

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

**IVF İLE ELDE EDİLEN GRANULOZA HÜCRELERİNDE
APOPİTOZ, KALSİYUM SİNYALİ VE OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DİLEK ULUSOY KARATOPUK

DOKTORA TEZİ

I. DANIŞMAN

Prof. Dr. Meral ÖNCÜ

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Yönetim Birimi tarafından 3517-D2-13 Proje numarası ile
desteklenmiştir.
Tez No: 104**

ISPARTA – 2014

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi: 27.06.2014




1. Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meral ÖNCÜ
Süleyman Demirel Üniversitesi



2. Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN ÇALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Esra KOYUNCU
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye: Yrd. Doç. Dr. Hakan DARICI
SANKO Üniversitesi



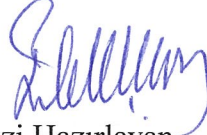
ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Necdet ADANIR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Tezi Hazırlayan

Dilek ULUSOY KARATOPUK



I. Danışman

Prof. Dr. Meral Öncü



II. Danışman

Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu

ÖNSÖZ

Eğitim hayatıma olan desteğiyle başta Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ve danışmanım Prof. Dr. Meral Öncü ve Anabilim Dalı öğretim üyemiz Yrd. Doç. Dr. Dilek Bayram'a ve Anabilim Dalında beraber çalışma fırsatı bulduğumuz veya bulamadığımız araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Tezimle ilgili her türlü desteğini esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu, Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir Uğuz, Yrd. Doç. Dr. Ömer Çelik'e ve laboratuvar analizleri kısmında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Bilal Çığ, Arş. Gör. İ.Suat Övey ve Fatih şahin'e,

Tezimin yapılmasına olanak sağlayan başta Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. H. Baha Oral ve Anabilim Dalı Öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Gökhan Bayhan, Prof. Dr. Mehmet Güney ve Embriyolog Selen Birdal'a,

Emeklerinden dolayı Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeli ve yönetimine,

Bu günlere gelmemde manevi destekleri ile hep yanımda olan değerli anneme, babama ve ablama,

Hayatıma girdiği andan itibaren her durumda destekçim olan değerli eşim Ali Karatopuk'a,

Canım ve her şeyim oğullarıma...

Teşekkürlerimi sunarım.

Isparta-2014

Kerem'im ve Erdem'ime...

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	iii
ÖNSÖZ	iv
İTHAF	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnfertilite	4
2.1.1. İnfertilite tanımı	4
2.1.2. İnfertilite nedenleri	4
2.1.2.1. Ovulatuvar bozukluklar.....	5
2.1.2.2. Tubal Faktör	7
2.1.2.3. Açıklanamayan infertilite	7
2.1.2.4. Erkek faktörü ve Semen Analizi.....	7
2.1.3. İnfertilite Tedavisinde In Vitro Fertilizasyon Yöntemleri.....	8
2.1.3.1. Klasik IVF ve ICSI Yöntemi.....	8
2.2. Ovaryum embriyolojisi	11
2.2.1. Oogenezis.....	13
2.3. Ovaryum histolojisi	15
2.3.1. Ovaryum folikülleri:	16
2.3.1.1. Primordiyal Folikül.....	16
2.3.1.2. Primer Folikül.....	17
2.3.1.3. Sekonder folikül.....	18
2.3.1.4. Tersiyer Folikül (Graaf folikülü).....	19
2.3.1.5. Atretik Folikül	19
2.3.2. Ovulasyon.....	20
2.4. Apoptoz.....	21
2.4.1. Apoptoz tanımı ve tarihçesi.....	21
2.4.2. Apoptoz mekanizmaları	22
2.5. Kalsiyum İyonu (Ca ⁺²).....	25
2.5.1. Hücre İçerisine Ca ⁺² Giriş Kanalları.....	26
2.5.1.1. Voltaja Duyarlı Ca ⁺² Kanalları	27
2.5.1.2. Reseptöre Duyarlı Ca ⁺² Kanalları	27
2.5.1.3. Depolanmış Ca ⁺² Miktarına Duyarlı Ca ⁺² Kanalları.....	27

2.5.1.3.1. Transient Reseptor Potential (TRP) Üst Ailesi.....	28
2.5.1.3.1.1. TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid)	
Kanalları.....	29
2.6. Oksidatif Stres.....	32
2.6.1. Serbest Radikaller.....	32
2.6.1.1. Süperoksit Radikali (O ₂ ⁻).....	33
2.6.1.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	34
2.6.1.3. Hidroksil Radikali (•OH).....	35
2.6.2. Serbest Radikallerin Etkileri.....	35
2.6.2.1. Oksidatif Stresin Proteinlere Etkisi.....	35
2.6.2.2. Oksidatif Stresin Membran Lipidlerine Etkisi.....	36
2.6.2.3. Oksidatif Stresin Nükleik Asitlere Etkisi.....	37
2.6.2.4. Oksidatif Stresin Karbonhidratlara Etkisi.....	37
2.7. Antioksidanlar.....	38
2.7.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Gereç.....	40
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	40
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	41
3.1.3. Kullanılan ilaçlar.....	42
3.1.4. Çalışmanın yürütüldüğü laboratuvarlar.....	42
3.1.5. Çalışma Hastalarının Seçimi.....	43
3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. Grupların Oluşturulması.....	43
3.2.2. Granuloza hücrelerinin izolasyonu.....	44
3.2.3. Laboratuvar Analizleri.....	46
3.2.3.1. Hücre İçi Ca ⁺² Ölçülmesi.....	46
3.2.3.2. Hücre İçi ROS Üretimi Tayini.....	47
3.2.3.3. Kaspaz 3 ve 9 enzim aktiviteleri tayini.....	47
3.2.3.4. Apoptozis analizi.....	48
3.2.3.5. Mitokondriyal membran depolarizasyon tayini.....	48
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	48
4. BULGULAR.....	50
4.1. Gruplarda hücre içi serbest kalsiyum analizi sonuçları.....	50
4.2. Gruplarda programlı hücre ölümü (Apoptozis), kaspaz 3 ve kaspaz 9	
Sonuçları.....	53
4.3. Gruplarda hücre içi ROS analizi sonuçları.....	55
4.4. Gruplarda mitokondriyal depolarizasyon analizi sonuçları.....	55
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	62
ÖZET.....	64
ABSTRACT.....	65

KAYNAKLAR	66
ETİK KURUL ONAYI	79
HASTA ONAM FORMU.....	81
BEYAN	82
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	: Aminoasit
ADPR	: Adenozin di-fosfat riboz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi Kalsiyum İyonu
Ca	: Kalsiyum
CAP	: Kapsaisin
CAT	: Katalaz
CO₂	: Karbondioksit
CPZ	: Kapsazepin
DHR	: Dihydrorhodamine
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimethyl sülfoksit
DTT	: Dithiothreitol
EGTA	: Etilen Glikol Tetraasetik Asit
EKG	: Elektrokardiyografi
ER	: Endoplazmik retikulum
ET	: Embriyo transferi
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
Fura-2-AM	: Fura-2-acetoxymethyl ester
GIFT	: Gamet intra fallopian transfer
GnRH	: Gonadotropin serbestleştirici hormon
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HEK-293	: Human Embryonic Kidney 293 cells
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IAP	: Inhibitors of Apoptosis

ICSI	: Intrazitoplazmik sperm injeksiyonu
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
K⁺	: Potasyum iyonu
LH	: Luteinizan Hormon
LPO	: Lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
Mg⁺²	: Magnezyum iyonu
MII	: Metafaz 2
Na⁺	: Sodyum iyonu
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
nM	: Nanomolar
NMDA:	: PN-methyl-D-aspartate
NP-40	: Nonidet-P40 buffer
O₂⁻	: Moleküler Oksijen
•OH⁻	: Hidroksil radikali
OMI	: Oosit Matürasyon İnhibitörü
OPU	: Oocyte Pick-Up
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
PVP	: Polivinilpirolidin
ROCCs	: Receptor operated Ca ²⁺ channels (Reseptöre duyarlı Ca ⁺² Kanalları)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SHBG	: Sex Hormone Binding Globülin
Na₂CO₃	: Sodyum Karbonat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
SR	: Sarkoplazmik Retikulum
SRY	: Sex Determining Region Y
SOD	: Süperoksit Dismutaz Enzimi

SOCCs	: Store-operated Ca ²⁺ channels (Depolanmış Kalsiyum Miktarına Duyarlı Kalsiyum Kanalları)
TBF	: Testis Belirleyici Faktör
TRP	: Transient Reseptor Potential
TRPA	: TRP ankyrin
TRPC	: TRP konansiyal
TRPM	: TRP melastatin
TRPML	: TRP mucolipin
TRPP	: TRP polysistein
TRPV	: TRP vanilloid
VOCCs	: Voltage operated Ca ²⁺ channels (Voltaja Duyarlı Kalsiyum Kanalları)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ZIFT	: Zigot Intra Fallopian Transfer
ZP	: Zona pellusida
µM	: Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Ovaryumun genel histolojik kesitinin şematik görünümü	13
Şekil 2. Ovaryum folikülleri	18
Şekil 3. Apoptoz mekanizmaları	23
Şekil 4. TRP üst ailesinin altı alt aileden oluştuğunu gösteren şekil	29
Şekil 5. TRPV1 Kanalı Aktivasyonu	30
Şekil 6. TRPV1 Kanalları ve Apoptozis İlişkisi	31
Şekil 7. Antioksidanlar ve Serbest Radikaller	38
Şekil 8. Foliküler granuloza hücresinde apoptoz sinyalleri	39
Şekil 9. Granuloza hücrelerinde kontrol ve hasta gruplarının hücre içi serbest kalsiyum düzeyleri	49
Şekil 10. Granuloza hücrelerinde TRPV1 kanal blokürü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri üzerine etkileri.	51
Şekil 11. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokürü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri üzerine etkileri	52

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokürü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri üzerine etkileri..	52
Grafik 2. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokürü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının apoptozis düzeyleri üzerine etkileri.	53
Grafik 3. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokürü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının kaspaz 3 aktivitesi üzerine etkileri.	54
Grafik 4. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokürü kapsazepin CPZ in kontrol ve hasta gruplarının kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkileri	54
Grafik 5. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokürü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının hücre içi ROS üretimi üzerine etkileri	55
Grafik 6. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokürü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının mitokondriyal depolarizasyon oranı üzerine etkileri	56

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Semen Analizi Normal Değerleri (WHO 2010)	8
---	---

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Granuloza hücrelerinin izolasyon aşamaları.....	44
Resim 2. Oosit pick-up işlemi sırasında overin ultrasonografik görünümü.....	46

1. GİRİŞ

İnfertilite, herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl süre ile gebe kalınamama durumu olarak tanımlanmaktadır. Toplumda çiftlerin yaklaşık %10-20'sini etkileyen çok boyutlu ciddi bir problemdir. Temel olarak erkek ve kadına bağlı birçok etmen infertilite de yer almaktadır (1,2). Son yıllarda infertiliteye yönelik tedavilerde çok ciddi adımlar atılmış olmasına rağmen elde edilen başarı oranları istenilen seviyeye ulaşamamıştır. Üremeye yardımcı tedavilerde başarı oranlarını artırma yolundaki araştırmalar ise halen sürmektedir (3).

İnfertilite tedavisinde, üremeye yardımcı tedaviler kullanılarak kontrollü over hiperstimülasyonu yapıldığı halde, ovulatuvar bozukluklardan PCOS halen en sık karşılaşılan problemlerden biri iken (4) erkek infertilitesi oranları ise günden güne artmaktadır (5).

