçlar hemen hemen aynıdır. Burada kullanılan ilaçlar '*human menopausal gonodotropin, klomifen sitrat, rekombinant follicle stimulating hormone*' ve analoglarıdır. Burada LH piki ile erken ovulasyonu önlemek için GnRH kullanılır. GnRH ve analogları gonodotropin salgısını artırır ve sürekli uygulanması sonucu FSH ve LH azalır. Fakat son dönemlerde GnRH antagonistlerinin kullanılmasının LH yükselmesini önlediği ve bu sayede daha etkili olduğu görülmüştür. Yumurta gelişimi her gün çapı ölçülerek değerlendirilir ve serum östrodioline bakılarak takip edilir. Yumurtalar yeterli sayı ve büyüklüğe geldiğinde ve ayrıca endometriyum uygun kalınlığa geldiğinde *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) enjeksiyonu uygulanır.³⁷

2.6.1.2. İntra Uterin İnseminasyon (IUI)

Yardımcı üreme tekniklerinden bir tanesinde inseminasyondur. IUI yapılması için kadının tüpleri açık olmalıdır ve erkek sperm sayısı da yeterli sayı ve kalitede olmalıdır. Bu yöntemde, sperm seçebilirlik ve spermi uterusu bırakmak avantajlı bir durumdur. Bu işlem öncesi kadın hastadan oosit oluşması için bir takım hormon tedavisi alır. Ve folikül yeteri büyüklüğe gelince HCG uygulanır. Erkeğin verdiği ejakülat laboratuvar ortamında yıkanarak, sayı ve hareketliliği tespit edildikten sonra servikse verilir. Rahime bırakılan spermeler tuba uterinalardan geçerek atılan yumurta ile fallop tüpünde birleşir. Eğer fertilizasyon olursa embriyo gelip uterusu tutunur.⁷⁰

2.6.1.3. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

IVF yöntemi, 1978 yılında İngiltere’de ilk uygulanmış ve oluşan ilk bebek birçok infertil çiftte umut olmuştur. Fizyolojik olarak gelişen tek oosite rağmen, IVF sayesinde daha fazla sayıda oosit oluşturulur. IVF tekniğinde yumurtalar toplanır enzim ile etrafındaki COC’dan kurtarılır. Ardından erkekten alınarak yıkanan sperm yumurtalar ile aynı ortama konur. Amaç spermilerin yumurta hücresine penetre olmasıdır. Bu teknikte sperm sayı ve kalitesi, yumurta sayısı, hasta yaşı, infertilite nedenleri, kaçınıcı denemesi olduğu araştırılır.³⁹

2.6.1.4. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

Sperm hücresini oosit hücresi içerisine enjekte edilmesi işlemine ICSI denir. Kadın hastalara bu teknikten önce yumurta geliştirmek için ilaç ve hormon tedavisi uygulanır. Bundan sonra yumurta toplama işlemi yapılır ve kültür ortamında saklanır. Takiben yumurtalar kumulus hücrelerinden enzim sayesinde soyularak kurtarılır.³⁹

Aynı zamanda normal ejakülasyon veya Testiküler Sperm Ekstraksiyonu, Perkütan Epididimal *Sperm* Aspirasyonu ve Mikro-Epididimal *Sperm* Aspirasyonu gibi cerrahi yollarla elde edilen spermier laboratuvar ortamında, belli işlemlerden geçerek hazır hale getirilir. Daha sonra mikromanipülatör adlı cihaz yardımıyla seçilen spermier metafaz II fazındaki yumurtalara enjekte edilir. Enjekte edildikten sonrada inkübatör içerisinde saklanır. Bu yöntem klasik IVF yöntemine göre fertilizasyon yönünden daha başarılıdır. Çünkü sperm direkt yumurta içine verilir. Bu işlemiden yaklaşık 16-18 saat sonra yumurtada iki tane pronükleus gözlenmesi döllendiğini gösterir. Bu pronükleusların biri anneden biri babadan gelir.^{39,68}

2.6.1.5. Embriyo Transferi

Klasik IVF ve ICSI sonrasındaki aşama embriyo transferidir. Embriyolardan iyi olan bir veya iki tanesi anne rahmine transfer edilir. Transfer günü embriyoların kalitesi,

sayısı, deneme sayısına, annenin yaşı ve endometriyum kalınlığına göre kaç embriyo transfer edileceğine karar verilir. Bu işlem USG altında, idrara sıkışık olarak ağrısız anestezi gerektirmeyen basit bir süreçtir. USG altında yapılan transferde kateter izlenerek nereye bırakılacağı gözlenir. Aynı zamanda embriyoloji laboratuvarında verilecek embriyo seçilir ve enjektöre bağlı katetere çekilerek hazırlanır. Embriyolog tarafından götürülen kateter klinisyene verilir ve hastanın serviksinden geçilerek uterus boşluğuna embriyo bırakılır. Transfer sonrası hasta iki saat kadar dinlenir ve gebelik tahlili için 12 gün beklenir.⁷¹

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmamıza Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezine 2014 yılı Ocak-Aralık aylarında müracat eden ve IVF/ICSI tedavi programına alınan, 18-35 yaş arası 50 kadın hasta dahil edildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan gerekli izin alındı (15.08.2017\7). Hastalara çalışma hakkında bilgi verilerek aydınlatıldı, onam formu okutuldu ve onayları alındı. Hastaların etiyolojisine bakılarak kadın kaynaklı infertilite hastalar çalışmaya dahil edildi. Ayrıca hastalar Tablo 3.1’de görüldüğü gibi oosit sayılarına göre 5’ten az oosite sahip olan hastalar Grup 1 (n=12), 5-20 sayıda oosite sahip olan hastalar Grup 2 (n=24), 20’den fazla oositi olan hastalar ise Grup 3 (n=14), olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Hastalar ile tedavi öncesi görüşme yapılarak anamnezleri alındı. Tedavi öncesinde mensturasyonun 3. günü, bazal değerlendirme için HSG, kan sayımı, USG, serolojik testler, servikovajinal smear, kan grubu, servikal kültür, gibi tetkikler yapıldı.

Tablo 3.1. Oosit sayısına göre hasta grupları

Oosit sayısına göre gruplandırma		
Grup 1 (n=12)	Grup 2 (n=24)	Grup 3 (n=14)
Oosit sayısı <5	Oosit sayısı 5-20 arasında	Oosit sayısı >20

3.1. Folikül Aspirasyonu ve Oosit Seleksiyonu

Folikül aspirasyon işlemi jinekolog tarafından 10 ml’lik plastik enjektörler ucuna 18 G’lik iğneler ile gerçekleştirildi. Folikül sıvıları santrifüj tüplerine alındı. Daha sonra bu tüplerdeki sıvılar petri kabına konularak oositler stereo mikroskop altında seçilerek alındı. Oositlerin seçme işlemi Brackett ve Zuelke’nin belirttiği şekilde gerçekleştirildi.⁷²

3.2. Folikül Sıvısı ve Kumulus Hücresi Toplanması ve Saklanması

Her işlem sonrası aspire edilen folikül sıvısından oositler ayrıldı. Elde kalan folikül sıvıları üzerine hasta isimleri yazıldı ve numuneler 4000 g'de 10 dakika santrüfj edildi, ardından süpernatantlar alınarak eppendorf tüplerine (Isolab, Almanya) döküldü ve örnekler -80°C'de saklandı. Daha sonra hasta oositleri, mekanik parçalama sonucu kumulus hücrelerinden ayrıldı. Toplanan kumulus hücreleri MOPS (Vitrolife, Kolorado, ABD) tamponlu medyumda -80°C'de depolandı.³⁷

3.3. Oosit Toplanması ve Kültürü

Folikül sıvılarından ayrılan oositlerin üzerine *hyase* (Vitrolife, Kolorado, ABD) enzimi eklendi ve etrafındaki kumulus hücrelerinden 135-175 mm'lik pipet yardımı ile ayrıştırıldı. Ardından mikroenjeksiyon işlemine kadar %5-6 CO₂ ve 37°C'de fertilizasyon medyumunda metafaz II aşamasına gelene kadar bekletildi. Daha sonra oositler döllenmek üzere mikroenjeksiyon işlemine tabi tutuldu.³⁷

3.4. Embriyo Sınıflandırması

Oositlere mikroenjeksiyon işlemi yapıldıktan yaklaşık 16-18 saat sonrası döllenme olup olmadığına bakıldı. Döllenmenin gerçekleştiği embriyolar erken ve geç dönem *cleavage version 5* (Vitrolife, Kolorado, ABD) medyumlarında %5-6 CO₂ ve 37°C'de inkübatörde bekletildi. Bundan sonrada embriyolar ikinci ve üçüncü günlerde ışık mikroskobu altında incelenerek bölünmesine ve fragmente derecesine göre kaliteleri sınıflandırıldı.³⁷

3.4.1. Üçüncü Gün Embriyo Değerlendirmesi

3. gün embriyo değerlendirme sebebi embriyo durumuna göre tutunma ihtimali yüksek olanı belirlemektir. Bu günlerde yapılan değerlendirmede göz önüne alınan parametreler; bölünen blastomerlerin eşit olması ve sitoplazmadaki fragmentasyon derecesine göre puanlama yapılır. Üçüncü günde embriyoların en az yedi hücreli ve

boyutlarının eşit olması istenilen bir durumdur. Bu günlerde yapılan değerlendirmede fragmantasyon derecesi çok önemlidir. Fragman, embriyo içerisinde bulunan fakat hücre olmayan yapılardır. Skorlamada fragmantasyon oranı embriyo hacmine göre yüzde olarak verilir ve puanlamaya katılır. Puanlama yapılırken aşağıda verilen parametrelere bakılır ve embriyolar değerlendirilir.⁷³

3.4.1.1. Blastomerlerin Yapısal Özellikleri

Blastomerlerde birden fazla çekirdek görülmesi (multinukleasyon) hali istenmeyen bir durumdur. Böyle embriyolar transfer için uygun değildir. Multinukleasyon görülen embriyolar işleme tabi tutulmadı.

3.4.1.2. Perivitellin Alan ve Zona Pellusida Özellikleri

Embriyo seçiminde perivitellin aralığın genişliği ve bu alanda bulunan birikintilere bakıldı, ayrıca zona pellusida kalınlığı değerlendirildi. Değerlendirme Baczkowski'nin puanlaması baz alınarak gerçekleştirildi.⁷³ Bu puanlama sisteminde embriyolar aşağıdaki kriterlere göre invert mikroskop (Zeiss, Jena, Almanya) altında değerlendirildi:

- İlk işaret embriyodaki blastomer sayısını gösterir.
- İkinci işaret olan harf (A,a) blastomer büyüklüğünü ifade eder.
- Üçüncü işaret ise fragmantasyon miktarı ile ilgilidir.

Fragmantasyon değerlendirilmesi ise aşağıdaki gibi yapıldı:

- Fragmantasyon yok; 1
- % 20'den az fragmantasyon; 2
- % 20-50 fragmantasyon; 3
- % 50'nin üzerinde fragmantasyon; 4

Değerlendirilen embriyoların fotoğrafları çekildi. (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4) Embriyolar yukarıdaki kriterlere göre değerlendirildiğinde, 3. günde en iyi kalitede

embriyoyu 8A1 gösterir. Değerlendirme bittikten sonra en iyi embriyonun transferi kateter (Kitazato, Japonya) kullanılarak USG eşliğinde jinekolog tarafından gerçekleştirildi. Transferden 11-12 gün sonra hastaların kanında β -hCG değeri ölçülerek, sonuç pozitif ise fetal kalp atımlarına bakıldı.⁷³



Şekil 3.1. Üçüncü gün 8A1 embriyo örneği



Şekil 3.2. Üçüncü gün 8A2 embriyo örneği



Şekil 3.3. Üçüncü gün 8a3 embriyo örneği



Şekil 3.4. Üçüncü gün 8A4 embriyo örneği

3.5. Biyokimya Değerlerinin Ölçümü

Folikül sıvısı oksidatif stres belirteçleri ölçümü, Atatürk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Ependorf tüplerinde -80 derecede saklanan folikül sıvıları MDA, Total Oksidan Seviyesi (TOS), oksidanları ile SOD, GSH, Total Antioksidan Seviyesi (TAS) düzeyleri, literatüre uygun metodlar kullanılmak suretiyle ölçüldü. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

3.5.1. LPO Miktarı'nın Belirlenmesi

Öncelikle deney tüplerine 1000 µl homojenat kondu. Ardından 150 µl saf su, 100 µl % 8 sodyum dodesil sülfat, 750 µl % 0.08 TBA, 750 µl % 20 asetik asit kondu ve ardından vortekslendi. Homejanat 100 °C'de 60 dakika süreyle inkübasyon için bırakılmanın ardından karışıma 2,5 ml n-bütanol eklendi ve spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Reaksiyon sonucunda oluşan kırmızı renk miktarları 535 nm'de 3 ml'lik küvetlerden yararlanılarak okundu ve seyreltme katsayıları baz alınarak daha önce hazırlanan MDA stok karışımı kullanılarak meydana getirilen standart grafikten faydalanılarak örneklerin MDA miktar ölçümü yapıldı. Örneklerin LPO miktarları, µL olarak tarif edildi. Her bir numunenin ölçümü 3 kez tekrarlanarak verildi.⁷⁴⁻⁷⁶

3.5.2. TOS Ölçümü

TOS seviyesi ölçümü *xlenol orang* ile birlikte Ferrik Tiyosiyanat metodu kullanılarak spektrofotometre ölçümüne dayanır. Demir iyonları oksidatif ajanlardan yararlanarak asidik ortamda ferrik iyonlarına okside olur. Bu iyonlar peroksit içeriği sayesinde dolaylı ölçüm sağlayan *xlenol orange* ile tespit edildi.⁷⁵⁻⁷⁷

3.5.3. TAS Ölçümü

Folikül sıvısındaki TAS, Total Antioxidant Status Assay spektrofotometre ile ölçüme dayanır. Tüplere 3 ml standart/ serum/ folikül sıvı örnekleri kondu. 500 ml tampon çözelti eklendi. (Reagent 1) İlk ölçüm 660 nm'de yapıldıktan sonra üzerine 75 ml

ABST radikal solüsyon (Reagent 2) eklenerek boyandı. 10 dakika kadar inkübe edildikten sonra 2. ölçüm yine 660 nm abzorbansta ölçüldü.³⁸

3.5.4. SOD Aktivitesi'nin Belirlenmesi

Öncelikle folikül sıvıları santrifüj edildi. Spektrofotometre küveti içine, 0,4 M Sodyum Karbonat (Na_2CO_3), 0,3 mM Xanthine, 150 μM NBT, 0,6 mM EDTA, 1,2 g / L BSA karışımında 2450 μl konuldu. Üzerine 500 μl folikül sıvısı ve 50 μl ksantin oksidaz numunesi ilave edildi ve ardından yaklaşık 20 dakika kadar etüve bırakıldı. Ardından 1000 μl CuCl_2 inhibitör çözeltisi eklenerek reaksiyon bitirildi. Reaksiyon ortamında oluşan formazon miktarları 440–460 nm'de 3 ml'lik kuartz küvetler kullanılarak okundu. SOD aktivitesi, mmol/dakika/mg sıvı olarak tarif edildi. Her bir numunenin ölçümü 3 kez yapılarak belirlendi.⁷⁴⁻⁷⁶

3.5.5. GSH Miktarı'nın Belirlenmesi

Örnekler, 3000 g'de 10 dakika santrifüje edildi ve ardından süpernatantlarda GSH seviyesi ölçüldü. Deney tüplerine öncelikle 1500 μl ölçüm solüsyonu (0,2 mM EDTA, 200 mM Tris-HCl, pH=8), ardından 500 μl süpernatant, 100 μl 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ve 7900 μl metanol eklendi ve örnek pipetlenerek vortekslendi. 37°C sıcaklıkta 30 dakika süreyle inkübasyon için bekletildi ve sonra spektrofotometre ile ölçümler yapıldı. Reaksiyon sonrası meydana gelen sarı renk miktarları 412 nm'de 3 ml'lik kuartz küvetler aracılığı ile okundu ve seyreltme katsayıları baz alınarak daha önce yapılan GSH stok karışımı kullanılarak meydana getirilen standart grafikten yararlanılarak örneklerin GSH miktarı ölçüldü. Numunelerin GSH miktarları, $\mu\text{mol/L}$ olarak tarif edildi. Her bir numunenin ölçümü 3 tekrar yapılarak elde edildi.⁷⁵⁻⁷⁷

3.6. İmmünohistokimyasal Yöntem

Kumulus hücrelerinde kaspaz 3 ve mTOR proteinlerini ışık mikroskopik düzeyde incelemek amacıyla yayma preparatlar indirekt immünohistokimya yöntemi ile boyandı.⁷⁸

Bu amaçla;

1. Önce kumulus hücreleri pozitif şarjlı lam (Thermo Scientific, Almanya) üzerine yayılarak yayma preparat hazırlandı.
2. Hazırlanan preparatlar – 20° de aseton ve absolu alkol karışımında 30 dakika bekletilerek tespit edildi.
3. Örnekler *Phosphate Buffered Saline* (PBS) ile 3 kez beşer dakika yıkandı.
4. Ardından Triton X ile 10 dakika muamele edildi.
5. PBS ile 3x5 dakika yıkandı
6. Yaymaların üzerine % 3'lük H₂O₂ (Abcam, ab102500) damlatıldı ve 20 dakika bekletildi.
7. Lamalar PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
8. Daha sonra yaymalar üzerine sırasıyla primer antikor [anti-kaspaz 3 (Amcam, ab2302), anti-mTOR (Amcam, ab2732)] damlatıldı ve üstü kapalı olacak şekilde 1 saat bekletildi. Primer antikorlar sırasıyla 1/100 ve 1/100 oranında dilüe edildi.
9. Lamalar PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
10. Takiben preparatlara biotinli sekonder antikor (Abcam, ab1227) damlatılarak yine üstü kapalı bir şekilde oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
11. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
12. Ardından DAB solüsyonu (Abcam, ab64238) damlatılarak yaklaşık 5 dakika bekletildi.

13. Kahverengi renk oluşunca lamalar akan su altında yıkandı ve DAB akıtıldı.

14. Haris hematoksilende 45 saniye tutularak zıt boyama yapıldı.

15. Ardından distile suda 5 dakika yıkandı.

16. Alkol ve ksilol serilerinden geçirildi.

17. Son olarak entellan yardımı ile lamaların üstü lamel ile kapatıldı.

Negatif kontrol olarak kullanılacak preparatlara primer antikor damlatılmadı, primer antikor içermeyen *antibody diluent* damlatıldı ve daha sonra diğer slaytlarla aynı şekilde boyandı. Boyanmış slaytlar ışık mikroskobu (Leica DM6200-Almanya) altında incelenerek Olympus DP20 fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekildi.⁷⁸

Hücre immünoreaktivitesi açısından her gruptan rastgele seçilmiş üç slayttan çekilen fotoğraflarda, birbiri ile çakışmayan 3 alan değerlendirildi. Semi-kantitatif olarak yapılan değerlendirmede immünreaktivite, pozitif hücre dağılımı ve pozitif hücrelerin yoğunluğunu gösteren skor Tablo 3.2’de verildi. İmmünoreaktif hücrelere ait dağılım ve yoğunluk skorları birbiri ile toplandı ve toplam skor elde edildi. Minimum skor 0 maksimum skor ise 8 puandı. Sonuçlar aşağıdaki gibi değerlendirildi:

- 0-2 puan; boyanma negatif,
- 3-8 puan; boyanma pozitif .

Tablo 3.2. İmmünoreaktif hücre dağılımı ve yoğunluğu

Pozitif boyanan hücrelerin dağılımı (oranı)	Puan	Pozitif boyanan hücrelerin yoğunluğu	Puan
Pozitif hücre yok	0	Boyanma yok	0
< 1/100	1	Zayıf boyanma	+1
1/100-1/10 arasında	2	Orta derecede boyanma	+2
1/10- 1/3 arasında	3	Güçlü boyanma	+3
1/3- 2/3 arasında	4		

3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma sahip olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Folikül sıvısındaki oksidatif stres parametreleri ile yumurta sayısı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde normal dağılım gösteren veriler Anova testi ile normal dağılım göstermeyenler ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Oksidatif stres ve gebelik arasındaki ilişkinin saptanmasında normal dağılan verilerde bağımsız t testi ile dağılmayanlar ise Mann-Whitney-U testi ile analiz edildi. Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS 20.0 programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama (ort), standart sapma (ss), medyan (ortanca), minimum (min) ve maksimum (mak) olarak ifade edildi. Tüm incelemelerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya, Atatürk Üniversitesi, Araştırma Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi' ne infertilite şikayeti ile başvuran 18-35 yaşları arası 50 kadın hasta dahil edildi. İstatistiksel değerlendirme yumurta verimliliğine ve gebeliğe göre yapıldı.

4.1. Biyokimyasal Sonuçlar

Folikül sıvısında bakılan biyokimyasal belirteçlerden biri olan MDA ve TOS'a ait sonuçlar Tablo 4.1 ve Şekil 4.1' de verilmiştir. Şekil ve tablo 4.1'de görüldüğü gibi MDA ve TOS değerlerinin, Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 gruplarında farklı seviyelerde olduğu gözlemlendi. Grup 1 hasta sonuçları diğer iki gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek idi ($p<0,05$). Grup 3 hasta grubu ile karşılaştırıldığında Grup 2 hastalarda da MDA ve TOS seviyesi istatistiksel olarak artmış bulundu ($p<0,05$).

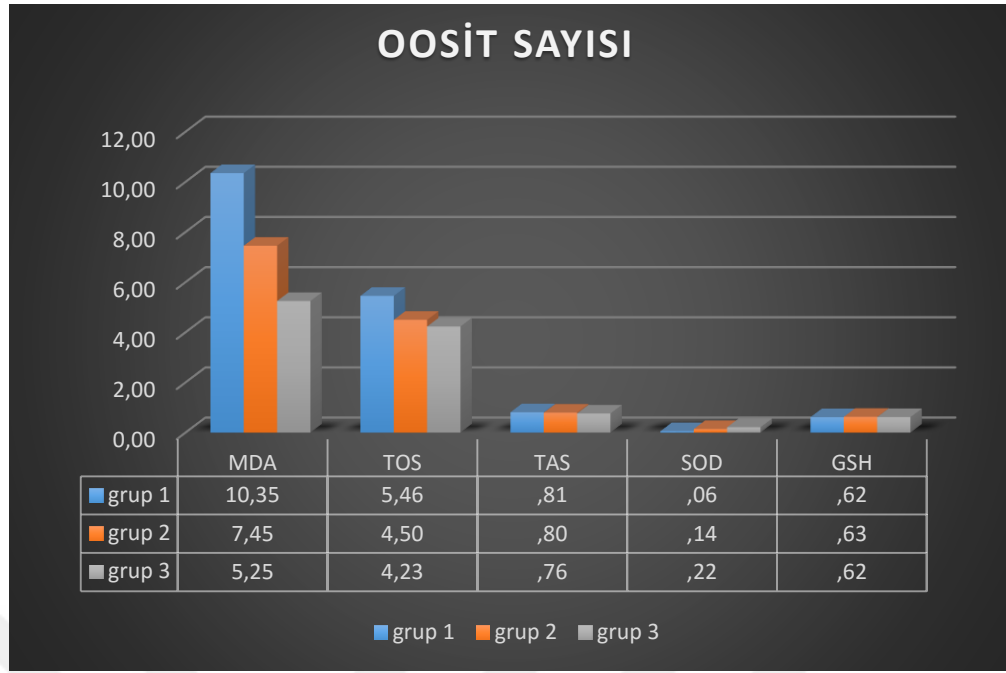
TAS seviyesi karşılaştırıldığında Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 grupları arasındaki fark anlamlı değildi ($p>0,05$). Antioksidan parametrelerimizden SOD enzimi seviyesi gruplar arasında farklılıklar göstermekteydi ($p<0,05$) (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1). Grup 1 grubunda SOD aktivitesi diğer iki gruba kıyasla oldukça düşük seviyede iken Grup 2 grubunda ise Grup 3'e göre anlamlı bir düşüş görüldü ($p<0,05$). Diğer belirteçlerimizden olan GSH seviyesi açısından Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 grupları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Gebelik yönünden yapılan istatistiksel sonuçlara bakıldığında ise gebe olanlar ve olmayanlar arasında MDA, TOS, TAS, SOD, GSH (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2) yönünden anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). MDA seviyesindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı olmadığı halde gebe olanlarda grafikte görüldüğü üzere minimal artış görüldü.

Tablo 4.1. Tüm gruplara ait folikül sıvısı biyokimyasal analiz sonuçları

	grup 1		grup 2		grup 3				
	ort±ss	Medyan (min-mak)	ort ± ss	Medyan (min-mak)	ort±ss	Medyan (min-mak)	F	p	post- hoc
MDA	10,35±1,97	9,63 (7,83-13,67)	7,45 ± 1,56	7 (5,53-11,6)	5,24 ± 1,32	5,295 (3,33-6,83)	23,891	,000	1-2, 1-3, 2-3
TOS	5,455±0,25	5,36 (5,13-5,83)	4,49 ± 0,72	4,4 (3,1-5,64)	4,23 ± 1,03	4,04 (3,1-5,64)	7,184	,002	1-2, 1-3
TAS	0,811±0,23	0,86 (0,24-1,02)	0,79 ± 0,22	0,86 (0,24-1,09)	0,76 ± 0,24	0,86 (0,24-0,96)	,104	,901	
SOD	0,056±0,02	0,05 (0,02-0,1)	0,14 ± 0,06	0,15 (0,04-0,26)	0,21 ± 0,04	0,22 (0,15-0,27)	19,867	,000	1-2, 1-3, 2-3
GSH	0,616±0,05	0,6 (0,53-0,68)	0,62 ± 0,05	0,63 (0,55-0,74)	0,61 ± 0,04	0,62 (0,56-0,69)	,225	,799	

Grup1: oosit sayısı <5, Grup 2: oosit sayısı 5-20 arasında, Grup 3: oosit sayısı 20>
ort: Ortalama, ss: Standart Sapma



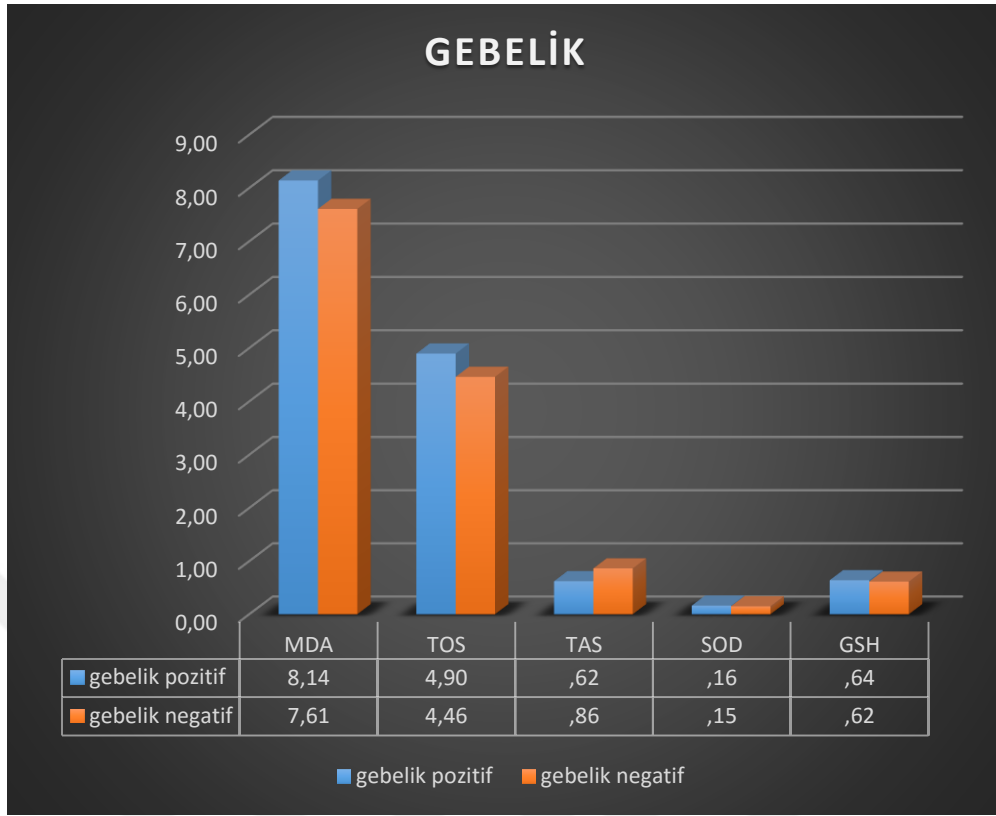
Şekil 4.1. Tüm gruplara ait folikül sıvısı biyokimyasal analiz sonuçlarını gösteren grafik.