Granuloza hücreleri, ovaryan folikülün somatik hücrelerini oluşturur. Oosit kalitesinin dışı fertilitesi üzerinde anahtar bir rolü vardır. (6-10). Oositler folikül içerisinde olgunlaşıp geliştiklerinden granuloza hücreleri ile karşılıklı ve yoğun bir etkileşim içindedir (6-14).

Hücreyel birçok işlevin yerine getirilmesinde iyonlar temel olarak görev almaktadır. İkincil haberci olan kalsiyumun evrenselliği, birçok hücreyel reaksiyonda üstlendiği görevden kaynaklanmaktadır. Çok kısa sürelerde değişen bu iyon dengesi ise kalsiyum sinyalini oluşturmaktadır.

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen "Apoptoz" birçok araştırma sonucunda tanımlanabilmiştir. Bu konuda birçok araştırmacı apoptozun düzenlenememesinin birçok insan patolojisi ve infertiliteye neden olduğunu saptamıştır (15).

Fagositik aktivite ve mitokondriyal fonksiyon gibi normal fizyolojik şartlar altında hücreyel reaksiyonlar sonucunda oluşan serbest radikaller, ROS olarak

adlandırılmaktadır. Birçok antioksidan tamponlama mekanizması tarafından etkisiz hale getirilebilmekte iken dengenin bozulması ise oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Katyon kanalları aktivasyonu yoluyla sitozole akan Ca^{+2} iyonları mitokondride porların açılarak depolarizasyonu neden olarak ROS üretiminin daha da artmasına neden olmaktadır. Bu artan ROS TRPV1 ve voltaja duyarlı kalsiyum iyon kanallarını daha fazla açarak hücre dışından içine Ca^{+2} akışına neden olmaktadır. Bu zincirleme olaylar ya hücrelerin çalışmasını zorlaştırmakta veya hücreleri apoptozise götürmektedir (16, 17). Bütün bu patofizyolojik olaylarda oksidatif stres, kaspaz aktiviteleri, apoptozis, mitokondriyal depolarizasyon oranlarında değişiklikler gözlenmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, granuloza hücreleri ve oositler arasındaki kanalların, sadece metabolit transferinde önemli olmadığını, aynı zamanda oositin mayotik duraklamasının sürdürülmesinde de önemli rol üstlendiğini göstermektedir. Bu kanalların önemi ise günden güne artmaktadır (4, 18, 19, 20).

Çeşitli araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda granuloza hücrelerindeki apoptotik cisimlerin bulunmasının IVF başarısında kötü prognozun belirlenmesinde prediktif olabileceğini bildirmiş ve hamile olan grupta apoptotik granuloza hücre indeksi 0;01 den düşük bulmuşlardır (11, 21-25)

Yapılan bazı çalışmalarda infertilite de ROS üretiminin arttığı bildirilmiştir. Granuloza hücrelerinin antioksidanları üreterek oositi ROS'ların zararlı etkilerinden koruduğu belirlenmiştir. Çeşitli araştırmacılar yardımcı üreme tekniklerinde elde edilen başarı oranlarının gamet ve embriyo kalitesi tarafından etkilendiğini, foliküler sıvı ve granuloza hücrelerinin oositle yakın ilişkide olduklarından bunların incelenmesi ile elde edilen sonuçlar IVF başarısını tespit etmede kullanılabileceğini rapor etmiştir. Örneğin granuloza hücrelerindeki geliştirilmiş ROS üretimi düşük oosit fertilizasyon kabiliyeti, düşük embriyo kalitesi ve azalmış implantasyon oranları ile ilişkili bulunmuştur. Sonuçta oksidatif stres üreme ve gelişme patolojisi ile ilişkili gibidir. Granuloza hücrelerindeki antioksidan enzimler oosit maturasyonunu düzenler ve yardımcı üreme tekniklerindeki başarı oranları ile ilişkilidir. Üreme ve fertilizasyonun düzenlenmesinde ROS ve antioksidanların önemi dikkate alınmalıdır (26-31)

Ayrıca çeşitli araştırmacılar kalsiyumun granuloza hücrelerinde mayozun ilerlemesi ve devamı ile maturasyon ve döllenmede etkili olduğu düşünceler de ek çalışmalara ihtiyaç bulunduğunu belirtmişlerdir (32-36).

Yaptığımız literatür çalışmalarında TRPV1 aracılı kalsiyum girişini granuloza hücrelerinde gösteren bir çalışmaya rastlamadık ancak Shukla ve ark (2012) çeşitli katyon kanallarının sperm fizyolojisi ve fertilitate de etkili olduğunu bunlardan bir tanesinin de TRP kanalı olduğunu söylemiştir. Benzer şekilde PCOS hastalarında kalsiyum sinyalinin TRPV1 kanalı yoluyla etki gösterdiğini bildirmişlerdir (37).

Tez çalışmamda farklı infertilite nedenleri ile IVF sikluslarında tedavi gören hastalardan elde edilen granuloza hücrelerinde, oksidatif stresin, kalsiyum sinyalinin, apoptoz ve apoptotik yolların nasıl etkilendiğini ve TRPV1 kanallarının etkisinin olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

2.1.1. İnfertilite tanımı

İnfertilite, bir yıllık korunmasız ilişki sonrasında gebelik olmaması olarak tanımlanmaktadır. Daha önce hiç gebelik olmamışsa primer infertilite, daha önce canlı doğumla sonuçlanmış veya sonuçlanmasın en az bir gebelik olmuşsa sekonder infertilite olarak sınıflandırılabilir. İnfertil çiftlerin yaklaşık %30'unda primer erkek faktörü vardır, % 20-30'unda ovulatuvar bozukluklar, %20-30 tubal peritoneal patoloji ve geriye kalanı nedeni açıklanamayan infertilite vakalarını kapsar. Yine yaklaşık % 20-30'unda erkek faktörü ile birlikte kadına bağlı faktörler bulunur (38-41).

Bir menstrüel siklusta, gebe kalabilme olasılığına fekundabilite, bir siklusta canlı doğum olma olasılığına ise fekundite denir. Genç sağlıklı çiftlerde, her ovulatuvar siklus başına gebe kalabilme şansı, yani fekundabilite % 20-25 iken, kadın yaşı arttıkça fekundabilite de düşer. Birinci yılın sonunda çiftlerin % 85-90 nın da gebelik gerçekleşir. İnfertilite, üreme çağındaki çiftlerin % 10-15' inde görülür (5, 42, 43).

2.1.2. İnfertilite Nedenleri

Her iki cinste de üreme sistemlerinin temel işlevi, kadın ve erkek gamet hücrelerinin üretilmesi ve üreme hormonlarının salgılanmasıdır. Bu iki temel

mekanizmanın kusursuz olarak işlevini yerine getirebilmesi için her iki cinstede normal genetik yapının varlığı, iyi çalışan sağlam ve fonksiyonel bir hipotalamus ve hipofiz, kadınlarda overlerin varlığı ve işlevsel oluşu ile Müller kanalından gelişen fallop tüpleri, uterus ve yine Müller kanalı ve ürogenital sinüsten köken alan vajen ile normal dış genital organların varlığı, erkeklerde skrotum içerisine yerleşmiş testisler, Wolf kanalından gelişen yapıların (epididim ve Vaz deferens) normalliği, yardımcı salgı bezlerinin (seminal veziküller, prostat ve bulboüretal bezler) çalışıyor olması ve fonksiyonel bir penis gerekmektedir (5, 44).

Üreme işlevinin kusursuzca çalışabilmesi hem kadın hem erkekte tüm bu anatomik, hormonal ve fizyolojik sistemlerin bir ahenk içerisinde çalışıyor olmasına bağlıdır. Aksine bir durum, üreme işlevinde bozulma yani infertilite olarak karşımıza çıkar.

Kadına ait infertilite nedenleri

- Ovulatuvar bozukluklar
- Tubal/Peritoneal faktörler
- Servikal ve immünolojik faktörler
- Uterin faktörler
- Diğer (5, 45, 46).

Erkeğe ait infertilite nedenleri

- Endokrin hastalıklar
- Anatomik bozukluklar
- Anormal spermatogenez
- Anormal motilite (5, 45, 46).

2.1.2.1. Ovulatuvar bozukluklar

Kronik anovulasyonun % 80 nedeni olan Polikistik Over Sendromu ilk olarak 1935 yılında Irving F. Stein ve Michael L. Leventhal tarafından amenore,

anovulasyon ve büyük polikistik overlerle karakterize semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır (5, 47)

Polikistik over, makroskopik olarak normal over büyüklüğünün 2-5 katı kadardır. Gros olarak beyaz bir kapsülle çevrilidir. Aynı sayıda primordiyal folikül vardır, ancak gelişen ve atreziye giden folikül sayısı iki kat artmıştır. Mikroskopide yüzeyel korteks, fibrotik ve hiposellülerdir ve damarları içerir. Küçük atrofik foliküllere ilaveten, artmış sayıda luteinize teka interna içeren foliküller de vardır (48). En dıştaki tunika kalınlığı 1/2 kat, kortikal stroma 1/3 kat, subkortikal stroma 5 kat artmıştır. Stromadaki artış, hem teka hücre hiperplazisine hem de aşırı folikül atrezisine bağlıdır. Over hilus hücre toplulukları normalden 4 kat fazladır (Hugheston 1982).

Normal kadınlarla karşılaştırınca sürekli anovulasyonu olan Polikistik Over Sendromu (PCOS)'lu olgularda, Luteinizan hormon (LH) konsantrasyonu daha yüksek, Folikül uyarıcı hormon (FSH) konsantrasyonu ise düşük veya normalin alt sınırındadır (50). Yüksek LH ve düşük FSH şeklindeki gonadotropin tablosunun Gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) salgısının frekansında artış sonucunda hipofizde kısmi duyarlılık kaybına bağlı olması da mümkündür (51). Hipofiz ve hipotalamustaki duyarlılık artışına, östrojen düzeylerinde yükselmenin neden olduğu düşünülmüş, fakat son zamanlarda seks hormonu bağlayan globulin (SHBG) konsantrasyonunda azalmanın da bu konuda etkin bir faktör olduğu bildirilmiştir. LH düzeyinde yükselme de serbest östradiyol düzeyindeki yükselme ile pozitif bir bağlantı gösterir. FSH düzeyi tam supresyona uğramadığından sürekli olarak yeni foliküller gelişmekte ancak tam olgunluğa erişememekte ve ovulasyon olmamaktadır. Böylece bazen 15mm'ye dek büyüeyebilen, çoğunlukla 2-8 mm çapında olan çok sayıda folikül kistleri oluşmaktadır (5).

Atrezi sırasında granuloza tabakasında dejenerasyon oluşmamaktadır. Yine atrezi sırasında overin stroma bölümüne katkıda bulunan teka hücreleri varlığını sürdürmekte ve bu teka hücreleri androjen salgılamaya devam etmektedir. Artmış LH düzeyine cevap olarak androjen salgısı hızlanır. Daha sonra kısır döngü ile yükselmiş androjen düzeyleri ekstraplandüler olarak androjenden östrojene dönüşümü arttırır,

SHBG sentezi baskılanır. Sonuçta östrojen düzeyinde yükselmeye neden olur. SHBG'de azalma, serbest testosteronda iki kata yakın bir artışa neden olmaktadır (5).