Grup 1: oosit sayısı <5, Grup 2: oosit sayısı 5-20 arasında, Grup 3: oosit sayısı 20>

Tablo 4.2. Gebelik sonuçları pozitif ve negatif olan hastalara ait folikül sıvısı biyokimyasal değerleri ve istatistiksel analizleri

	Gebelik					
	Pozitif			Negatif		
	ort±ss	Medyan (min-mak)		ort±ss	Medyan (min-mak)	
MDA	8,14±1,7	7,83 (5,53-10,9)		7,61±1,55	7,17 (5,6-11,6)	,779 ,442
TOS	4,89±0,65	5,06 (3,91-5,83)		4,46±0,7	4,34 (3,1-5,64)	1,460 ,155
TAS	0,62±0,33	0,83 (0,24-0,96)		0,86±0,13	0,87 (0,37-1,09)	1,325 ^z ,185
SOD	0,16±0,06	0,15 (0,1-0,25)		0,15±0,06	0,16 (0,04-0,28)	,446 ,659
GSH	0,64±0,05	0,64 (0,56-0,74)		0,61±0,05	0,62 (0,52-0,71)	1,077 ,291

t: bağımsız t Test, z; Man Whitney U Test, ort: ortalama, ss: standart sapma



Şekil 4.2. Gebelik sonuçlarına göre folikül sıvısı biyokimyasal analiz sonuçlarını gösteren grafik

4.2. İmmünohistokimyasal Sonuçlar

Apoptozun son basamaklarından biri olan kaspaz 3'ün, kumulus hücrelerinde immünohistokimyasal boyama sonucu test edildi. Negatif boyanan kontrol grubu şekil 4.3'te verildi. Aktif kaspaz 3 reaktivitesi gözlenen hücreler, DAB kromojeni ile kahverengi boyandı. Bu uygulama sonucunda Grup 1 hastalarında diğer gruplara göre daha çok sayıda immün hücre reaktivitesi gözlemlendi (Tablo 4.3, Şekil 4.4). Grup 2 ve Grup 3 arasında çok az farklılık görüldü. (Tablo 4.3, Şekil 4.5, Şekil 4.6)

Aynı şekilde mTOR negatif boyanan kontrol grubu şekil 4.7'de verildi. mTOR immünoreaktivitesinde de gruplar arasında farklılıklar mevcuttu. Grup 1 hastalarında

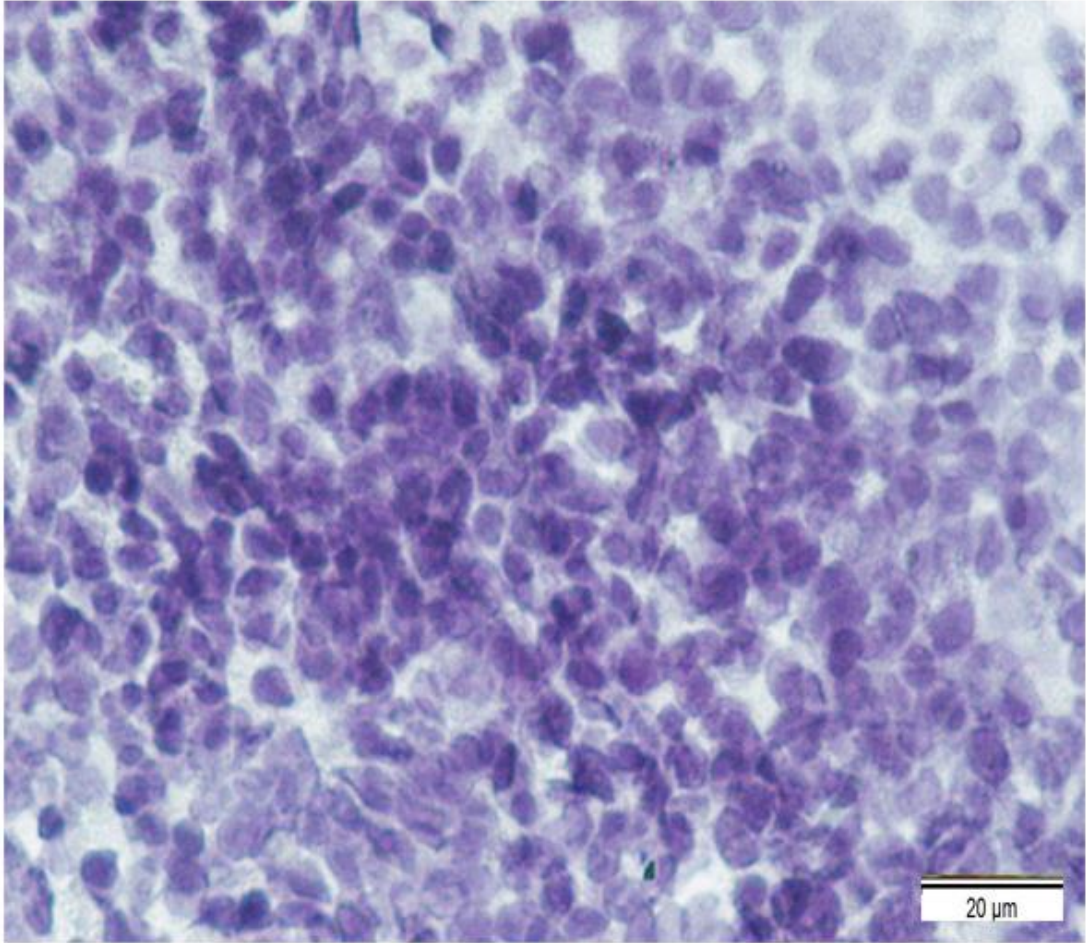
immün pozitiflik daha yoğun gözlemlendi. (Tablo 4.3, Şekil 4.8). Grup 2 ve Grup 3 arasında çok az farklılık görüldü (Tablo 4.3, Şekil 4.9, Şekil 4.10).

Gebe olan ve olmayan hastalar karşılaştırıldığında ise kaspaz 3 ve mTOR immünpozitifliği arasında skor açısından sayısal bir fark gözlenmedi (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14).

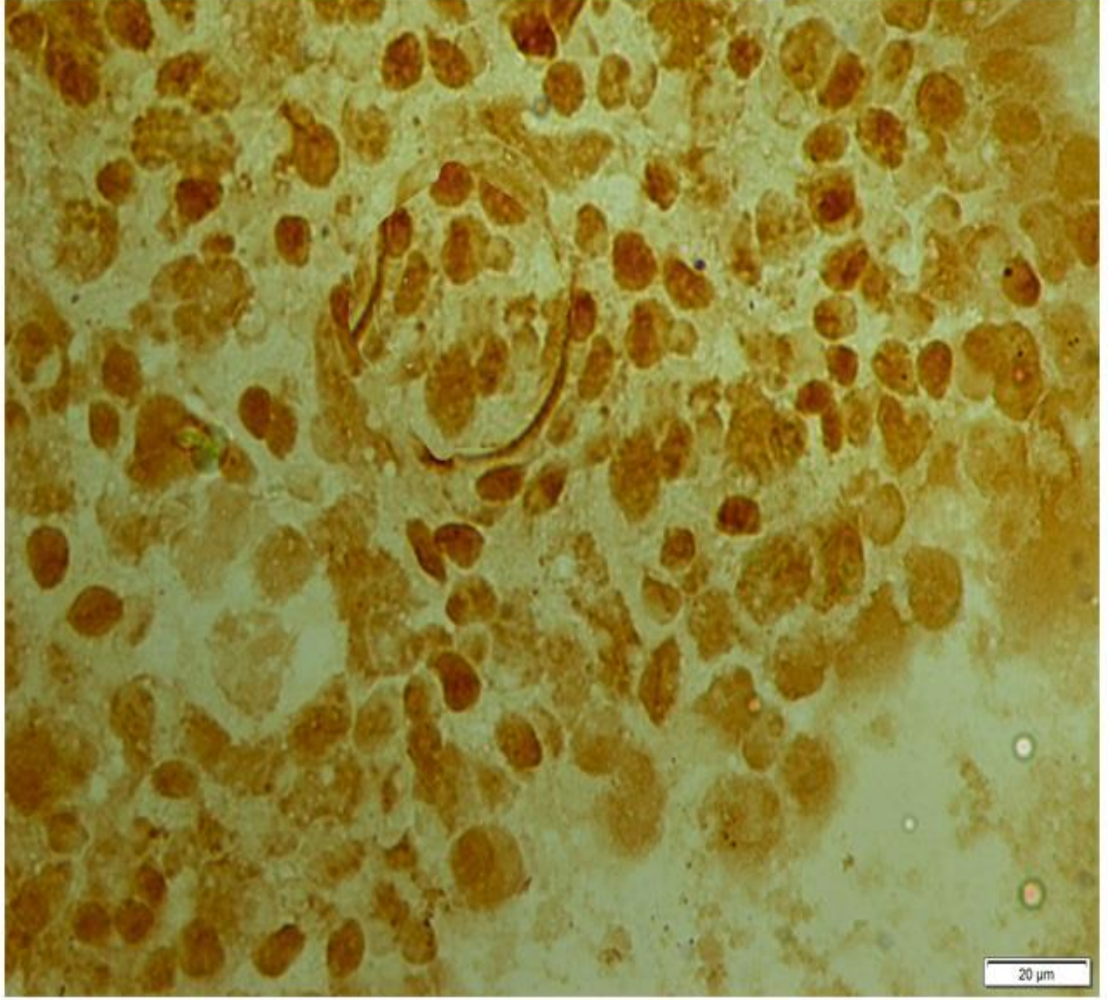
Tablo 4.3. Kumulus hücrelerinde kaspaz 3 ve mTOR immünoreaktif dağılımı ve yoğunluğu

Antikor	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Kaspaz 3	+++	++	+
mTOR	+++	++	+

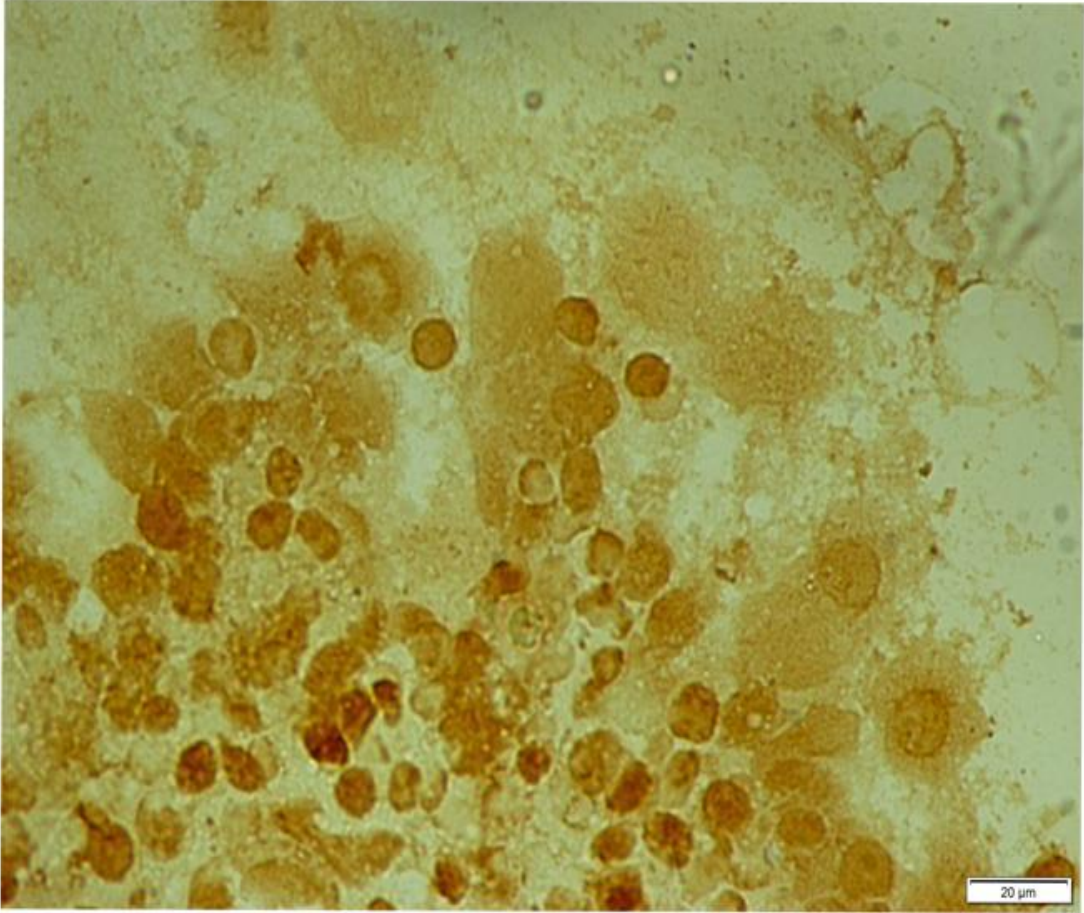
+: Az yoğun boyanma, ++: Yoğun boyanma, +++: çok yoğun boyanma