2.1.2.2. Tubal Faktör

İnfertil çiftlerin % 30-35'inde görülür. Laparoskopik adezyolizis sonrası, ilk bir yıl içersinde, gebelik şansı % 50, hafif dereceli distal oklüzyonlarda gebelik şansı %80, orta dereceli oklüzyonlarda % 30, ciddi oklüzyonlarda ise % 15 dir. Distal tubal oklüzyonların prognozunu belirleyen adezyon dışındaki faktörler, tubal kalınlık ve ampuller mukozal yapıdır. Birçok gebelik cerrahiden sonraki iki yıl içinde gerçekleşir.

2.1.2.3. Açıklanamayan infertilite

İnfertil çiftlerin % 10-15'inde görülür. Bu hastalar, normal semen ve normal ovulatuvar fonksiyona sahip, normal uterus yapısı ve bilateral tubal açıklığı olan hastalardır. Bu hastalarda siklus fekunditesi (çiftin fertilite potansiyeli) % 2-4 tür. Tedavi siklus fekunditesini arttırmaya yöneliktir (52).

2.1.2.4. Erkek faktörü ve Semen Analizi

İnfertil çiftlerin yaklaşık % 20-30'unda primer erkek faktörü vardır. % 20 ila 30'unda ise ortak faktörler söz konusudur. Ayrıca erkek faktör değerlendirilmesinde sperm analizi büyük önem taşımaktadır. Üç günlük koitus yasağından sonra erkekte masturbasyon yöntemi ile alınan spermler, ejakulatın volumüne, viskositesine,

spermlerin sayısına, morfolojisine ve motilitesine göre değerlendirilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2010 yılı kriterlerine göre normal semen parametrelerine sahip bir erkeğin değerleri aşağıdaki tablodaki gibidir (5, 45, 46, 53)

<u>Parametre</u>	<u>WHO 2010</u>
1. Miktar (volüm)	1.5 ml
2. ph	≥ 7.2
3. ml de sperm sayısı (konsantrasyon)	≥ 15 milyon/ml
4. Total sperm sayısı	≥ 39 milyon/ml
5. Hareketlilik (motilite)	%40
6. Şekil (morfoloji)	≥ 4
7. Canlılık	≥ 58
8. Lökosit	≤ 1 milyon/ml

Tablo 1. Semen Analizi Normal Değerleri (WHO 2010) (54)

2.1.3. İnfertilite Tedavisinde In Vitro Fertilizasyon Yöntemleri

Gebelik sonuçlarını artırmak için oosit, sperm ve embriyonun manipüle edilebileceği birçok teknik tanımlanmıştır. Bunlar gamet intra fallopian transfer (GIFT), zigot intra fallopian transfer (ZIFT), in vitro fertilizasyon (IVF) ve embriyo transferi (ET) ve intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) prosedürlerini içermektedir. Bunlardan en çok kullanılanları ilk kez 1970 yılında gerçekleştirilen IVF-ET, ilk kez 1992’de bildirilen ve son yıllarda popülarite kazanan ICSI uygulamasıdır.

2.1.3.1. Klasik IVF ve ICSI Yöntemi

IVF prosedürü için toplanan semen, swim up ya da gradient santrifuj yöntemleri ile işleme tabi tutulur. Ardından spermier proteinle desteklenmiş ortamda kapasitasyonu gerçekleştirilmesi için 4 saate kadar inkübe edilir. Ovum başına en az 100.000 kapasite olmuş sperm ovumla beraber inkübe edilir ve 18 saat kadar sonra oositler fertilizasyon açısından incelenir (55).

Düşük sperm sayısında, sperm motilitesi az ve morfolojisi bozuk olduğunda klasik IVF başarısız olur (56). Bu durumda bir ovumun fertilizasyonu için sadece fonksiyonel bir genomu ve sentrozomu olan bir spermatozoa yeterli olduğu ICSI işlemi kullanılmaktadır. Böylece kapasitasyon, hiperaktivasyon, zona pellusida (ZP) ve oolemmannın tanınması ve geçilmesi safhaları atlanmış olmaktadır. ICSI ile immotil ve vital olmayan spermatozoa ile fertilizasyon oranları düşmektedir. Bunun dışında konsantrasyon morfoloji (globozoospermi dışında) ve yüksek antisperm antikor konsantrasyonları ICSI başarısını etkilememektedir.

ICSI için öncelikle oositler ön inkübasyon için 37°C ve %5 karbondioksitli (CO₂) ortamda 1 ile 3 saat arasında bekletilmektedir. ICSI işlemi uygulanacak petriier hazırlanmakta, bu petriierin içinde, içine oosit konulan her biri 5 µl'lik 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) tamponlu damlalar hazırlanmakta, damlaların yanına polivinilpirolidin (PVP) içeren diğer bir damla daha eklenmektedir. PVP damlacığı spermier için eklenmektedir. Damlaların üzeri CO₂ ile dengelenmiş mineral ve yağ ile örtülmektedir.

Hazırlanan petri kapları inkübatöre konulmakta, ön inkübasyona alınan oositler enzimatik (hyaluronidaz) ve mekanik yollarla denüstasyon işlemine tabi tutulmaktadır. Denüstasyon işlemi ile oositler kumulus ve korona hücrelerinden arındırılmaktadır. Bu işlemin yapılmasında iki amaç vardır. Birincisi oositin etrafındaki hücrelerin işlem sırasında ICSI pipetini tıkamasına engel olmak, ikincisi ise oosit matürasyonunun tam olarak tespit edilebilmesini sağlamaktır. Bu işlem yapılmaksızın oosit etrafında bulunan kumulus hücreleri, görüntünün net olarak

izlenmesini engellemektedir. Çıplak bırakılmış oositlerin ZP'leri, germinal vezikül ve ilk polar cisimcikleri, perivitellin aralıkları incelenerek oosit kalitesi değerlendirilmektedir. ICSI işleminde haploid kromozoma sahip, 1. polar cisimciği gözlenebilen metafaz 2 (MII) oositler kullanılmaktadır. PVP içine zenginleştirme işlemi yapılan spermier konmakta, HEPES tamponlu damlalara da tek tek dendasyon işlemi yapılmış olan oositler konmaktadır.

OPU işleminde yaklaşık 4-6 saat sonra ICSI pipeti ile sperm kuyruğuna hafif bir bası oluşturularak immobilizasyon sağlanmaktadır. Sperm immobilize edilip pipet içine alındıktan sonra içinde oosit bulunan damlaya gidilmekte ve polar cisme mümkün olduğu kadar uzak bir noktadan oolemma delinerek ooplazmanın ortasından bir miktar alınarak manipüle edilmekte daha sonra sperm yavaş bir ekspirasyon ile verilmektedir.

Fertilize olmuş oositin ilk değerlendirilmesi ICSI işleminde 16-18 saat sonra yapılmaktadır. Yapılacak ilk inceleme pronkleuslar ve kutup cisimciklerinin varlığı ve morfolojileri üzerine olmaktadır. Transfer edilecek embriyonun seçiminde en önemli kriterlerden birisi blastomer sayısının gün ile uyumudur. İkinci gün kontrollerinde 2 ila 4 blastomerli embriyolar oluşmuş olmalıdır. Blastomerlerdeki nükleer fragmantasyonun <%20 olması iyi kalitede embriyo olarak adlandırılmaları için gereklidir.

Ancak fragmantasyonun hiç olmaması kalitenin çok daha iyi olduğu şeklinde değerlendirilebilmektedir. Vakuolzasyonun bulunması değerlendirmede negatif kriterler arasında bulunmaktadır. ZP'nin kalınlığı normal, rengi açık olmalı, perivitellin aralıkta debris bulunmamalıdır. nc gün yapılacak kontrollerde blastomer sayısının en az 7 veya 8 olması beklenmektedir. Gelişimi çok iyi olan embriyolarda üçüncü günün sonunda kompaktlaşmanın başladığı görülebilir. Bu tür embriyoların gelişim potansiyeli ve başarılı implantasyon oranı fazladır. Dördüncü gün blastomerler arası bağlantı kompleksleri oluşmakta, beşinci gün blastomerlerin arasında sıvı birikerek blastokist oluşmaktadır. Blastokistteki sıvı boşluğunun genişlemesi ile birlikte blastomerler iki farklı hücre grubunu oluşturmaktadır. ZP'nin altını çevreleyen hücre grubuna trofoblast denir. Merkezi olarak yerleşen blastomer grubuna i hücre kitlesi adı verilir. Fetus i hücre kitlesinden meydana

geleceğinden dolayı embriyoblast adı da verilmektedir. Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde blastosel yapısı, iç hücre kitlesi, trofoblast hücrelerinin yapısı göz önünde bulundurulmaktadır. İç hücre kitlesinin değerlendirilmesinde hücrelerin sıkıca ve bir arada olması embriyo kalitesinin olumlu olduğunu gösterir. Trofoblastik doku çok sayıda hücre ve sıkı epitelyum içermelidir. Blastokist boşluğunun da büyük olması implantasyon oranlarını artırmaktadır.

2.2. Ovaryum embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak döllenme sırasında belirlenmiş olmasına karşın, gonadlar gelişimin 7. Haftasına değin erkek ya da dişi yapısal özelliğe sahip değildir (57).

Cinsiyetin farklılaşması çok sayıda genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Sex Determining Region Y (SRY, Y kromozomunun üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge) kromozomunun kısa kolunda (Yp11) bulunur ve cinsiyet belirleyicisidir. Bu genin protein ürünü olan transkripsiyon faktörü, gelişmemiş durumdaki üreme organlarının cinsiyetini belirleyen genleri harekete geçirir. SRY geni Testis Belirleyici Faktör'dür (TBF). Bu faktörün var olması durumunda fetusun cinsiyeti erkek, yokluğunda ise kızdır (57).

Gonadlar başlangıçta sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş bir çift genital ya da gonadal kabartılar şeklinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına kadar bu kabartılar içinde üreme hücreleri görülmez (57,58).

İlkel (primordiyal) üreme hücreleri, gelişimin 2. haftasında primer embriyonik ektodermden (epiblast) köken alırlar. Daha sonra epiblasttan ayrılarak ameboid hareketlerle vitellus kesesinin ekstraembriyonik yapılarına göç ederler. Başlangıçta embriyonun kaudalinde yerleşik ekstraembriyonik mezoderimde görülürler, sonra vitellus kesesi duvarı endoderminde izlenirler. Gelişimin 4. haftasında son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. hafta başında ilkel gonadlara ulaşırlar. 6. haftada ise genital kabartılara yerleşirler. İlkel üreme

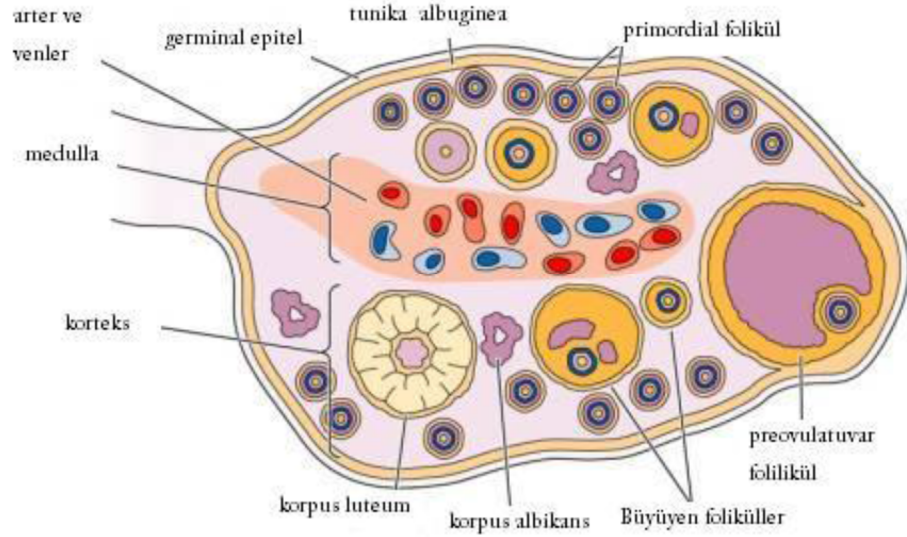
hücrelerinin izlediği bu yola germ çizgisi (hattı) denir. İlkel üreme hücreleri açık renk sitoplazmaları ve oval şekilleriyle ayırt edilirler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum ya da testise farklılaşmalarında ilkel üreme hücrelerinin tetikleyici etkisi vardır (57,58).