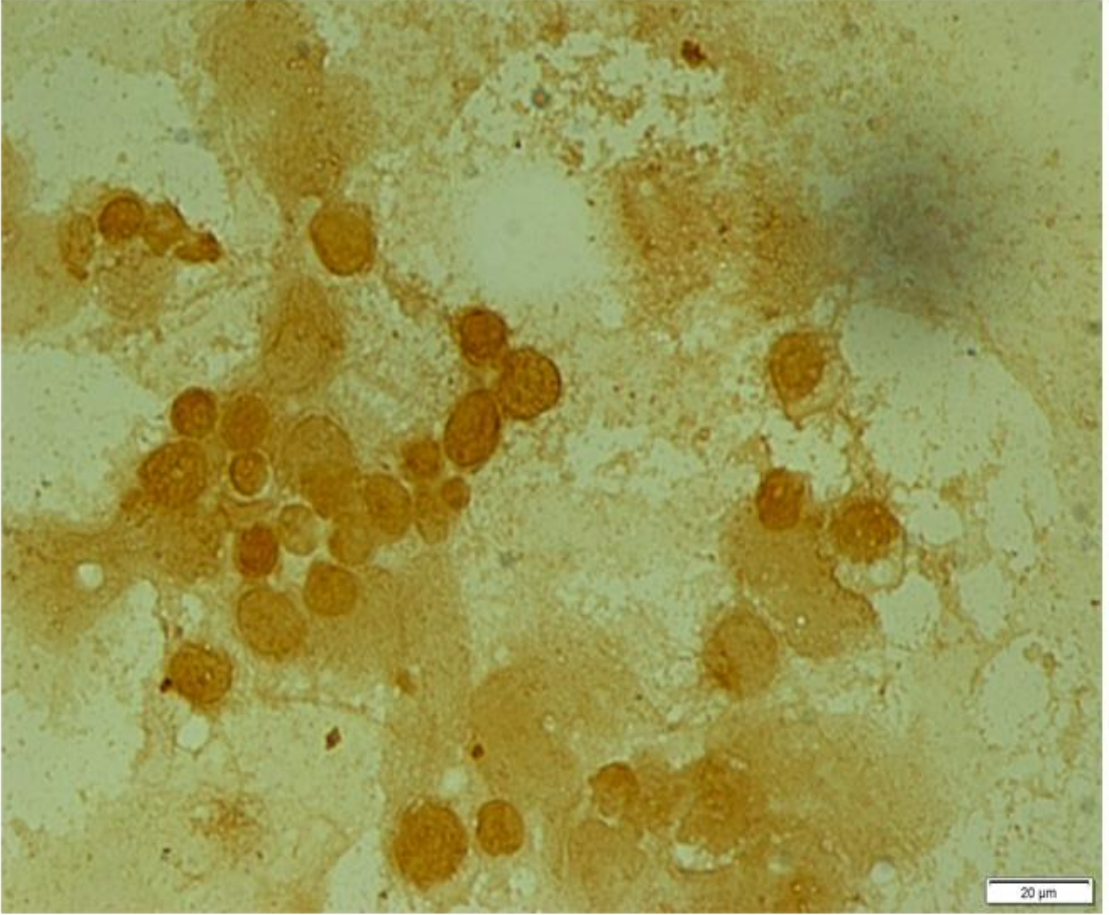
Şekil 4.3. Kaspaz 3 immünoaktivitesi için negatif kontrol olarak hazırlanan kumulus hücre yayma preparatı



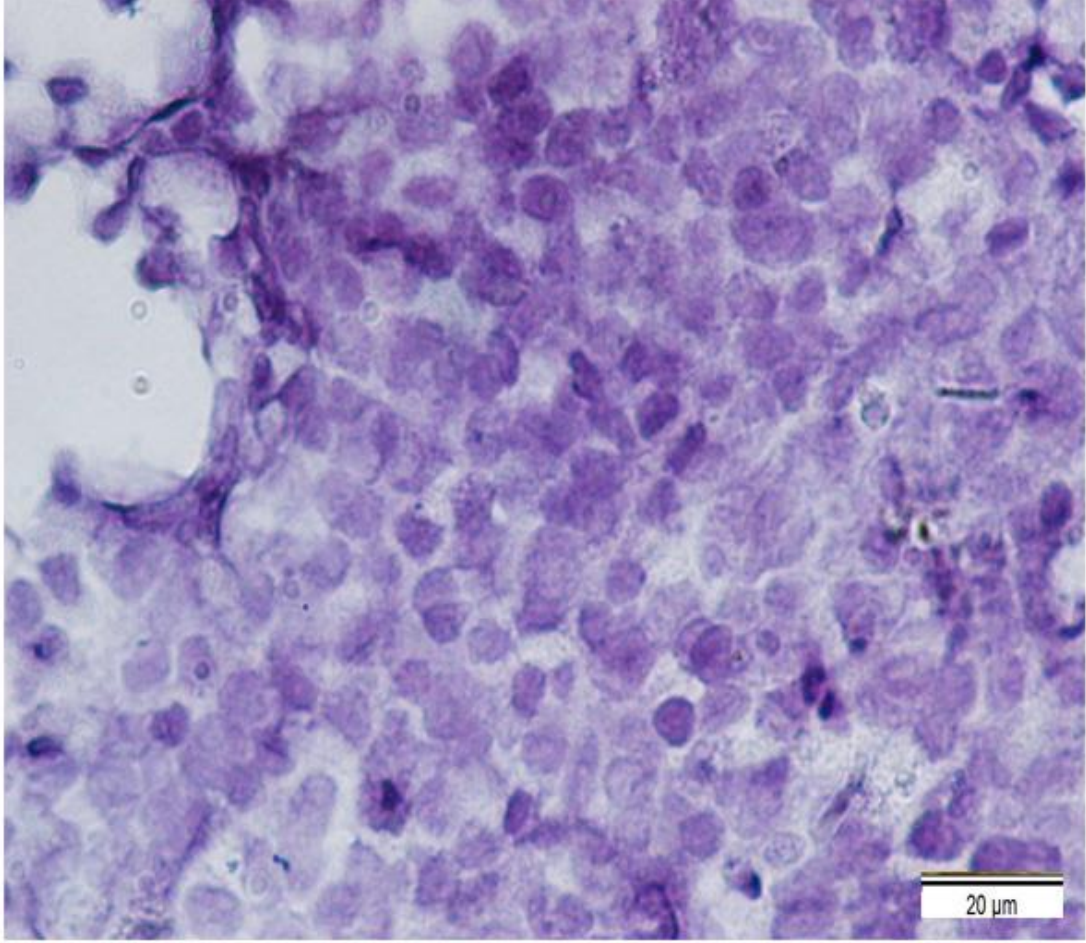
Şekil 4.4. Grup 1'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen kaspaz 3 immünoreaktivitesi



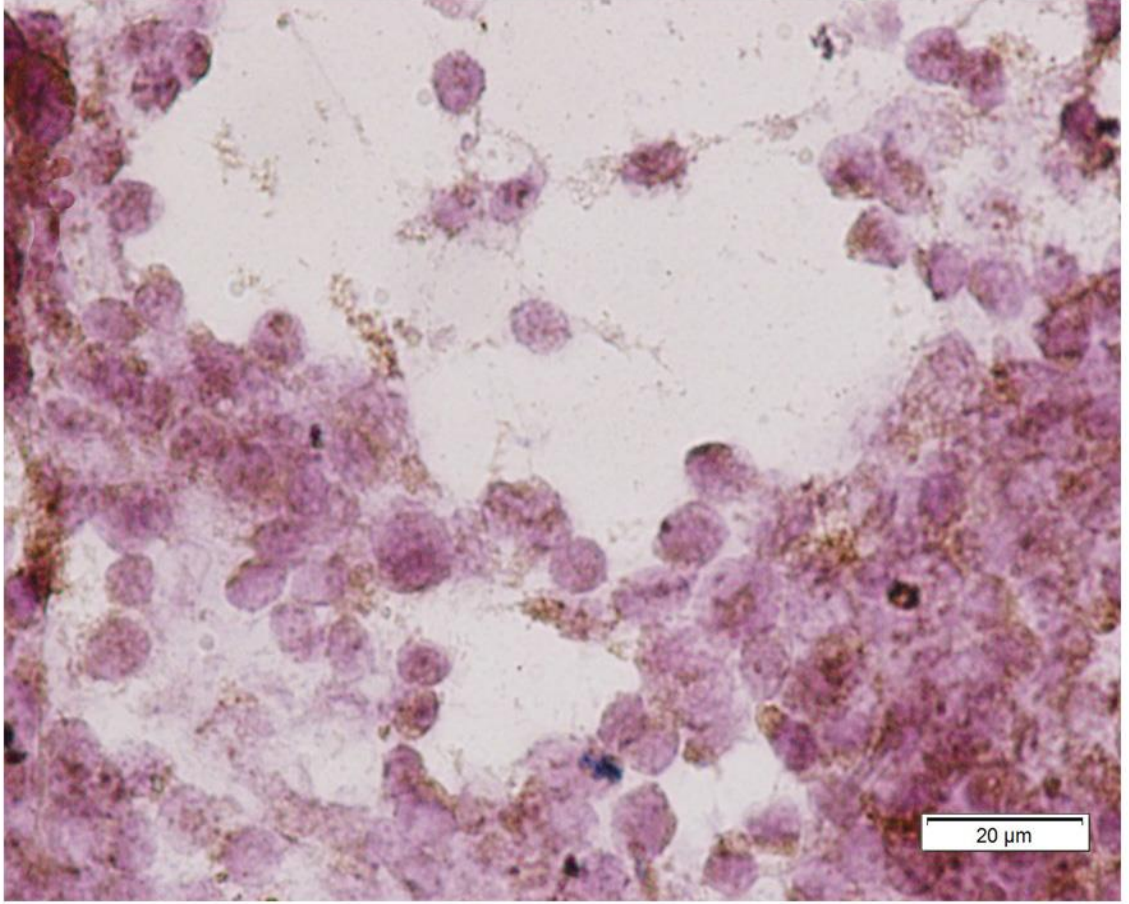
Şekil 4.5. Grup 2' deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen kaspaz 3 immünoreaktivitesi



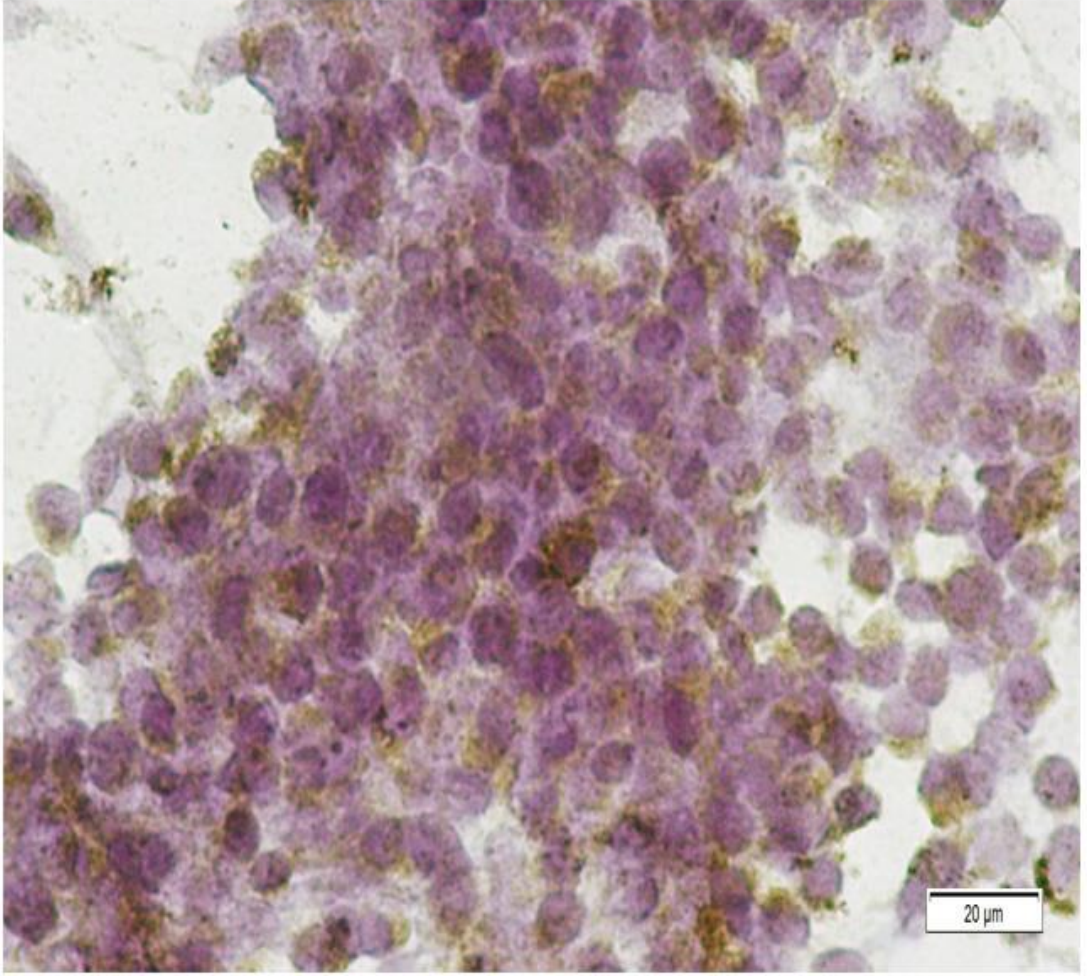
Şekil 4.6. Grup 3'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen kaspaz 3 immünoreaktivitesi



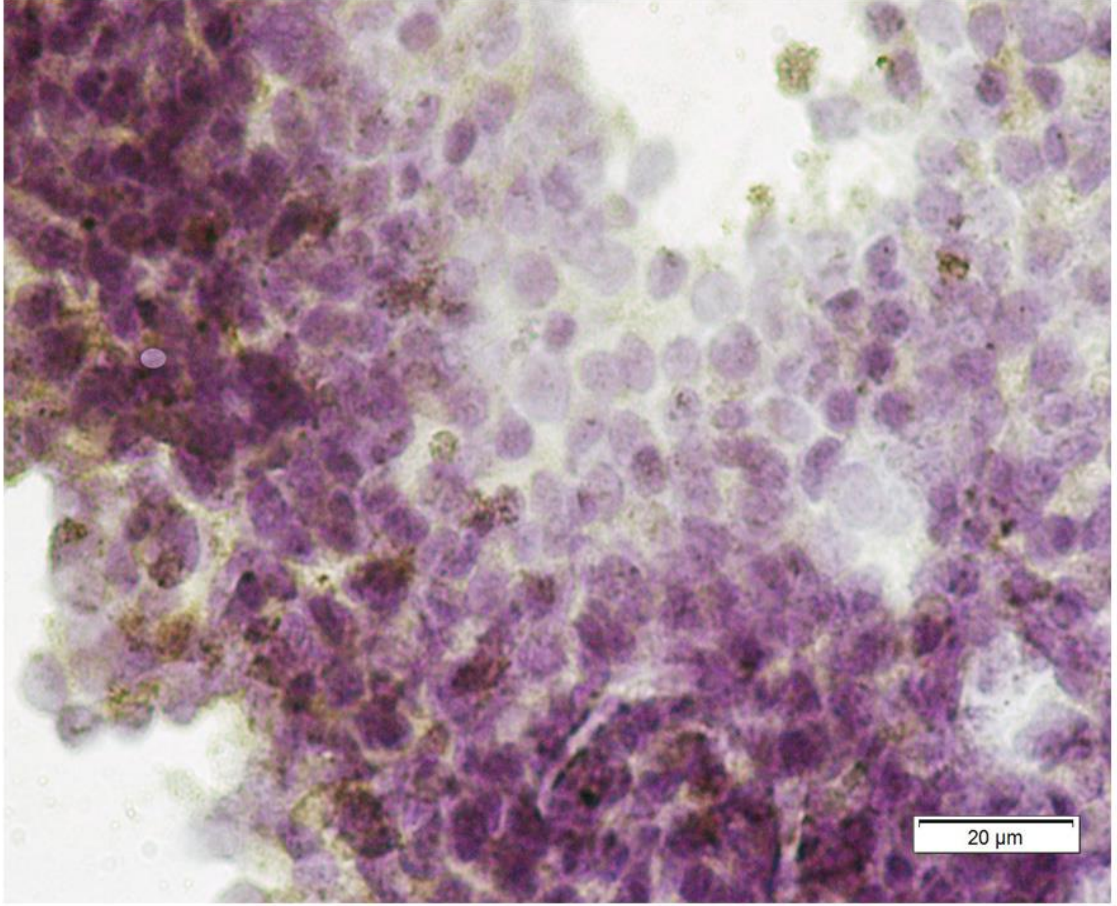
Şekil 4.7. mTOR immünoaktivitesi için negatif kontrol olarak hazırlanan kumulus hücre yayma preparatı



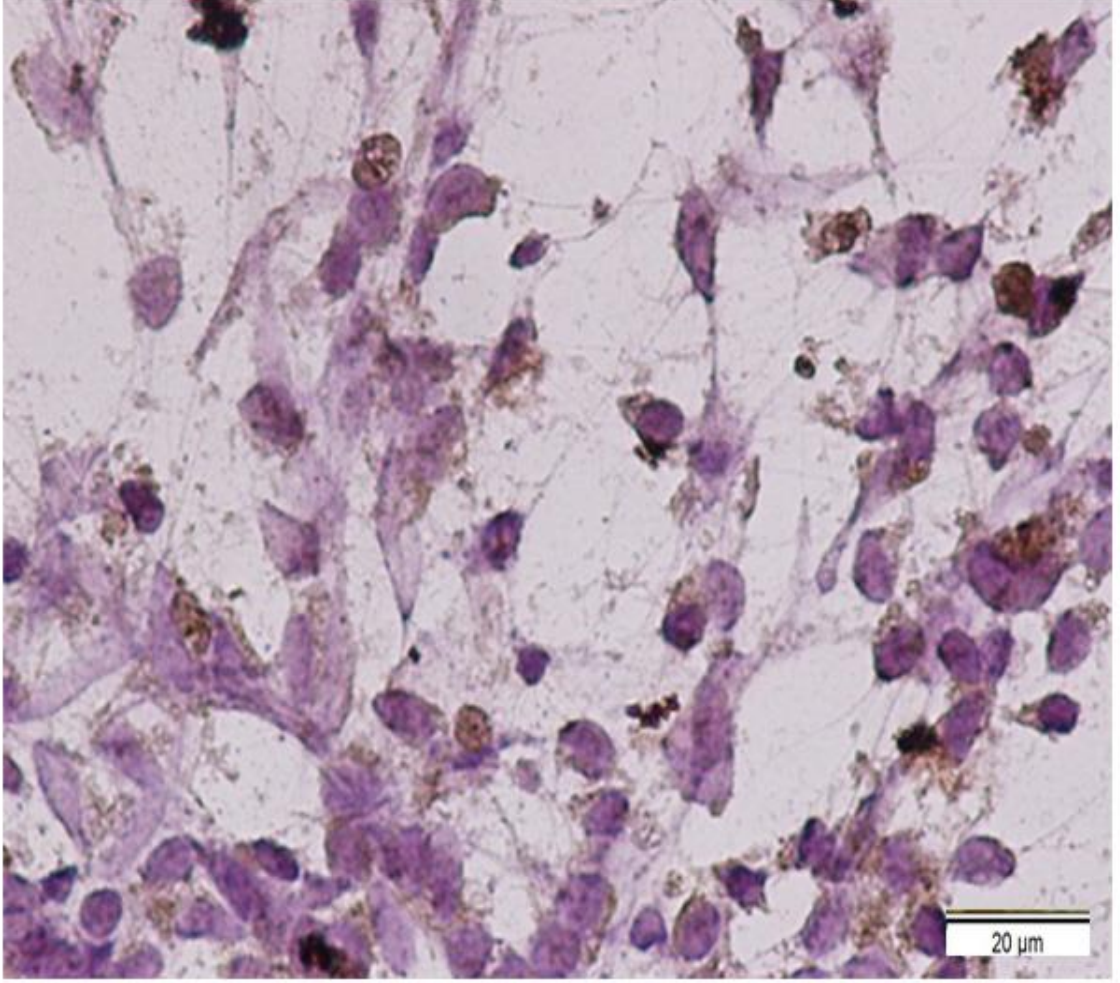
Şekil 4.8. Grup 1'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen mTOR immünoreaktivitesi



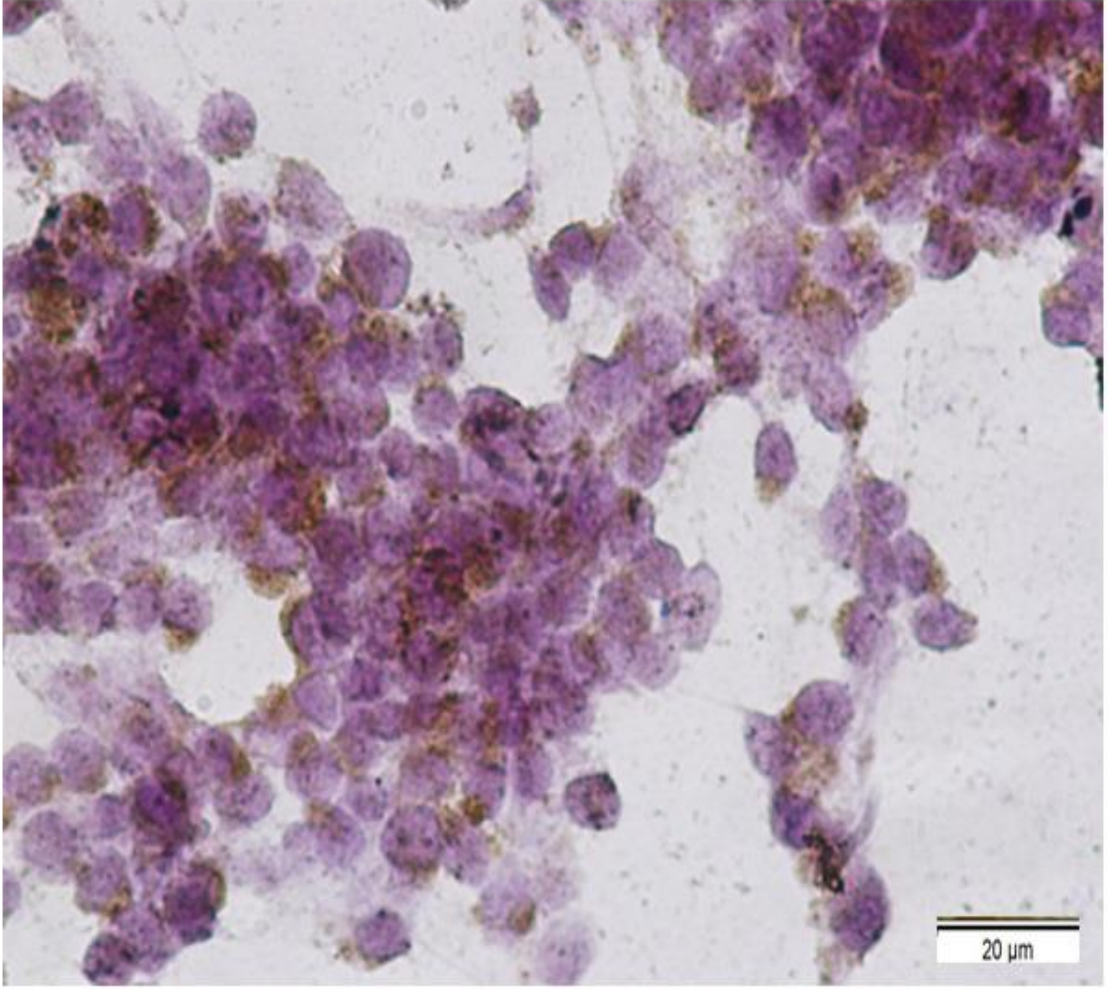
Şekil 4.9. Grup 2'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen mTOR immünoreaktivitesi



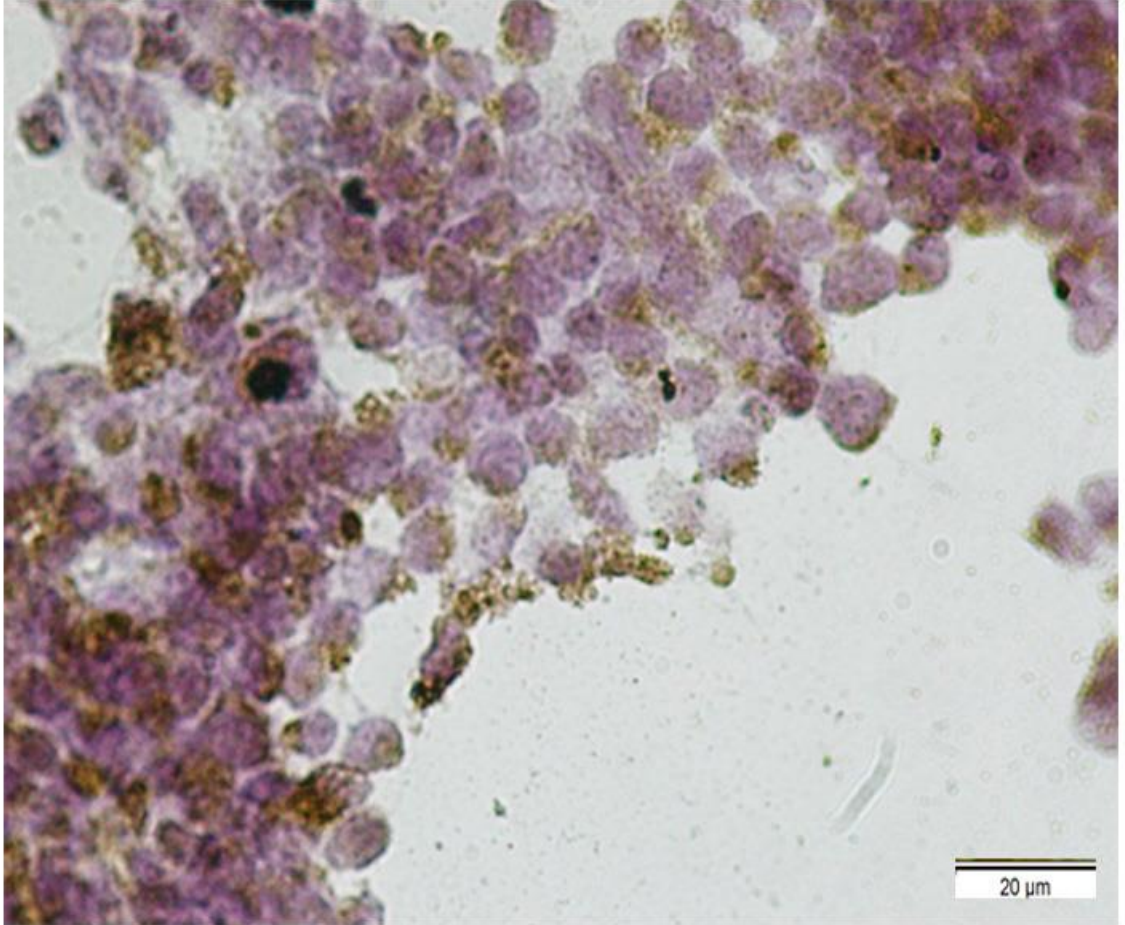
Şekil 4.10. Grup 3'deki hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen mTOR immünoreaktivitesi