İlkel üreme hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartının epitelı çoğalır ve epitel hücreleri altındaki mezenşimin içine gömülürler. Burada ilkel cinsiyet kordonları olarak adlandırılan düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Erkek ve dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede erkek ya da dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilmesi olanaksızdır. Bu nedenle bu evreye farklılaşmamış evre, bu gonada da farklılaşmamış gonad denir (57).

XX kromozomları ovaryumun gelişimi için genler içerir. 10. haftaya kadar ovaryumlar histolojik olarak ayırt edilmezler. XX kromozomlarına sahip dişi embriyolarda, ilkel cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır. İlkel üreme hücresi grupları içeren bu kümeler, daha çok ovaryumun medullar bölgesinde yerleşmişlerdir. Bu hücre kümeleri bir süre sonra kaybolarak yerlerini damarlı stromaya (medulla) bırakırlar (57, 58). Dişi gonadın yüzey epitelı, erkek gonadın aksine çoğalmayı sürdürür. 7. haftada yüzey epitelinden köken alan hücre kordonları alttaki mezenşim içine gömülür. Bunlar yüzeye yakın yerleşirler ve ikincil kordonlar olarak adlandırılırlar.

4. ayda, bu kordonlar bir ya da daha çok sayıda ilkel üreme hücresini çevreleyen izole hücre toplulukları haline gelirler. Bu üreme hücreleri zamanla oogonyumlara dönüşürken yüzey epitelinden aşağıya göç eden ve üreme hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden de foliküler hücreler oluşur (57, 58). Germ hücreleri göçleri sırasında bir yandan da çoğalırlar. Bunlar spermiyum ve oositlerin öncülleridir. 6. haftanın sonunda mitoz bölünmeyle çoğalan hücrelerin sayıları kadardır (59, 60). Ovaryum farklılaşmasının ilk belirtileri 6 ile 8. haftalar arasında germ hücrelerinin hızla mitotik bölünmesidir. Bu bölünme sonucunda 16 ile 20. haftalar arasında yaklaşık 6-7 milyon oogonyum oluşur. Bu evreden başlayarak ovaryumun üreme hücre sayısı geri dönüşümsüz azalır ve yaklaşık 50 yıl sonra da

tüm oosit içeriği tükenir. 20’li yaşlarda 104.000, erken 30’lu yaşlarda 33.000 düzeyine inen folikül ve oosit sayısı 40’lı yaşlarda 7900’e kadar düşer (59).



Şekil 1: Ovaryumun genel histolojik kesitinin şematik görünümü (61)

2.2.1. Oogenezis

İlkel üreme hücreleri, dişi gonada ulaşır ulaşmaz genetik olarak oogonyumlara farklırlar. Ardı ardına geçirdikleri mitotik bölünmelerle çoğalan oogonyumlar 3. ayın sonunda kümeler halinde dizilir, yassı epitel hücreleriyle çevrenirler. Yassı epitel hücreleri folikül hücreleri olarak isimlendirilirler ve ovarium yüzey epitelinden köken alırlar. Bir küme içindeki oogonyumların tümü, tek bir ilkel üreme hücresinden gelişir (57). Oogonyumların çoğunluğu mitozla bölünmeyi sürdürürken, bir kısmı bölünmesini I. Mayoz bölünmenin profaz evresinde durdurarak primer oositlere farklırlar. Bundan sonraki birkaç ay içinde oogonyumların sayısı hızla artar. Gelişimin 5. ayında ovarium içindeki germ hücrelerinin sayısı ortalama 7 milyona ulaşır. Bu evreden sonra hücre ölümü başlar.

Çok sayıda oogonyum ve primer oosit atretik hale gelir. 7. ayda yüzeye yakın yerleşmiş birkaç oogonyum dışında çoğu dejenere olur. Hayatta kalan primer oositlerin tümü I. Mayoz bölünmenin profaz evresine girerler ve her biri tek sıra yassı folikül hücre katmanıyla çevrenirler. Primer oosit, çevresindeki yassı epitel hücreleriyle birlikte primordiyal folikül adını alır (57). Doğuma yakın evrede primer oositlerin tümü I. Mayoz bölünmenin profazının diploten evresindedirler. Primer oositler puberteye değin dinlenme evresinde kalırlar ve birinci mayoz bölünmelerini tamamlamazlar. Bu süre boyunca oosit olgunlaşması folikül hücrelerince salgılanan oosit matürasyon inhibitörü (OMI) ile baskılanır. Doğumda ovaryumlardaki primer oosit sayısı 700 bin ile 2 milyon arasında değişir. Puberteye değin bunların büyük çoğunluğu atretik hale geldiğinden, puberte başlangıcındaki bu sayı 400.000' e düşer ve 500'den daha azı bir kadının üreme döngüsü içinde ovulasyonla atılır. Diğerleri çeşitli gelişim evrelerinde dejenere olup atretik hale gelir. Geç olgunlaşan oositlerin bazıları 40 yıl süresince I. Mayoz bölünmenin profaz evresinde bekler (57-59).

Puberteye gelindiğinde dişi gonad primordiyal foliküllerden beslenen bir folikül havuzuna sahip olmuş durumdadır. Her ovaryal döngüde bu havuzdan seçilen 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordiyal folikül, primer (preantral), sekonder (antral) ve Graaf (tersiyer, preovulatuvar) olarak adlandırılan 3 aşamadan geçerek olgunlaşmaya başlar. Bunlar arasında en uzun olanı antral folikül evresidir. Preovulatuvar evre yaklaşık 37 saat sürer. I. Mayoz bölünmenin diploten evresinde dinlenme aşamasında olan primer oosit büyümeye başlar. Bekleme evresinden çıkan bu foliküllere primer folikül denir ve bunlar iki tiptir:

1. Tek katmanlı primer foliküller: Bunların çevresinde tek sıralı kübik foliküler hücreler bulunur.

2. Çok katmanlı primer foliküller: Çok sıralı folikül hücre katmanıyla çevrilidirler. Foliküler hücreler, kendilerini ovaryum stromasından ayıran bir bazal lamina ile desteklenir.

Primer folikül evresinde primer oosit ZP denilen glikoprotein bir kılıf sentezlemeye başlar. ZP folikül hücrelerini oositten ayırır. Foliküler hücrelerin ince sitoplazmik uzantıları ZP'yi deler ve oositin mikrovilluslarıyla ilişki kurar. İlişki bölgelerinde oluklu bağlantılar bulunur (58, 57, 62). Bunu izleyen evrede folikül

hücreleri sürekli olarak çoğalıp çok katmanlı folikül hücrelerini oluştururlar. ZP kalınlaşır. Folikülü çevreleyen stromal hücreler, teka (kılıf) denilen hücresel bir kılıf oluşturulacak şekilde düzenlenirler. Teka katmanı daha sonra iki tabakaya ayrılır: (1) Teka interna (iç kılıf) (2) Teka eksterna (dış kılıf). Gelişmekte olan folikülün bazal laminasına komşu, iyi damarlanmış teka interna katmanı hücreleri steroid salgı oluşturur. Teka eksterna ise kapsül benzeri bir bağ dokusu katmanıdır ve ovaryumun stroması ile karışır. Bu hale gelen folikül sekonder foliküldür (62).

Foliküler hücreler arasında, küçük hücreler arası boşluklar Call-Eksner cisimcikleri görülür. Bu aralıklar foliküler sıvı içerir ve daha sonra birleşerek, daha büyük bir boşluk olan folikül antrumunu yapar. Antrumun oluşmasıyla, foliküler hücreleri primer oosit çevresinde yeniden düzenlenirler. Oosit ile folikül duvarı arasında bulunan bir grup foliküler hücre kümesine kumulus ooforus denir. En büyük folikül, olgun foliküldür. Buna Graaf folikülü ya da preovulatuvar folikül denir. 15-20 mm çapındadır. Ovulasyondan hemen önce primer oosit, folikül içinde eksentrik bir konum alır. Primer oosit ZP'ye sıkıca yapışmış ve korona radiata denilen tek sıralı kübik ya da prizmatik foliküler hücrelerle çevrilidir (62). Ovulasyondan birkaç saat önce I. Mayoz bölünme tamamlanır. Bunun sonucunda sekonder oosit ve birinci kutup cismi oluşur. Birinci kutup cismi perivitellin aralık denilen ZP ile oosit arasındaki aralığa atılır. I. Mayoz bölünmenin tamamlanmasından hemen sonra ve sekonder oositin çekirdeği dinlenme evresine geçmeden önce, DNA eşleşmesi olmaksızın hücre II. Mayoz bölünmeye girer. II. Mayoz bölünme ancak oosit II bir spermiyumla döllenirse tamamlanır. Döllenme olmazsa ovulasyondan 24 saat sonra oosit II dejenere olur. Ovaryumda oogonyumlardan oosit II oluşuncaya kadar gerçekleşen değişimlere oogenezis denir (57, 58, 62).

2.3. Ovaryum histolojisi

Ovaryum tek katlı yassı epitelden alçak boylu kübik epitele değin değişkenlik gösteren bir epitel ve epitelin hemen altındaki tunika albuginea denilen bir bağ dokusu katmanıyla çevrelenmiştir. Enine kesitlerde dışta korteks (kabuk), içte

medulla (öz) birbirinden kesin bir çizgiyle ayrılmaz. Korteks katmanı oldukça kalındır. Bağ dokusu ve çeşitli gelişim evrelerinde folikülleri içerir (62). Medulla kollajen demetlerden ve elastik lif ağlarından zengin sıkı bağ dokusudur. Medullada kan ve lenf damarları, kalın sinir demetleri ve hilus yakınında birkaç düz kas hücresi izlenir (63).

Korteks stroma ve stromada yerleşik çeşitli gelişim evrelerindeki ovaryum foliküllerinden oluşur. Stroma kollajen ve elastik lifler ile retiküler lif ağları ve iğ biçimli bağ dokusu hücrelerinden yapılmıştır. Korteksin bu intersitisyel bağ dokusu, germinal epitel altında sıklaşarak tunika albuginea'yı oluşturur. Kortekste stroma içinde çeşitli gelişim evrelerinde foliküller yerleşmiştir. Ovaryum folikülleri ortada iri bir germ hücresi (oosit) ile bunu çevreleyen folikül epitelinden oluşan yapılardır (63).

2.3.1. Ovaryum folikülleri:

Yenidoğan bir çocuğun her iki ovaryumunda toplam 400.000 adet folikül bulunur. Bunlar 40 mikron çapında yuvarlak oluşumlardır ve iri bir oosit ile bunu çevreleyen yassı folikül epitelinden oluşmuştur. Bunlara primordiyal foliküller denir. Her 28 günde bir ovaryumlardan bir oosit atılır. Bir kadının üreme süreci 30-40 yıl sürer. Bu süre içerisinde yaklaşık 450 oosit atılır (63).