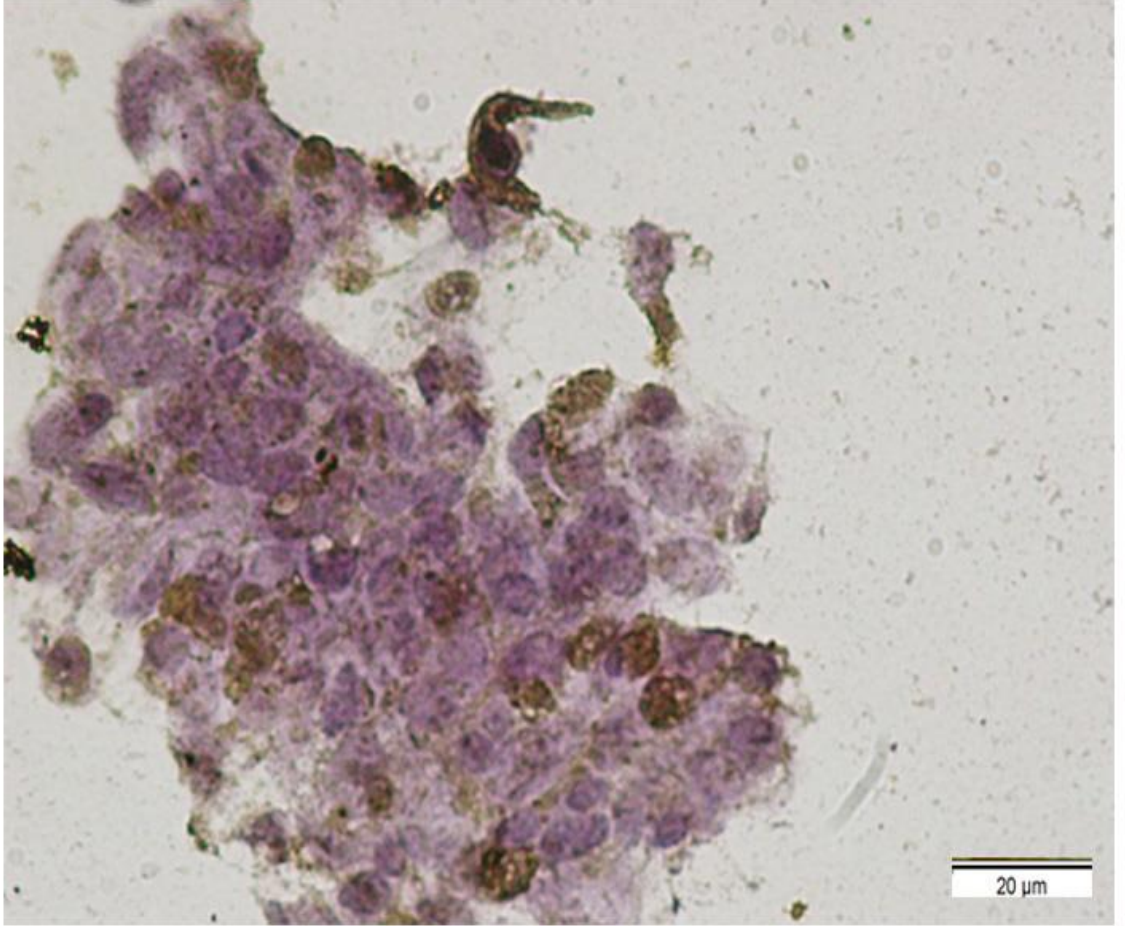
Şekil 4.11. Gebe olan hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen kaspaz 3 immünoreaktivitesi



Şekil 4.12. Gebe olmayan hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen kaspaz 3 immünoreaktivitesi



Şekil 4.13. Gebe olan hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen mTOR immünoaktivitesi



Şekil 4.14. Gebe olmayan hastalara ait yayma preparatta kumulus hücrelerinde görülen mTOR immünoreaktivitesi

5. TARTIŞMA

İnfertilite problemi ile karşılaşan çiftlerin sayısının gün geçtikçe artması, bu çiftlerin IVF tedavisi için merkezlere başvurusunu da artırmıştır. Bu durum, üreme konusuna olan merakı artırmıştır.⁷⁹ IVF merkezlerindeki temel amaç; bazı biyomarkerleri değerlendirerek, elde edilen sonuçlar eşliğinde üreme potansiyelini artırmaktır. IVF başarısını önceden tahmin etmek için folikül sıvısı içerisindeki biyomoleküllerin araştırılması son yıllarda dikkat çekmiştir. Aslında folikül sıvısındaki biyomolekülleri tanımak ve bunların fonksiyonları arasındaki korelasyonu bilmek sadece embriyo ve oosit kalitesini değiştirmeye değil, bununla birlikte yeni metodların bulunmasında ve üreme başarısını tahmin etmede büyük kolaylık sağlar. Daha geniş bir vizyon ile bakıldığında yapılan tedavilerde, IVF sonucu başarısız olguların folikül sıvısı içinde bulunan moleküllerin, spesifik miktarını değiştirerek olumlu sonuçlar alınabilir. Böyle uygulamalar oosit gelişimini, sayısını, miyotik maturasyonu, fertilizasyonu, embriyo kalitesini ve gebeliği etkileyebilir.⁸⁰⁻⁸²

Folikül sıvısı içeriğinin biyokimyasal bileşimini, proteinler, şekerler, ROS, antioksidanlar ve hormonlar oluşturur. Bu bileşimlerden ROS ve antioksidanların infertilite ile bağlantısı son zamanlarda büyük ilgi uyandırmıştır.⁸³ Oksidatif stresin embriyo gelişiminde, mitokondrial değişikliklerde, artmış MDA ile blastomer sayısının azaldığına dair çalışmalar yapılmıştır.⁸⁴ Son zamanlarda oksidan-antioksidan parametrelerden MDA, TOS, SOD, GSH, TAS gibi belirteçlerin IVF sonuçları ile ilişkisi büyük ilgi uyandırmıştır.^{83,84}

Yaptığımız bu çalışmada IVF tedavisi alan hastaların folikül sıvılarında, oksidan-antioksidan seviyeleri biyokimyasal olarak değerlendirildi ve bu değerlendirmeler dahilinde immünohistokimyasal olarak kumulus hücrelerindeki Kaspaz 3 ve mTOR

yolağı ile ilişkileri araştırıldı. Daha önceki çalışmalardan farklı olarak, bu sonuçların 35 yaş altı hastalardaki oosit sayısı ile ilişkisi değerlendirildi.

Oksidatif stres belirteçlerinden en önemlilerinden birisi lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunun belirteci olan MDA hücrenin bütünlüğüne zarar verebilir. MDA, peroksidasyon düzeyini ölçmek için hem kolay tayin edilebilen hemde en çok kullanılan parametredir.⁸⁵

Daha önce yapılan çalışmalarda endometriozisli hastalarda serum ve foliküler sıvıda MDA düzeylerinin erkek infertilite faktörlü hastalara göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür.^{33,86} Bir başka çalışmada ise foliküler sıvıda MDA seviyesi ile gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı gösterilmiştir.⁸⁷ Yalçinkaya ve ark.⁷⁷ yaptığı çalışmada MDA, fertilizasyon ve Grade A embriyolar arasında pozitif korelasyon bulmuştur. Yine bir başka çalışmada endometriozisli hastaların MDA seviyesi açıklanamayan infertilite hastalarından yüksek bulunmuştur.³¹ Pasqualotto ve ark.⁸⁸ yaptıkları çalışmada MDA seviyesi ile embriyo kalitesi ve gebelik arasında bir korelasyon bulamamışlardır. Karakaya ve ark.⁸⁹ yaptıkları bir çalışmada 35 yaş üstü hastalarda oosit sayısı 5'in altında olan hasta grubunda, normal (5-20 arasında) ve yüksek (>20) olan gruplara kıyasla MDA seviyesini daha yüksek bulduklarını ifade etmişlerdir. Agarwal ve ark.⁸³ gebelik oranları ile MDA seviyesi arasında pozitif korelasyon bulmuştur. Çalışmamızda gebe olan hastalarımızın MDA seviyeleri ile gebe olmayanlar arasında istatistiksel bir anlamlılık olmasa da gebe olanlarda sayısal bir artış gözlemlendi ($p>0,05$). Oosit verimliliğine göre yaptığımız karşılaştırmada ise over rezervi zayıf olan Grup 1 hastalarının Grup 2 ve Grup 3 gruplarına göre MDA seviyesi yüksek bulundu ($p<0,05$). Grup 2 hastalarına baktığımızda MDA seviyesi Grup 3 grubundaki hastalardan anlamlı derecede yüksek idi ($p<0,05$). Özetle, sonuçlarımız folikül sıvısındaki yüksek lipid peroksidasyonunun IVF parametrelerinden oosit sayısı ile

bir etkisi olabileceğini göstermektedir. Hücrede ROS artışı mitokondrilerin ATP ihtiyacının artmasına dayanır ve buna bağlı olarak bu artışın MDA'yı artırdığı düşünülebilir. ROS dengesizliği folikülogenezin fizyolojik işleyişi değil de, azalmış folikülogenezin sonucu olabilir. Bu düşünceden yola çıkarak çalışmamızdaki azalmış oosit sayısı ile bu hastaların MDA seviyesinin yüksek bulunmasını benzer mantıkla açıklayabiliriz.

TOS ve TAS ölçümleri tam olarak bilinmeyen oksidan ve antioksidan türlerini içerebilir. Bu iki parametreyi ölçmek, bireysel olarak antioksidan ve oksidan enzimlerini ölçmekten daha çok avantaj sağlayabilir. Özellikle TOS'un TAS'a oranı oksidatif stresi belirlemede rol oynayabilir.⁹⁰ Total antioksidan kapasitesi, hücresel komponentlerin korunmasında rol oynar. Kandamisy ve ark.⁹¹ yaptığı çalışmada kadın kaynaklı infertilite hastalarında TAS seviyesini erkek kaynaklı hastalara göre daha düşük bulmuştur. Başka bir çalışmada ise açıklanamayan infertilite ve tubal faktörlü hastalarda TAS seviyesinin endometriozisle ilişkili bulunduğu belirtilmiştir.⁹² Oyawoye ve ark.⁹³ yaptıkları bir çalışmada, TAS miktarının embriyo gelişimi ve düşük fertilizasyonlu hastalarda azaldığını fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterdiler. Bu yüzden; düşük total antioksidan kapasitesinin düşük fertilizasyon potansiyelinin bir belirteci olduğu sonucuna vardılar.

Bizim çalışmamızdaki sonuçlarımıza göre folikül sıvısında ölçülen TAS ile hem oosit sayısı ve hem de gebelik arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$). TOS seviyesinde de gebe olan ve olmayan hastalar arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). TOS seviyesi oosit sayısına göre karşılaştırıldığında Grup 1'de artmış olarak izlendi ($p<0,05$). Diğer iki grup arasında istatistiksel bir anlamlılık görülmedi ($p>0,05$). Bu sonuç TOS seviyesindeki yüksekliğin artmış ROS seviyesinden kaynaklanabileceğini düşündürdü.

Ovaryum yaşlanmasının artmış oksidatif stres sebepli olduğu düşünülmektedir. Folikül sıvısında oosit ve embriyoyu oksidatif stresten korumak için reaktif oksijenleri süpüren antioksidanlar mevcuttur.^{94,95} Bu antioksidanlardan SOD' un H₂O₂ yi bastırması sayesinde hücreyi koruma rolü vardır. SOD enzimi germinal vezikül ve metefaz 2 aşamasında olması oosit maturasyonunda önemli olduğunu gösterir. Yapılan hayvan çalışmalarında SOD artışının HCG ile uyarılmış ovulasyonu inhibe edebileceği ve aşırı ekspresyonun foliküler atrezide etkili olabileceği ortaya konmuştur.⁹⁶⁻⁹⁸ Açıklanamayan infertiliteli hastaların SOD seviyesi erkek kaynaklı infertilite hastalardan yüksek çıkmıştır. Aynı şekilde Polikistik Over Sendromlu (PCOS) ve endometriozisli hastaların SOD seviyesi kontrolden yüksek çıkmıştır.³³ Sabatini ve ark.⁹⁹ yaptıkları çalışmaların SOD aktivitesi ve oosit döllenme kapasitesi arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Carbone ve ark.⁹⁴ yaptıkları çalışmada yaşlı kadınlarda SOD seviyesinin yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Karakaya ve ark.⁸⁹ over rezervi düşük olan hastalarda SOD seviyesini normalden düşük bulmuşlardır. Pekel ve ark.³³ yaptıkları çalışmada kadın kaynaklı infertilite hastalarında SOD seviyesi kontrolden yüksek bulmuşlardır. Yaşlı hastalarda yapılan başka bir çalışmada GSH'da azalma SOD da artış gözlenmiştir.⁹³ Literatür⁸⁹ ile paralellik arz eden bizim çalışmamızda da Grup 1'e ait SOD aktivitesi sonuçları diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (p<0,05). Grup 2'deki SOD değeri de Grup 3'e kıyasla anlamlı derecede düşüktü (p<0,05). Bu durumun artan lipid peroksidasyonuna karşı SOD süpürücüsünün tükenmesi sonucu olduğu kanısına varıldı.