2.3.1.1. Primordiyal Folikül

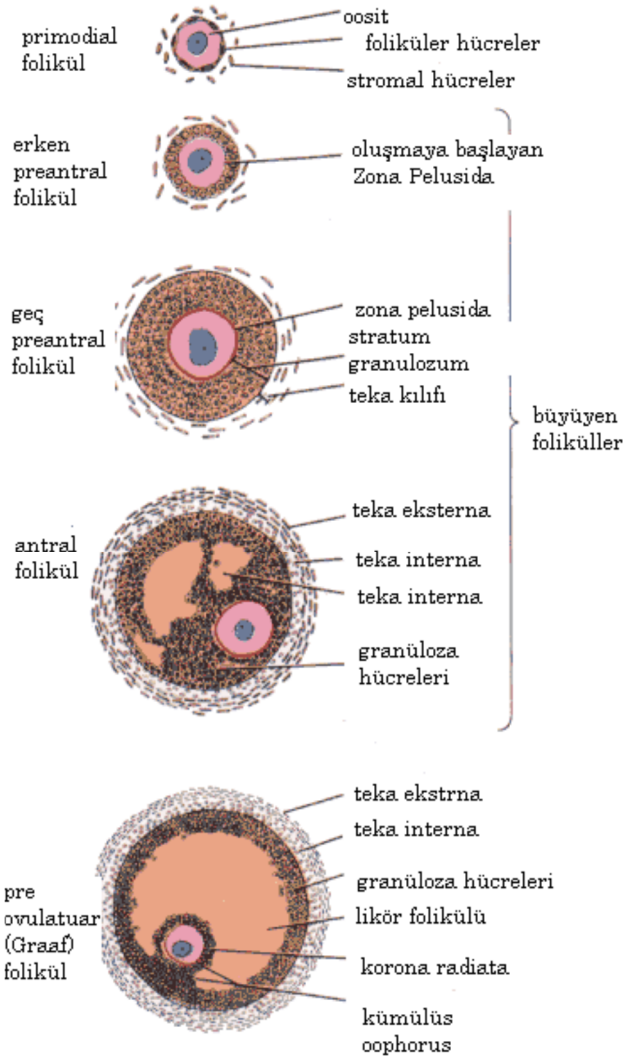
Foliküllerin gelişiminde ilk fiziksel belirtiler oositin büyümesi ve granuloza hücrelerinin görünümündeki değişikliklerdir. Primordiyal foliküller fetal yaşam sırasında oluşan tek sıralı yassı folikül hücreleriyle çevrili primer oositleri içerir. Primer oositler organellerden zengindirler. Çok sayıda mitokondriyon, gelişmiş

Golgi kompleksi, granüllü endoplazmik retikulum ve birkaç ribozom içerirler. Primordiyal foliküller korteksin en üst katmanında yer alırlar. Sayıları artmaz ancak büyüyüp gelişirler ve çoğu da dejenere olur (64-66).

2.3.1.2. Primer Folikül

Pubertenin başlamasıyla, her menstrual döngüde 5- 15 arası primordiyal folikül olgunlaşmaya başlar. Büyümenin ilk işareti yassı folikül epitel hücrelerinin kübikleşmesidir. Bu aşamada folikül tek tabakalı (unilaminar) primer folikül adını alır. İlerleyen aşamalarda folikül hücrelerinin çoğalmasıyla çok tabakalı (multilaminar) primer folikül oluşur. Çoğalan folikül hücreleri de granuloza hücreleri adını alır. Granuloza hücreleri ile oosit arasında oluklu bağlantılar (neksus) oluşur. Bunlar besleyici maddelerin, iyonların ve düzenleyici moleküllerin geçişine olanak sağlar (63-66). Granuloza hücreleri çoğalırken çevredeki stroma hücreleri de folikülü bağ dokusundan oluşmuş bir kılıfla sararak teka folikülü katmanını oluşturur. Teka katmanı geliştikçe iki tabakaya ayrılır. İçte teka interna denilen oldukça damarlı, kübik salgı hücrelerinden oluşan kat yer alır. Bu kübik hücreler farklılaşarak steroid hormon üreten hücrelere dönüşürler. LH reseptörü taşıyan hücreler östrojen öncülü androjenleri salgırlar. Teka interna katmanı fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük damarlardan oluşur. Dışta bulunan diğer kat teka eksternadır. İçerdiği kollajen demetler ve düz kaslarıyla daha çok bir kapsül görevi görür. Teka eksterna katmanı ile ovaryumun stroması arasındaki sınır tam olarak belirgin olmamasına karşın teka interna ile granuloza katmanı arasındaki sınır burada bulunan bazal lamina (membrana limitans eksterna) ile oldukça iyi belirlenmiştir (66).

Oosit ve granuloza hücreleri, folikül gelişimi sırasında kendi çevresinde, glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin bir katman olan zona ZP'yi oluşturur. ZP, homojen, asidofilik, periodic acid schiff (PAS (+)) ve oldukça iyi boyanan jel kıvamında bir yapıdır. ZP ZP1, ZP2 ve ZP3 denilen farklı glikoproteinden oluşur (66).



Şekil 2: Ovaryum folikülleri (61)

2.3.1.3. Sekonder folikül

Büyümeyle sürdüren folikül içinde sıvı dolu boşluklar (antrum) oluşur. Kısa sürede boşluklar birbirleriyle birleşerek yarım ay şeklinde folikül antrumunu şekillendirir. Foliküler boşluğu dolduran sıvı kan damarlarından plazmanın sızmasıyla oluşup yerel salgıların metabolik ürünleri ile değişmiş hale gelir. Boşluk oluşuktan sonra folikül sekonder (antral) folikül adını alır (62, 65, 66). Sekonder

folikülün granuloza hücrelerinin çoğalması hipofiz bezinin ön lobundaki bazofil hücrelerinden salınan FSH'a bağlıdır. FSH'ın etkisi altında granuloza hücrelerinin sayısı artar ve hücrelerarası boşluğa folikül sıvısı birikir. Bu sıvı glikozaminoglikan, proteoglikan ve hormon bağlayıcı proteinler içeren kan plazması benzeridir. Folikül sıvısı hormonlardan progesteron, östradiol, inhibin, follistatin ve FSH ile LH salınımını düzenleyen aktivin içerir (65, 66). Granuloza katmanı oositi çevreleyen bölge dışında her yerde aynı kalınlıktadır. Antrumda kenarda yerleşik oosit çevresinde ise granuloza hücreleri daha yoğun bir şekilde birikerek bir tepecik oluşturur. Buraya kumulus ooforus denir. Buradaki granuloza hücreleri ovulasyon sonrasına değin oosit ile birleşik halde kalırlar. ZP çevresinde gevşek yerleşmiş kübik ya da alçak boylu prizmatik granuloza hücreleri sitoplazmik uzantılarıyla oosit ile bağlantılarını sürdürür. Primer oositi çevreleyen bu tek katlı granuloza hücre katmanına korona radiata denir. Oosit sitoplazmasında mitokondriyonlar çekirdek yakınında toplanırlar. Sitoplazmada protein ve lipit yapısında vitellus oluşmaya başlar. Oosit 60-80 mikron büyüklüğe ulaşır (63, 65, 66).

2.3.1.4. Tersiyer Folikül (Graaf folikülü)

Graaf folikülünde granuloza hücreleri çoğalır, antrum genişler. Folikül boşluğu folikül sıvısı ile dolar. Oositi saran ZP'ye komşu ilk sıra granuloza hücreleri tek katlı kübik ya da prizmatiktir. Bunun dışındakiler poligonal biçimlidir. Graaf folikülünü en dıştan saran bazal membran kalın, homojen ve saydamdır. Buna camsı zar denir. Tersiyer folikül döngünün başlangıcından başlayarak 10-12 günde oluşur (63, 65, 66).

2.3.1.5. Atretik Folikül

Çok sayıda primer folikül olgunlaşma sürecine başlasada bunlardan yalnızca bir tanesi gelişimini tamamlar, diğerleri atrezi denilen bir olayla dejenere olur.

Granuloza hücreleri kapillerler tarafından işgal edilip, antral boşluğa dökülürler. Teka hücreleri hipertrofiye uğrayıp, karakteristik parlak membran görünümü oluştururlar. Oosit kısa zamanda dejenere olur. Granuloza hücre dökülmesi ile folikül duvarı kollabe olur, boş ve kollabe ZP bir süre daha bağ dokusu içinde kalabilir. Hipertrofiye uğrayan teka hücrelerinde lipid depolanması olur. Daha sonra parlak membran parçalanır, hücre parçaları over dokusuna yayılır ve fibröz skar oluşur (67). Atretik foliküller doğum öncesinden başlayarak menapozun birkaç yıl sonrasına kadar oluşurlar (62).

2.3.2. Ovulasyon

Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce adenohipofizden LH salınımı tetiklenir. Kandaki LH hormonu düzeyinde oluşan aşırı yükselme sonucu granuloza hücrelerindeki LH reseptörleri duyarlılığını yitirir ve LH'a yanıt olarak daha fazla östrojen üretmezler. Oositin I. Mayoz bölünmesi bu tetiklenme ile durakladığı yerden devam etmeye başlar. LH yükselmesinden 12-24 saat kadar sonra gerçekleşen bu olay, oositin mayoz I' i tamamlayarak ilk kutup cisimciğini oluşturmasını ve aynı zamanda II. Mayoz bölünmenin başlamasını sağlar. Ancak oosit ovulasyondan yaklaşık 3 saat öncesine değin metafaz evresinde duraklar. Bu sırada ovaryumun yüzeyinde bir kabarıklık oluşur. Bu kabarıklığın tam tepesinde stigma adı verilen damarsız bir nokta belirir. Yüksek LH düzeyi kollajenaz aktivitesini artırır ve folikülün çevresindeki kollajen lifleri sindirir. LH düzeyindeki ani artışın diğer bir etkisi de prostaglandin miktarını arttırmasıdır. Prostaglandin ovaryum duvarında yerel kas kasılmalarına neden olur. Bu kasılmalarla olgun folikül (Graaf folikülü) yırtılarak içerdiği oositi tuba uterinanın fimbriyaları yakınında periton boşluğuna atar. Fimbriyaların hareketi ile oosit tuba uterina içine alınır (66, 61- 63). Ovulasyon puberteden menapoza değin 28 günde bir olaylanır. Ovulasyon iki menstrual kanama arasındaki döngünün tam ortasında olur. Ovulasyon döngünün ortalama 14. gününde gerçekleşir. Ovulasyonda genelde bir oosit atılır. Bazen aynı anda birkaç oosit atılabilir. Bu da ikiz ya da çoklu gebeliklere neden olur (63).

2.4. Apopitoz

2.4.1. Apopitoz tanımı ve tarihçesi

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen “Apopitoz” geçmişten günümüze yapılan birçok araştırma sonucunda tanımlanabilmiştir. Programlı hücre ölümünün tanımlanması ilk kez 1964’te Lockshin tarafından ipekböceği metamorfozunun incelenmesi sırasında yapılmıştır. 1885’te Walther Flemming tarafından, ‘chromatolysis’ sürecinin, tavşan ovaryumunda foliküler atrezi sırasındaki granuloza hücrelerinin kaybindan sorumlu olduğu tarif edilmiştir. Bundan iki yıl sonra da aynı araştırmacı aynı ölüm sürecini testiküler germ hücre dejenerasyonunda gözlemlemiştir. Bu çalışmalarda, apopitoz terimi kullanılmamış olsa da morfolojik olarak apoptotik hücrelerin ayrıntılı şekilde gösterilmesinden dolayı o dönemde en çok ilgi çeken çalışmalar olmuştur.

Apopitoz terimi ilk olarak 1972’de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından, Yunancada apo (ayrılan) ve ptosis (düşen) terimleri birleştirilerek, ‘ağaçtan dökülen yapraklar’ anlamındaki ‘apopitozis’ terimiyle açıklanmıştır (68). Memelilerde hücre ölümünün fiziksel aşaması sırasında, birçok hücre tipinde morfolojik özelliklerin oldukça ilişkili düzenlendiğini gözlemlemiştir. Gelişimsel ve homeostatik hücre ölümlerinin kontrolünün tesadüfi olmadığını göstermesi açısından bu çalışma bir dönüm noktası olmuştur (69). Kerr ve arkadaşları apoptotik hücreyi morfolojik ve elektron mikroskopik olarak; hücrelerin komşu hücrelerden ayrı olması, hücre hacminin küçülmesi (sitoplazmik büzülme), kromatinin kondanse olması, nükleusun kendini çevreleyen zarfın (nuclear envelope) periferinde toplanması ya da küçülmesi (nükleer piknosis) ve sitoplazma membranı içindeki fragmentasyonlar olarak bilinen apoptotik cisimciklerin (eski adıyla Councilman bodies) gözlemlenmesiyle karakterize etmişlerdir (68, 69). Wyllie 1984’de apoptotik hücrede morfolojik değişimlerin yanı sıra birçok karakteristik biyokimyasal belirteçin de olduğunu gözlemlemiştir (70).

Bunlardan en önemlisi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile DNA da mono ve oligonukleozomal (180-200 bp) birimlerin merdiven gibi belli aralıklarla kırıklar

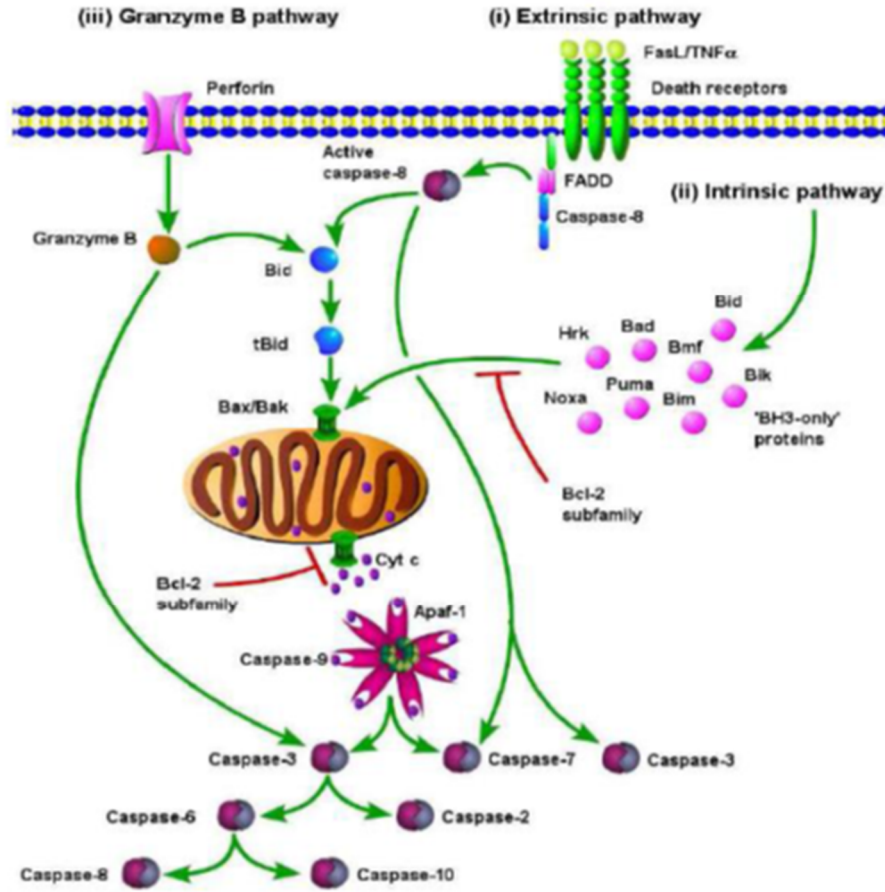
göstermesinin nükleer kromatin fragmantasyonu olarak bilinmesidir. 1999'da Horvitz ve arkadaşları tarafından, memelilerde apopitozun gelişimsel süreçteki moleküler mekanizması *Caenorhabditis elegans* (yuvarlak solucan) ile yapılan deneylerle açıklanmıştır. Çalışmada başlangıçtaki 1090 somatik hücreden 131'inin programlı bir şekilde öldüğü ve bunun apopitoz ile genetik olarak kontrol edildiği ortaya konmuştur (70). Çok hücreli organizmalarda hücre sayısı, doku büyüklüğü ve bu hücrelerin homeostazı, hücre bölünmesi, hücre göçü, hücre ölümünün programlanması ile sıkı bir şekilde kontrol altında tutulur (71).

Apopitoz ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir (70). Belirli bir dokuda hücre proliferasyonu mitozla, o dokuda olması gereken hücre sayısı da apopitoz ile belirlenir (71). Yapılan çalışmalarda, programlı hücre ölümünün hem normal gelişim, homeostaz ve yaşlanma sürecinde hem de hastalık ve zararlı ajanların hücrede hasar oluşturduğu durumlarda var olduğu gösterilmiştir (69, 70, 72). Apopitoz gelişimin normal sürecinde fizyolojik olarak görülmekle birlikte bir denge içinde olmalıdır. Bu dengenin bozulması çeşitli patolojilere yol açabilir. Bu konuda birçok araştırmacı apopitozun düzenlenememesinin birçok insan patolojisi, kanserleri, otoimmün hastalıklar ve infertiliteye neden olduğunu saptamıştır (15).

2.4.2. Apopitoz mekanizmaları

Apopitoz mekanizması oldukça karmaşık ve enerji bağımlı moleküler aktivite kaskadını içerir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki ana apopitotik yolak olduğu bildirilmiştir. Ancak bazı araştırmacılar Endoplazmik retikulum aracılı apopitozu üçüncü bir sınıf olarak tanımlamaktadırlar. Bir kısım araştırmacı, hücre stresinin kalsiyum salınımı ile mitokondriyal yolağı ya da Kaspaz 12'yi aktive etmesiyle apopitozu indüklediği görüşünü savunmaktadır (73). Bazı araştırmacılar ise intrinsik ve ekstrinsik yol ile bağlantılı olan ve bu yollardan birinin moleküllerini etkileyen başka bir apopitotik yolak olduğunu ileri sürmektedirler (74). Bu sonradan tanımlanan yolak, T hücre aracılı sitotoksikite ve

perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içerir. Ekstrinsik, intrinsik ve perforin-granzim yollarının üçü de aynı ölüm yolunda birleşirler (Şekil 3).



Şekil 3: Apoptoz mekanizmaları (75)

Bu yol kaspaz 3 ün yarılanması ile başlatılır ve DNA fragmentasyonu, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin bozulması, proteinlerin çapraz yer değiştirmesi, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücrelerin reseptörleri için ligandların eksprese edilmesi ve son olarak da hücrenin fagositler tarafından ortadan kaldırılması ile sonuçlanır (72). Apoptozun regülasyonunda kaspazlar, Bcl-2 ailesi proteinleri, IAP ailesi proteinleri, p53 ve ilişkili proteinler rol oynar.

Hücrede programlanmış hücre ölümünü başlatan üç temel mekanizma vardır:

1. Ekstrinsik; Ölüm reseptörleri yolu
2. İntrinsik; Mitokondrial yol
3. Perforin –Granzim Yolu; Granül bağımlı Granzim A ve Granzim B yolu

Hücrede ölüm kararı verildiği zaman apoptotik ölüm araçlarının koordinasyonu ile çok sayıda alt program aktive edilir. Kaspaz ailesi ve Bcl-2 ailesi en önemli apoptotik regülatör faktörlerdir. Apoptotik sürecin en önemli yöneticisinin kaspaz ailesi olduğu düşünülmektedir. Kaspaz aracılığı ile apoptoza yol açan 100 den fazla madde tanımlanmıştır (Laminin, fodrid vb)

Sağlıklı foliküllerde kaspaz 3 inaktif formda bulunurken atretik foliküllerde aktif kaspaz 3 konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. Postnatal hayatta primordiyal folikül aşamasından preantral aşamaya kadar olan foliküllerde apoptoz özellikle oositin ölümüyle başlar (76). Preantral foliküllerden preovulatar foliküle kadar olan atrezide ise apoptoz granuloza hücrelerinde başlar. İnfertil ovulatar sikluslarda korpus luteum regresyonunda da apoptozun önemli olduğu gösterilmiştir. Kaspaz 1, 3, 9 korpus luteum regresyonunda önemli kaspazlardır (76). Bcl-2 ailesi de antiapoptotik ve proapoptotik üyeleri olan bir ailedir. Proapoptotik faktörlerin salınımını düzenleyerek etki yaparlar. Mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımını sağlarlar. Mitokondri apoptotik süreçte önemli bir organeldir. Proapoptotik pek çok maddenin sitoplazmaya salınımını sağlar. Sitokrom-c kaspaz 9 aktivasyonu için gereklidir. Pekçok apoptotik regülatör mitokondride depolanarak uyarı geldiği zaman salınır. Apoptotik ölümden sonra hücresel artıklar ortamdan uzaklaştırılır (77).

Apoptozun basamaklarını kısaca özetleyecek olursak;

- Apoptozun indüksiyonu,
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması,
- Sitokrom c'nin salınması,
- Apoptozom oluşumu (sitokrom c + Apaf-1 + kaspaz-9),
- Mitokondriyal transmembran potansiyelinin değişmesi,
- Kaspazların aktivasyonu,

- Fosfolipidlerin hücre membranının iç yüzünden dış yüzüne transloke olması,
- DNAaz'ın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmantasyonu (internükleozomal DNA fragmantasyonu),
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptoza özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi (72).

2.5. Kalsiyum İyonu (Ca^{+2})

Hayatın ilk basamağı olan fertilizasyondan başlayarak gen transkripsiyonu, kas kasılması, hormon salınımı, hücrelerin farklılaşması, gelişmesi, nekroz ve apoptozla tanımlanabilecek hücre ölümü gibi birçok olaydan sorumlu olan bir hücre içi ikincil haberci olan kalsiyumun evrenselliği, birçok hücrel reaksiyonda üstlendiği görevden kaynaklanmaktadır. İstirahat halindeki bir hücrede hücre içi Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) konsantrasyonu yaklaşık olarak 100 nM civarındadır.

Depolarizasyon, hormon aktivasyonu vb. olaylar hücredeki $[Ca^{+2}]_i$ artış mekanizmalarını tetikler ve konsantrasyonu 1–3 μ M seviyesine yükselebilir. Bu yükselmenin tüm fizyolojik olayları kontrol edebilmesinin sırrı hızı, genliği, yer ve zamanla (spatio-temporal) ilgili modelinden kaynaklanmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} sinyali de hücre içi konsantrasyonunun ($[Ca^{+2}]_i$) geçici bir şekilde artışından oluşur. Ca^{+2} 'nin sinyal üretime yönelik fonksiyonu sitozolik miktarının artması ile doğru orantılıdır (78- 81).