Folikül sıvısındaki oksidanları dengede tutmak ve bu yolla oositi korumak için, bu oksidanları yakalayıcılar vardır. Bu yakalayıcılardan GSH endojen kaynaklı antioksidandır. GSH antioksidanı, embriyoda pronükleusların lokalizasyonu sırasında disülfid bağlarının çözülmesinde, oosit ve embriyo için oluşturulan kültür ortamlarında

embriyo gelişimine katkıda bulunan ve oosit sitoplazmik maturasyonda görev alan önemli bir süpürücüdür.¹⁰⁰ GSH ve IVF sonuçları ile ilgili literatürde çok az çalışmaya yer verilmiştir. Daha önce Ebisch ve ark.¹⁰¹ yaptıkları çalışmada GSH ile folikül büyüklüğü arasında bir orantı bulamamışlardır. Başka bir çalışmada ise gebe ve gebe olmayanlar arasında da fark bulamamıştır.⁷⁹ Yapılan diğer bir çalışmada oositlerin olgunlaşmasında GSH uygulanmasının olumlu etkileri olduğu ortaya koyulmuştur.¹⁰² Yalçinkaya ve ark.⁷⁷ yaptıkları çalışmada GSH seviyesinin gebe olanlar ve olmayanlar arasında fark bulamamışlardır.

Bizim çalışmamızın sonuçlarında ise; foliküler sıvıdaki GSH seviyeleri ile oosit sayısı arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı. Gebe kalan kadınlarla kalmayanlar arasında GSH seviyeleri karşılaştırıldığında; literatürle⁷⁷ uyumlu olarak iki grup arasında anlamlı bir fark görülmedi. Bu sonuç bizde, hücre içi düzeylere kıyasla foliküler sıvıda nispeten düşük GSH düzeylerinin olduğunu düşündürdü.

Folikül sıvısı yanında, oositle iki yönlü parakrin tip neksus bağlantılarıyla ilişki kuran kumulus hücreleri de, oosit gelişiminde büyük öneme sahiptir.¹⁰³ Bu kompleks oosit gelişiminde radikal rol oynar. Kumulus hücreleri, oosit hücresine ATP üretimi için besin sağlar. Bu nedenle kumulus hücreleri mitokondrial değişiklikler için önemli bir olgudur. Oksidatif stres kumulus hücre apoptozuna da katkıda bulunur. Bu nedenle, kumulus hücrelerini oksidatif stresle indüklenen apoptoza karşı koruma, üreme yaşlanmasının tedavisinde büyük iyileştirici etkiye sahip olabilir.¹⁰⁴ Oosit kalitesini değerlendirmek için henüz kabul gören daha detaylı bir yöntem bulunamamıştır. Genelde değerlendirmeler morfolojik olarak yapılmıştır. Ancak sadece morfolojinin değerlendirildiği çalışmaların yeterli olmadığı sonucuna varılarak, otörlerce kumulus hücre apoptoz oranlarının IVF başarısının belirlenmesinde potansiyel bir belirteç olabileceği düşünülmüştür. Bundan dolayı infertil kişilerin kumulus hücrelerinin sadece

morfolojik değeriendirilmesinin IVF başarısını belirlemede eksik kaldığı kanısına varılmıştır. Ayrıca kumulus hücrelerinin apoptoz ve bölünme hızının oosit kalitesi, sayısı ve gebelik oranlarını tahmin etmede önemli olabileceği ileri sürülmüştür.^{105,106}

Apoptoz memelilerde foliküler atrezi ve ovulasyon sonrası regresyondaki temel mekanizmalardan biridir. Apoptoz fragmente embriyoya neden olur ve potansiyel implantasyonu sınırlar. Bu durum kötü fertilizasyon sonuçlarına neden olur.^{107,108} Kumulus hücrelerindeki apoptoz miktarının IVF sonuçlarını etkileyebileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur.^{109,110} Doğan ve ark.⁶¹ yaptıkları çalışmada metafaz 2 aşamasındaki oositin kumulus hücrelerindeki apoptoz oranının olgun olmayan oosite göre düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca fertilize olan hastaların kumulus hücrelerindeki apoptoz oranının fertilize olamayanlardan daha düşük olduğu görülmüştür. Embriyo kalitesi ve zona pellusida kalınlığı ile kumulus hücrelerinin apoptozu arasında hiçbir bağlantı gözlenmemiştir.¹¹¹ Ayrıca fertilize olan metafaz II oositleri ile fertilize olmayan metafaz II oositlerin apoptoz oranı incelendiğinde fertilize olmayan oositlerde bu oran daha yüksek bulunmuştur.⁶¹ Yaş karşılaştırmalı bir çalışmada ise 35 yaş üstü hastalarda apoptoz hücre yoğunluğunda 35 yaş altındakilere göre artış gözlenmiştir.¹¹¹ Lee ve ark.¹⁰ granüloza hücrelerindeki apoptozun, over rezervinin anlaşılmasında yardımcı olduğunu belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada 40 yaş ve üzeri hastalarda apoptoz oranının arttığı gözlenmiştir.¹⁰

Çalışmamızda indirekt immunohistokimya metodu kullanılarak kumulus hücrelerindeki kaspaz 3 yoğunluğu araştırıldı. Grup 1’de apoptotik immünoreaktivitenin diğer gruplara göre daha fazla olduğu görüldü. Grup 2 ve Grup 3’ e ait yaymalarda ise benzer bir boyanma gözlendi. Bu sonuçlarla, Grup 1’de apoptozun sebebinin artmış MDA olabileceği düşünüldü. Bununla birlikte, bu sorunu aydınlatmak amacıyla daha ileri

Çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varıldı. Gebe olan ve olmayan hastalarımıza ait yayma preparatlarda kaspaz 3 immünoreaktivitesi benzerdi.

Kumulus hücre apoptozunda mTOR un rolü belirsizliğini korumaktadır. mTOR, oosit gelişimi, mitoz ve mayoz bölünmede, enerji dengesinde etkili bir moleküldür.¹¹² mTOR kumulus hücrelerinin çoğalmasında etken rol oynayarak oosit gelişimini etkiler. Kumulus hücrelerindeki mTOR, oosit gelişim yeterliliğini korumak için gereklidir. Yapılan çalışmalarda mTOR'un kumulus hücrelerinin hayatta kalması, çoğalması ve kumulus hücrelerinin transkripsiyon bütünlüğünü korumada görev yaptığı vurgulanmaktadır.⁴⁴ Ayrıca kumulus hücreleri kolesterol biyogeneze katkıda bulunur. Böylece implantasyon sırasında yetersiz olan kolesterole katkıda bulunarak tutunmayı kolaylaştırır.^{113,114} Daha  nce PCOS'lu farelerde yapılan bir çalışmada mTOR granüloza hücrelerinde immünohistokimyasal olarak gösterilmiş ve PCOS'lu hastalarda pozitif reaksiyon veren hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu durum, mTOR'un artan granüloza hücrelerinden sorumlu olduğunu düşündürmüştür.¹¹⁵ Bir başka çalışmada rapamisin muamele edilen hastalarda apoptoz ve ROS düşük olarak tespit edilmiştir.¹¹⁶ Rapamisinin blastokistin düzelmesine katkıda bulunduğu ve aynı zamanda mTOR ve ROS'un yaşlanma için gerekli olduğu ortaya konmuştur. Rapamisin tedavisi mTOR'un protein sentezini azaltmaktadır. Rapamisin reaktif oksijeni azaltarak mTOR'u modüle eder ve apoptozu düşürür.¹¹⁶⁻¹¹⁸

Bizim alışmamızda ise Grup 1 hastalarına ait yayma preparatlarda mTOR immünoreaktivitesi daha yoğun olarak izlendi. Diğer iki grupta da mTOR immünoreaktivitesi açısından fark olduğu izlendi. Grup 2'deki yaymalarda orta derecede bir boyanma varken 20'nin üzerinde oosite sahip Grup 3'de hafif bir immünoreaktivite tespit edildi. Gebe olanlar ile olmayanlar arasında ise mTOR immünoreaktivitesi açısından fark gözlenmedi.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular ışığında, kumulus hücrelerinde görülen apoptoz ve mTOR ekspresyonunun birbirleri ile ilişkili olabileceği sonucuna varıldı.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Oksidatif stres infertilitede önemli rol oynar. Folikül sıvısındaki oksidan-antioksidan değişimi, oosit sayısı ve ICSI başarısını etkiler. Bu parametrelerin değişimi IVF başarısını artırabileceği gibi kötü sonuçlar da doğurabilir.

Bizim çalışmamızda folikül sıvısında tespit edilen MDA ve antioksidan miktarı ile gebelik sonucu açısından her iki durumda da önemli bir fark saptanmadı. Fakat MDA ve antioksidan miktarının oosit sayısını etkilediği sonucuna varıldı.

Çalışmamızda kumulus hücrelerindeki apoptoz ve mTOR pozitif hücre yoğunluğu arasında paralel bir ilişki olduğu gözlemlendi. Kumulus hücre apoptozunun ve mTOR reaksiyonunun artmasının oosit sayısını olumsuz yönde etkileyebileceği düşünüldü. Ayrıca oksidatif strese, mTOR'un kaspaz 3 yolu etkinliğinde artışa yol açarak katkıda bulunabileceği sonucuna varıldı.

Sonuçlarımızın IVF merkezlerinde tedavi sonuçlarını tahmin etmek için belirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. IVF döngülerinde oosit sayı ve kalitesinde ne tek başına kumulus hücrelerinin apoptoz oranı ne de tek başına oksidatif stres etkindir. Bu kriterlerin ilişkisini değerlendirmek için homojen ve daha fazla hasta gruplarında, güvenilirliği kanıtlanmış başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca çalışmamızın özellikle antioksidanlar ve mTOR inhibitörlerinin tedavide kullanılması konusunda yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Kamyabi Z, Gholamalizade A. Comparative study of serum and follicular fluid leptin concentrations among explained infertile, unexplained infertile and fertile women. *Int J Fertil Steril*, 2015, 2:150-6.
2. Templeton AA, Morris JK, Parslow W. Factor that affects the outcome of in vitro fertilization treatment. *Lancet*, 1996, 348:1402-1406.
3. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A Review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*, 2007, 9:567-79.
4. Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, Virant Klun I, Bokal EV. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet*, 2007, 24:91-7.
5. Yalçinkaya E, Çalışkan E, Budak Ö. In vitro maturation may prevent the cancellation of in vitro fertilization cycles in poor responder patients. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 2013, 4:235–237.
6. Borowiecka M, Wojsiat J, Polac I, Radwan M, Radwan P, Zbikowska HM. Oxidative stress markers in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Syst Biol Reprod Med*, 2012, 58(6):301-5.
7. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod*, 2004, 19:2869–2874.
8. Kansaku K, Itami N, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Differential effects of mitochondrial inhibitors on porcine granulosa cells and oocytes. *Theriogenology*, 2017, 103:98-103.

9. Wit AA, Wurth YA, Kruip TA. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci*, 2000, 78:1277-1283.
10. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH. Cumulus cell apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Ass Reprod Gen*, 2001, 99:490-498.
11. Lee SE, Kim EY, Choi HY, Moon JJ, Park MJ, Lee JB, Jeong CJ, Park SP. Rapamycin rescues the poor developmental capacity of aged porcine oocytes. *J Anim Sci*, 2014, 27: 690-756.
12. Demir N, Yaba A. The mechanism of mTOR (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *J Ovarian Res*, 2012, 2215:5-38.
13. Guo J, Shi L, Gong X, Jiang M, Yin Y, Zhang X, Yin H, Li H, Emori C, Sugiura K, Eppig JJ, Su YQ. Oocyte-dependent activation of mtor in cumulus cells controls the development and survival of cumulus–oocyte complexes. *Journal of Cell Sci*, 2016, 129: 3091-3103.
14. Mazzeletti M, Brogini M. PI3K/ AKT/ mTOR inhibitors in ovarian cancer. *Curr Med Chem*, 2010, 36:4433-47.
15. Khodja FA, Hamouli Z, Boukerbout F, Djerrouidib K. The cytogenetic aspect of male infertility. *Iran J Reprod Med*, 2014, 12:835–836.
16. Yumru AE, Öndeş B. Approach to the infertile couple and choice of the optimum patient for in vitro fertilization. *Jarem*, 2011, 1:57-60.
17. Uğur AS. İnfertilite tedavisi alan kadınlarda üreme problemlerinin fiziksel, duygusal, sosyal ve ilişkisel yaşam alanlarına etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Hemşireliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi İstanbul: İstanbul Bilim Üniversitesi, 2014.

18. Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, te Velde ER, Broekmans FJ. The clomiphene citrate challenge test for the prediction of poor ovarian response and nonpregnancy in patients undergoing in vitro fertilization: a systematic review. *Fertil Steril*. 2006, 86:807-18.
19. Çelik E. Serum ve folikül sıvısında antimülleryan hormon seviyesinin in vitro fertilizasyon (ıvf) başarısının belirlenmesindeki rolü. Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Dogum Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2010.
20. Canbaba M. Art (yardımcı üreme teknikleri) sikluslarında agonist –antagonist tedavi modalitelerinin folikül sıvısı serbest oksijen radikalleri ve kalsiyum üzerine etkileri ile bunun oosit kalitesi ve sonuçlara etkisi. Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Dogum Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2011.
21. Kılınç RA. Çukurova üniversitesine başvuran infertil çiftlerde in vitro fertilizasyon endikasyonları. Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Dogum Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2007.
22. Westrom L. Effect of pelvic inflammatory disease on fertility. *Venereology*, 1995, 8:219-222.
23. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Amortegui AJ, Heine RP, Landers DV, Sweet RL. Lower genital tract infection and endometritis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol*, 2002, 100:456-463.
24. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Sci*, 2002, 296:2185-2188.
25. Şenyuva İ, Taner CE, Kebabçılar. İnfertil hastalarda uterin faktörün değerlendirilmesinde transvaginal salin infüzyon sonografi. *Göztepe Tıp Dergisi*, 2007, 3:95-99.