Bu artış nükleustan sızma yolu ile olabileceği gibi sadece mitokondriden tek başına da olabilir (82). Hücre içerisindeki kalsiyum konsantrasyonu, eş zamanlı birçok ters yönlü etkileşim neticesinde artabilmekte veya azalabilmektedir. Bu olayları artmaya ya da azaltmaya yönelik olarak açma-kapama (on-off) şeklinde özetlemek de mümkündür. Ca^{+2} konsantrasyonu artış mekanizmaları hücre dışından hücre içerisine yönelik, hücre zarına yerleşik vaziyetteki iyon kanalları ile

endoplazmik retikulum (ER) ve sarkoplazmik retikulum (SR) yüzeyindeki iyon kanalları vasıtası ile olmaktadır (83). Buna zıt olarak Ca^{+2} konsantrasyonu da hücre zarında ve ER/SR deki istihdam edilen Ca^{+2} ATPaz'lar, yoğunluk farklılığından kaynaklanan ve enerji harcanması ile neticelenen bir takım değiş-tokuş mekanizmaları (Na^{+}/Ca^{+2}) tarafından sağlanır. $[Ca^{+2}]_i$ seviyesinin düzenlenmesinde mitokondri önemli rol oynar. Mitokondri Ca^{+2} 'a karşı düşük affinite göstermesine karşılık, çok fazla oranda depolama kapasitesine sahiptir. Bu özelliği sayesinde $[Ca^{+2}]_i$ miktarını azaltmada dolayısı ile de hücre sel cevap (azaltarak) oluşumunda etkin rol oynamaktadır. Bunlarla birlikte hücre dışı ortamda bulunan kalsiyum da sinyal mekanizmasında önemli rol oynamaktadır.

2.5.1. Hücre İçerisine Ca^{+2} Giriş Kanalları

Hücre içerisine Ca^{+2} 'un girişi büyük bir elektrokimyasal konsantrasyon farklılığının olması durumunda gerçekleşir (84). Hücreler bu dış kaynağı farklı özellikteki kanallar vasıtasıyla kullanırlar. Hücreler Ca^{+2} 'un hücre içerisine girmesine neden olabilecek aktivasyon mekanizmalarına göre gruplandırılmış farklı tipte kanallardan faydalanırlar.

Bu kanallar;

1. Voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları (Voltage operated Ca^{2+} channels/VOCCs)
2. Reseptöre duyarlı Ca^{+2} kanalları (Receptor operated Ca^{2+} channels/ROCCs)
3. Mekanik olarak aktive olan Ca^{+2} kanalları (Mechanically activated Ca^{2+} channels)
4. Depolanmış Ca^{+2} miktarına duyarlı Ca^{+2} kanalları (Store operated Ca^{2+} channels / SOCCs) başlıkları altında sınıflandırılabilirler.

2.5.1.1. Voltaja Duyarlı Ca^{+2} Kanalları

Üreme, kas ve sinir hücreleri gibi plazma membranının depolarizasyonu sonucu aktive olabilen, uyarılabilen hücre tiplerinde bulunurlar.

Memeli hücrelerindeki VOCCs beş tane alt birimden ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , δ) oluşmuştur. Bu alt tiplerden sadece bir tanesi ($\alpha 1$) Ca^{+2} kanalı olarak görev almakta diğer alt tipler ise kanalın açılıp kapanmasının düzenlenmesinde görev almaktadırlar.

2.5.1.2. Reseptöre Duyarlı Ca^{+2} Kanalları

Bu tip Ca^{+2} kanalları yapı ve fonksiyonu itibariyle farklılık arz eden ve salgı hücreleri ve sinir sonlarında sıkça rastlanan bir dizi kanaldan oluşmuşlardır. En iyi bilinen ROCCs'ler nikotinic asetilkolin ve N-methyl-D-aspartate reseptörlerini içerirler. ROCCs'lar hücre yüzeyinde bulunan özel alana, agonistin bağlanması ile aktive olurlar. Farklı tipteki ROCCs'lar çok geniş bir agonist yelpazesi içerisinde çeşitlilik gösterirler (Örn: ATP, Serotonin, glutamat ve asetilkolin.)

2.5.1.3. Depolanmış Ca^{+2} Miktarına Duyarlı Ca^{+2} Kanalları

Hücre içi Ca^{+2} depolarının boşalmasına cevap olarak aktive olabilecekleri gibi farmakolojik bir ajan veya fizyolojik olarak Ca^{+2} 'u hareketlendirecek haberciler tarafından aktive olurlar.

Bu kanalların bulunduğu hücre içerisindeki depolarının nasıl doldurulduğu henüz aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalar iki tezin belirgin olarak öne çıktığını göstermektedir. Bunlar;

1- Hücre zarındaki (PM) Ca^{+2} giriş kapıları ve ER'deki Ca^{+2} kanalları (83, 85).

2- Salınım kapılarının birbiriyle birlikte uyumlu bir şekilde çalışmaları ya da Ca^{+2} depolarının patlatılması ile sentezi mümkün olabilen yayılabilme özelliğinde olan kalsiyum giriş faktörü habercisi aracılığı ile PM'daki Ca^{+2} kanallarının aktivasyonunun oluştuğu varsayılmaktadır (86).

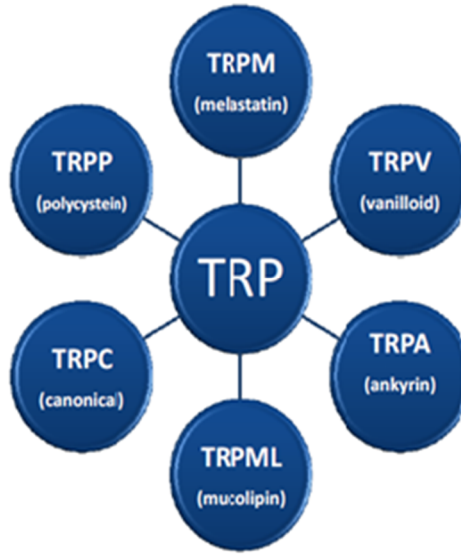
Ca^{+2} depolarının patlatılmasından kaynaklanan Ca^{+2} girişi artmasının birçok hücre tipinde görülmesinden dolayı SOCCs'ler PM'deki en yaygın Ca^{+2} kanal alt tipi olabilirler (87). Bu kanalların elektrofizyolojik olarak deneyleri de yapılmış ve hücre tipine göre farklılıklar arz ettiği görülmüştür. Her bir hücre tipinin farklı tipte SOCCs kanalına sahip olduğunu belirtilmiştir. Günümüzde SOCCs'lerin en iyi örneği Drosophila türlerinde görev yapan transient receptor potential olarak adlandırılan homolog yapıdaki proteinlerdir (88- 90).

2.5.1.3.1. Transient Reseptor Potential (TRP) Üst Ailesi

TRP katyon kanalları üst ailesi VOCCs'a geçiren katyon kanallarıyla geniş bir yelpaze oluşturmaktadır. 28 adet memeliye ait TRP kanalları yedi alt birime ayrılmıştır.

Bunlar; TRP conancial (TRPC) yedi alt birimden, TRP vanilloid (TRPV) altı alt birimden, TRP melastatin (TRPM) sekiz alt birimden, TRP polycystein (TRPP) üç alt birimden, TRP mucolipin (TRPML) üç alt birimden ve TRP ankyrin (TRPA) bir alt birimden oluşmaktadır. Tüm bu TRP katyon kanalları henüz tam olarak karakterize edilememesine rağmen, birçok hastalık onlarla ilişkili olarak ortaya çıktığından bu tip iyon kanallarına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Kanal gözeneginin 5. ve 6. segmentleri arasında bulunan bir iletken iyon etrafında homo veya heterotetromerik düzenlemelerle TRP kanalları voltaja duyarlı K^{+} kanallarına benzer basit bir yapıya sahiptir (91). Transmembran segmentlerinden dördüncüsü ise pozitif yüklü olmama özelliği ile diğerlerinden ayrılır. TRPV N ucu ve TRPV tekrarlı

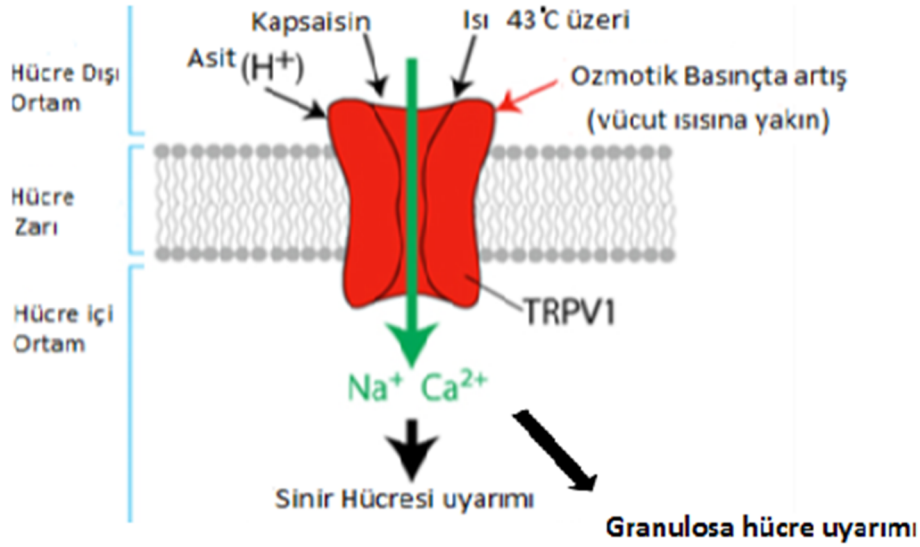
bağlayıcı, çoklu ankyrin içerir. TRPC ve TRPM kanallarına ait 6. segmentin C ucu kısmı “TRP alanı” içerir. TRPM2 kanallarında iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasında gerçekleşmektedir. Ayrıca, TRPM2 ve TRPC kanallarının N ucu ADPR pirofosfataz (ADPR’yi, riboz 5- fosfat ve adozin monosfosfata parçalar ve kanal açılır) enzim aktivasyonu içermektedir. ADPR pirofosfataz aktivasyonu TRPV kanallarında gözlemlenmemiştir. Çok yönlü Protein Kinaz A (PKA) ve Protein Kinaz C (PKC) varsayılan fosforilasyon alan fonksiyonları tanımlanmış ve kısmen test edilmiştir (92). TRP kanalları ya direkt olarak hücre zarındaki Ca^{+2} giriş kanalları gibi davranmakta ya da Ca^{+2} giriş kanallarının modülasyonu için itici güç olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarında değişime yardımcı olmaktadır. Tanımlanabilmiş tüm işlevsel TRP kanalları (TRPM4 ve TRPM5 kanalları dışında) Ca^{+2} için geçirgendirler. (93).



Şekil 4. TRP üst ailesinin altı alt aileden oluştuğunu gösteren şekil (94).