26. Stone AC, Klinger JR. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Humana Press*, 2008, 93-126.
27. Berek JS, Novak E. Berek & Novak's. *Gynecology*, 14th ed. USA, Williams & Wilkins, 2007:1549-1580.
28. Crosignani PG, Collins J, Cooke ID, Diczfalussy E, Rubin B. Recommendations of the ESHRE workshop on 'Unexplained Infertility' Anacapri. *Hum Rep*, 1993, 6:977-80.
29. Patrick J. Rowe, Frank H. Comhaire, Timothy B. Hargreave, Heather J. Mellow. *WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple*, 1th ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1993:92.
30. Günel S, Aktan E, Yücel A. *WHO Laboratuvar el kitabı*, 4. Baskı. Ankara, Tıp Teknik Yayınevi, 2002:6-62.
31. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2006, 31;51-6.
32. Koçak Z. sıçanlarda iskemi/reperfüzyona bağlı ortaya çıkan hedef ve uzak organ zedelenmelerinde oluşan inflamasyon ile oksidatif/ nitrostatif strese mTOR'un katkısının araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Farmakoloji Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2016
33. Pekel A. İvf Hastalarında Serum Ve Foliküler Sıvıda Solübl Fas, Fas Ligand Ve Oksidatif Stres Biomarkerlerinin Değerlendirilmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2013.
34. Ögüt S. Yaşlılık ve oksidatif stres. *Tıp Fak Derg*, 2012, 2:68-74.
35. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57:145-55.
36. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg*, 2015, 12:91-96.

37. Bige Ö. Foliküler sıvı oksidatif stresin ıvf sonuçları üzerine etkisi. Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı. Uzmanlık Tezi, İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2008.
38. Yen M. İn vitro fertilizasyon (ıvf), antinflamatuar faktörler ve total antioksidan kapasite. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2011.
39. Tola EN. The Effects of oxidants and antioxidants parameters on female fertility. Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2014.
40. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 2005, 10:577-86.
41. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Sharman A, Gupta S. The Effects of oxidative stress on female reproduction. *Endocrinol*, 2012, 10:1-31.
42. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Stem Cells*, 1999, 17:306-313.
43. Solakoğlu Z. Apoptozis varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, 2009, 3:20-25.
44. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi, *Toraks Dergisi*, 2001, 1:91-95.
45. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, 2000, 256:42-49.
46. Göncü NE, Pehlivan S. Apoptozisin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler işaretleri. *Arşiv*, 2001, 10: 292-307.
47. Alpak O. Kumulus hücreleri proliferasyon ve apoptoz indekslerinin intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonuçlarıyla ilişkilendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji

ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Bilim Üniversitesi, 2009.

48. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4):495–516.

49. Connolly PF, Jager R, HO Fearnhead. New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol*, 2014, 5:149.

50. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Sci*, 2015, 122:3589-3594.

51. Soliman GA. The role of mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes signaling in the immune responses. *Nutrients*, 2013, 6:2231–2257.

52. Güralp ŒA. İnsan granuloza hücreli tümörlerde mTOR protein ekspresyonunun histolojik ve klinik tümör agresivitesi belirteçleri ile olan iliŒkisi. Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2012.

53. z Arslan D, Korkmaz G, Gzaık D. Otofaji: Bir hücre sel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2011, 4:184-94.

54. Leeson TS, Leeson CR, Poparo AA. *Text/ Atlas Histology*. 1th ed. Houston, Harcourt Brace Jovanovich, 1988:120-132.

55. Noyan A. *Fizyoloji*, 18. Baskı. Ankara, Meteksan, 2010: 977-987.

56. Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am J Obstet Gynecol*. 1986, 1:189-95.

57. Ammini AC, Pandey J, Vijayaraghavan M, Sabherwal U. Human female phenotypic development: role of fetal ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994, 2:604-8.

58. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 13.th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2015:25-29.
59. Moore KL, Persaud TVN. *İnsan Embriyolojisi*, 6. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 225-55.
60. Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am J Obstet Gynecol*. 1986, 155:189-95
61. Doğan S. Stimüle edilmiş hastalardan elde edilen immatür oositler'de in vitro maturasyon ve kümülüs'lerindeki apoptotik farklılıkların değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Entitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, 2015.
62. Peker S. Capsaicin'in ovaryum granuloza hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozisi üzerine etkisi. Sağlık Bilimleri Emstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Bursa: Uludağ Üniversitesi, 2015.
- 63 Çelik Ö, Yıldırım A. Folikülogenezisin moleküler temelleri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2010, 1:59-63.
64. Ross MH. *Histology a Text and Atlas of Histology*. 4th ed. Philedelphia, Williams and Wilkins; 2003:773-88.
65. Eşrefoğlu M. *Embriyoloji*, 2. Baskı. İstanbul, İstanbul Kitap Evleri, 2017:9-67.
66. Gartner LP, Hiatt LJ. *Color Text Book of Histology*. 2.th ed. London, WB Saunders, 2001:463-82.
67. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. *Female Reproductive System Histology, A text and Atlas*, 2.th ed. USA, Williams&Wilkins, 1989:649-62.
68. Yılmaz T. İn-vitro fertilizasyon ve embriyo transferi sikluslarında folikül sıvılarında anti-müllerian hormon (amh) düzeyleri ile oosit, embriyo kalitesi ve gebelik sonuçları

- arasındaki ilişki. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Yenyüzyıl Üniversitesi, 2016.
69. Veeck LL. Preembryo grading atlas of the human oocyte and early conceptus. Baltimore: *Williams and Wilkins*. 1991, 2:121–149.
70. Elnashar AM. Intrauterine insemination. *Middle East Fertil Soc J*, 2004, 9:2.
71. Kuyucu Y. Oosit olgunlaşma süreci ve düzenleyici faktörler. *Arşiv*, 2009,18:227.
72. Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 1993, 39:43-64.
73. Bączkowski T, Kurzawa R, Glabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Bio*, 2003, 4:5-22.
74. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1990, 186: 421-431.
75. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radicalcation. *Clin Biochem*, 2004, 37:277-85.
76. Pekel A, Gönenç A, Turhan N, Kafalı H. Changes of sFas and sFasL, oxidative stress markers in serum and follicular fluid of patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32:233–241.
77. Yalçinkaya E. Foliküler Sıvıdaki TSH Değerlerinin oksidatif hasar parametreleri ve in vitro fertilizasyon üzerine etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı. *Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi*, 2010.
78. Yaba A, Bianchi V, Borini A, Jonson J. A Putative and mitotic checkpoint dependent on mtor function controls cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells. *Reprod Sci*, 2008, 15:128-138.

79. Boivin J, Bunting L, John A. Collins and Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility for medical care. *Hum Reprod*, 2007, 22:1506- 1512.
80. Lass A. Investigation of the Infertile Couple for Assisted Conception In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction. *Peter R Brinsden*, 2000,13:32-34.
81. ASRM/SART Registry. Assisted reproductive technology in the United States: Results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril*, 2000, 5:72-641.
82. Agarwal A, Nallella KP, Allatiianeni SS et al. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Hum Reprod*, 2004, 8:616-627.
83. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, 2008;10:1375-403.
84. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2004, 82:1171–1176.
85. Erdal N, Altunkaynak Y, Altunkaynak E, Öztürk M, Mutluay B, Köksal A, ve ark. Migrenli Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Düşünen Adam*, 2005, 3:129-35.
86. Nasiri N, Moini A, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Salman-Yazdi R, Arabipoor A. Oxidative Stress Statues in Serum and Follicular Fluid of Women with Endometriosis. *Cell J*, 2017, 4:582-587.
87. PasqualottoEB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI. Effect of Oxidative Stress in Follicular Fluid on The Outcome of Assisted Reproductive Procedures. *Fertil Steril*, 2004, 81:973-6.

88. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med*, 2000, 5:314-20.
89. Karakaya C. İn Vitro Fertilizasyon (Ivf) Hastalarının Folikül Sıvılarında Oksidan-Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Lipid Peroksidasyonu Seviyelerinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2010.
90. Toy A. Meme Kanseri Hastalarında Tedavi Öncesi ve Sonrası Total Antioksidan Kapasite Eser Elementler ve Lipit Peroksidasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi, 2012.
91. S Kandasamy, R Sivagamasundari, A Bupathy. Sethubathy S, Gobal V. Evaluation of insulin resistance and oxidative stress in obese patients with polycystic ovary syndrome. *IJABPT*, 2010, 1:391–98.
92. Polak G, Rola R, Gogacz M, Koziol-Montewka M, Kotarski J. Malonyldialdehyde and total antioxidant status in the peritoneal fluid of infertile women. *Ginekol Pol*, 1999, 3:135-40.
93. Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod*, 2003, 18:2270-227.
94. Carbone MC. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod*. 2003, 9(11): 639–43.
95. Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem*, 2014, 13:8735–4.

96. Sato EF, Kobuchi H, Edashige K, Takahashi M, Yoshioka T, Utsumi K. Dynamic aspects of ovarian superoxide dismutase isoenzymes during the ovulatory process in rat. *FEBS Lett*, 1992, 303:121-125.
97. Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Bulkley GB, Wallach EE. Effect of inhibition of oxygen free radicals on ovulation and progesterone production by the in vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil*, 1991, 91:207-212.
98. Tilly JL, Kowalsky KI, Johnson AL, Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 1991, 129:2799-901.
99. Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T, Grudzinski JG. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1999, 72:1027-1034.
100. Jozwik M, Wolczynski S, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5:409-13.
101. Ebisch I.M, Peters W.H.M, Thomas C.M.G., Wetzels A.M.M., Peer P.G.M., Steegers-Theunissen R.P.M. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod*, 2006, 7:1725-1733.
102. Curnow EC, Ryan JP, Saunders DM, Hayes ES. In vitro developmental potential of macaque oocytes, derived from unstimulated ovaries, following maturation in the presence of glutathione ethyl ester. *Hum Reprod*. 2010, 10:2465-74.
103. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 2008, 2: 159-177.
104. Molskness TA, Greenberg LH, Stouffer RL. Are Human Luteinizing Granulosa Cells A Site of Action For Progesterone and Relaxin. *Fertil Steril*, 1990, 53: 446-5.
105. Host E, Gabrielsen A, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of

the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2002, 3:511-515.

106. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 1997, 47:23–32.

107. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2:93–98.

108. Bosco L, Ruvolo G, Morici G, et al. Apoptosis in Human Unfertilized Oocytes After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Fertil Steril*, 2005, 84:1417–1423.

109. Nakahara K, Saito H, Saito T, Et Al. The Incidence of Apoptotic Bodies in Membrana Granulosa can Predict Prognosis of Ova From Patients Participating In Vitro Fertilization Programs. *Fertil Steril*, 1997, 68:312–7.

110. Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, Virant KI, Bokal EV. Effect of Apoptosis and Reactive Oxygen Species Production in Human Granulosa Cells on Oocyte Fertilization and Blastocyst Development. *J Asist Reprod Genet*, 2007, 24:91–7.

111. Corn CM, Hauser-Kronberger C, Moser M, Tews G, Ebner T. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertil Steril*, 2005, 3:627-633.

112. Garrett, A.P. K-ras mutation may be an early event in mucinous ovarian tumorigenesis. *Int J Gynecol Pathol*, 2001, 20:244–251.

113. Yaba A. Kayisli UA, Johnson J, Demir R, Demir N. The abelson tyrosine kinase (c-Abl) expression on the mouse uterus and placenta during gestational period. *J Mol Histol*. 2011, 2:91-6.

114. Yaba A, Bianchi V, Borini A, Johnson J. A putative mitotic checkpoint dependent on mTOR function controls cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells. *Reprod Sci*, 2008, 2:128-38.

115. Gorre N, Adhikari D, Lindkvist R, Brännström M, Liu K, Shen Y. mTORC1 Signaling in oocytes is dispensable for the survival of primordial follicles and for female fertility. *Plos One*, 2014, 22:110491.
116. Jang BC, Paik JH, Kim SP, Shin DH, Song DK, Park JG, Suh MH, Park JW, Suh S. Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF- κ B, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cellular Signalling*, 2005, 17: 625–633.
117. Morin-Doré L, Blondin P, Vigneault C, Grand FX, Labrecque R, Sirard MA. Transcriptomic evaluation of bovine blastocysts obtained from peri-pubertal oocyte donors. *Theriogenology*, 2017, 93:111-123.
118. Leconte M, Nicco C, Ngô C, Chéreau C, Chouzenoux S, Marut W, Guibourdenche J, Arkwright S, Weill B, Chapron C, Dousset B, Batteux F. The mTOR/AKT Inhibitor Temsirolimus Prevents Deep Infiltrating Endometriosis in Mice. *The American Journal of Pathology*, 2011, 2: 880-889.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Nurhan AKARAS Doğum tarihi: 10.01.1986 Doğum yeri: Iğdır Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0553 618 24 29 Faks: Metin girmek için burayı tıklatın. E-mail: nurakaras@hotmail.com
Eğitim
Lise: Iğdır Lisesi (2002) Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi (2003-2007) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (2009-2011) Doktora: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (2012-2017)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: İyi derecede (Yök dil 80, Ekim 2017) Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
.....
İlgi Alanları ve Hobiler
Spor , Müzik, Sinema, Kitap

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Arş.Gör.Nurhan AKARAS
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		“Tüp Bebek Merkezine Başvuran hastaların Oosi mikroyevresinde meydana gelen histolojik ve biyokimyasal değişikliklerin fertilizasyon başarısı ile ilişkisinin araştırılması”
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 3 Karar No: 7	Tarih: 15.08.2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin kendisi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Mustafa GÜL
Üye

Prof.Dr.Hamidullah UYANIK
Üye

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye

Yrd.Doç.Dr.İlker İNCE
Üye

Yrd.Doç.Dr.Zahide KOŞAN
Üye

Yrd.Doç.Dr.Binali FIRINCI
Üye

Emrah MELETLİOĞLU
Üye