2.5.1.3.1.1. TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid) Kanalları

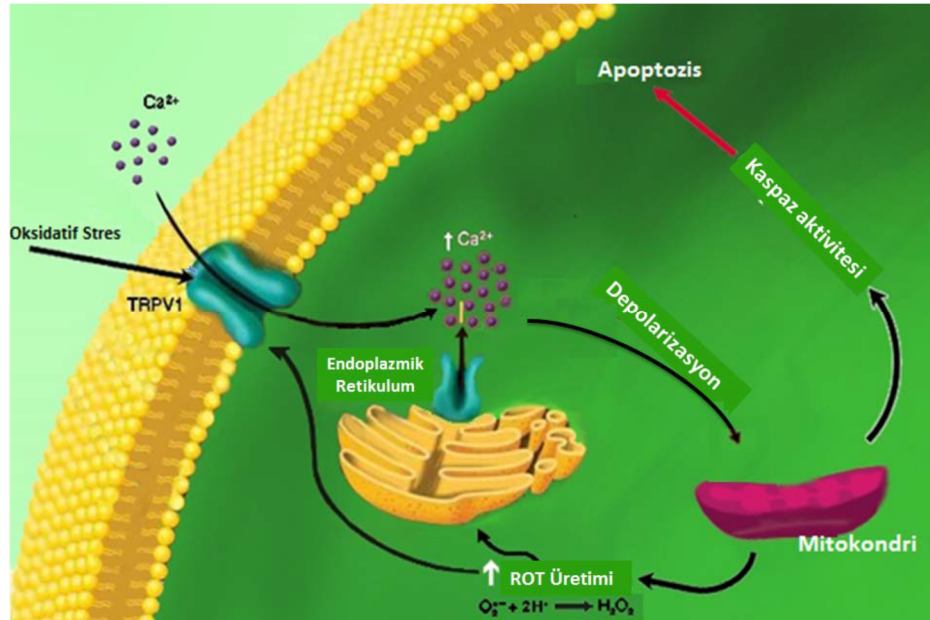
TRPV1 kanalları vanilloid grubu içerisinde yer almaktadır ve memelilerin birçok fizyolojik, patolojik ve hastalık durumlarında rol oynamaktadır. Kapsaisin (CAP), düşük pH ve ısı içeren uyarımların birçoğu seçici olmayan katyon kanallarından (TRPV1) Ca^{+2} hücre içine girişine sebep olur. TRPV1 zararlı birçok uyarımdan sorumlulukta işaret verici olarak rol alabilir. TRPV1'in tekrar eden aktivasyonunda ölümcül hücre yaralanmaları, oksidatif stres ve sitozoldeki serbest kalsiyumun artışıdaki sonuçlar daha önce belirtilmiştir.



Şekil 5. TRPV1 Kanalı Aktivasyonu (95)

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, hem TRPA1 hem de TRPV1 kanallarının yapısında ve aktivasyonunda tiyol ve sülfidril gruplarının önemine değinilmiştir (17, 96). TRPV1 kanallarının kimyasallarca aktive edilebildiğinden yukarıda bahsedilmiştir. Daha ziyade kırmızıbiberde bol miktarda bulunan CAP maddesi TRPV1 kanallarının başlıca agonistidir (uyarıcıdır). Bu madde verildiğinde kanal aktive olmaktadır. Bunun yanı sıra, hücre içerisinden ve dışından gelen uyarılarla da aktive olmaktadır. Bu uyarılar arasında yüksek ısı (>42 °C), asidik ortam, inflamasyonu uyarıcı faktörler (örneğin interlökinler), kimyasal uyarıcılar yer

almaktadır (97). H_2O_2 gibi hücre zarını geçebilen oksidanların TRPV1 kanallarını aktive edebildikleri, hücre zarını geçemeyenlerin ise aktive edemedikleri gözlenmiştir (98). Bununla birlikte, H_2O_2 in TRPV1 kanallarını aktive ettiği biyokimyasal yollar hakkında yeterince bilgi yoktur. CAP ile oksidatif ürünler arasındaki etkileşimle CAP etkisinin azalmasından dolayı, oksidatif stres ürünlerinin fazla üretildiği hücresel ortamlarda, CAP'la uyarılan TRPV1 kanal akımları, oksidatif ürünlerin az bulunduğu ortamlara kıyasla daha az gözlenmiştir (98,99). Oksidatif stres ürünleri kinaz enzimleri ve hücre zarı proton yapılarında değişikliklere neden olmaktadır. Bu nedenle, uzun süre oksidatif strese maruz kalındığında tiyol-sulfidril gruplarındaki bağlardaki değişimlerden dolayı, TRPV1 kanallarının duyarlılığının azaldığı, fakat sistein içeren maddeleri inkübe edilen Human Embryonic Kidney 293 cells (HEK-293) hücre serilerinin TRPV1 kanallarının açılma-kapanma hassasiyetinin düzeldiği rapor edilmiştir (100). Yukarıda bahsedildiği gibi, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının da oksidatif stres aracılığıyla aktive olduğu da iyi bilinmektedir (17).



Şekil 6: TRPV1 Kanalları ve Apoptozis İlişkisi (95)

2.6. Oksidatif Stres

2.6.1. Serbest Radikaller

Atomlar, çekirdek ve çekirdeğin etrafında orbita deneni yörüngelerinde spinleri birbirine zıt iki elektron içerirler. Bu elektronlara eşlenmiş ya da ortaklanmış elektron adı verilir. Atomlar yörüngelerindeki elektronlar eşlenmiş olduklarında kararlı yapı gösterirler. Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, kimyasal olarak çok aktif, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük, zararlı moleküllerdir. Yani serbest radikaller negatif yüklü elektron sayısının pozitif yüklü proton sayısına eşit olmadığı moleküllerdir (101). Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle hızlı reaksiyona girme ve bu son yörüngelerindeki elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini oldukça artırır (102).

Serbest radikaller başlıca 3 yolla meydana gelir:

1. Kovalent bağların hemolitik kırılması: Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün hemolitik yıkımı sonucu oluşurlar. Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.

2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi: Kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.

3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir.

Bu 3 tepkimeden biri oluştuğunda radikal olmayan türler radikal haline gelir.

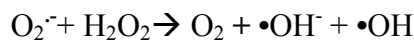
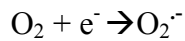
Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucunda tepkimeye giren maddeler de serbest radikallere dönüşerek hasar zincirini ilerletirler.

Fizyolojik şartlarda serbest oksijen radikalleri hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu, karaciğerde detoksifikasyon işlemi gibi vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynar.

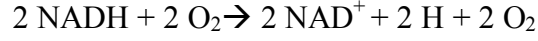
Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Endojen etmenler organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşurlar. Oksijen, nitrik oksid, aktive nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, ER, peroksizom ve plazma membranı, araşidonik asit metabolizması başlıca endojen kaynaklardır. Eksojen kaynaklı etmenler arasında; diyet faktörleri, stres, çevresel faktörler (hava kirliliği), ilaçlar, ksenobiyotikler, zararlı ışınlar (x-ray, ultraviole vs.) yer alır. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (1). Oksijenin toksik etkisi yoktur ancak aerobik hücre metabolizması sırasında moleküler oksijen, Reaktif Oksijen Türleri (ROS)'ne dönüşür, ROS'lar normal O₂ metabolizması sonucu oluşan süperoksit radikali (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalidir (•OH).

2.6.1.1. Süperoksit Radikali (O₂⁻)

Eksojen ve endojen etmenler nedeni ile en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Aerobik organizmalarda oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali oluşur (103).



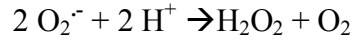
Süperoksit radikali, mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) okside nikotinamid adenin dinükleotide (NAD⁺) okside olması ile üretilir. Üretilen süperoksit radikali üretildiği yerde kalır.



Ayrıca pek çok oksidaz tarafından O_2^- üretilir. O_2^- , bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. O_2^- , nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. O_2^- düzeyi hücrede azalırsa bakteriyal enfeksiyonlara karşı yatkınlık olur. O_2^- düzeyleri artarsa O_2^- süperoksit dismutaz enzimi (SOD) ile H_2O_2 ve O_2 'e dönüştürülerek ortamdaki uzaklaştırılır.

2.6.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik / nonenzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

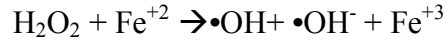


Esas üretim yolu O_2^- 'in dismutasyonudur. Bu tepkimede iki tane O_2^- yapılarına iki hidrojen atomu alarak SOD katalizörlüğünde H_2O_2 ve O_2 oluştururlar. H_2O_2 radikal olmayan reaktif oksijen türevlerindedir. Süperoksitin aksine hücre membranları arasında serbestçe difüze olabilen ve sitozole geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Süperoksitin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. H_2O_2 , fizyolojik pH ve ısıda ve metal iyonları yoksa stabil özellik gösterirse de özellikle proteinlerdeki hem grubundaki serbest demir (Fe^{+2}) ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur (Fenton reaksiyonu). Okside formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir.

H_2O_2 aynı zamanda süperoksitle reaksiyona girerek reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Haber-Weiss reaksiyonu). Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler.

2.6.1.3. Hidroksil Radikali (•OH)

Bilinen en reaktif oksidandır. Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır.



Yarılanma ömrü çok kısadır. Aminoasitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipitler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin birçoğuyla reaksiyona girebilir (104). DNA ile tepkimesi sonucu DNA hasarı meydana gelir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oksidasyonla yapı değişikliği yaparak proteinler proteolitik yıkıma götürülür. Hidroksil radikalının başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini arttırıp hücre ölümüne neden olabilir (105).

2.6.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Organizmada serbest radikal oluştuğu zaman bu radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidan sistemler vardır. Serbest radikal oluşum hızı ile bunların antioksidan sistemler tarafından kaldırılma hızı bir denge içindedir. Bu denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (106).

2.6.2.1. Oksidatif Stresin Proteinlere Etkisi

Proteinler hücrenin ve enzimlerin yapı taşıdır. Proteinler aminoasitlerden (aa) oluşmaktadır. Serbest radikallerin özellikle duyarlı aa'lar ile doğrudan etkileşimi sonucunda proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve agregasyon meydana gelerek hasar oluşur. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme düzeyleri içerdikleri aa'lara göre farklılık gösterir. Metionin, sistein gibi terminal sülfhidril grubu bulunduran aa'lar ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik aa'lar, oksidasyona en fazla maruz kalan moleküllerdir. Proteinler oksidasyona uğradıkları zaman sekonder ve tersiyer yapılarında meydana gelen değişiklik sayesinde fonksiyonları etkilenir. Serbest radikaller, protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini değiştirir, membran taşıyıcı proteinlerini ve reseptör etkileşimlerini bozarlar (107).

2.6.2.2. Oksidatif Stresin Membran Lipidlerine Etkisi

Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, ER vs.) membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle OS'e duyarlıdır (108). Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır (109). Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranının akışkanlığında azalma, membran geçirgenliğinde değişme, membran potansiyelinde azalma, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenir. Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin hücre içine salınması sonucunda proteoliz hızlanır ve doku hasarı şiddetlenir. Membran geçirgenliği bozulursa potasyum ve magnezyum iyonlarının konsantrasyonları değişir ve böylece protein sentezinde inhibisyon gerçekleşir. Lipid peroksidasyonunda öncelikle lipid radikali oluşur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini oluşturur. Lipid peroksit radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipid peroksitler ortamdaki hidrojen atomları ile de reaksiyona

girerek lipid hidroperoksitleri oluştururlar. Lipid peroksitler daha sonra malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler.

MDA, proteinlerin amino gruplarına, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. Membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olur. Membranlardan kolaylıkla difüze olarak, DNA yapısında yer alan nitrojen bazlarla reaksiyona girer ve mutajen, karsinojen, genotoksik etkiler gösterir. Lipid peroksidasyonunun ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi kabul edildiğinden, peroksidasyon sırasında oluşan konjugelerin ölçümü, in vivo lipid peroksit düzeyini yansıtabilecek önemli bir yöntemdir.

2.6.2.3. Oksidatif Stresin Nükleik Asitlere Etkisi

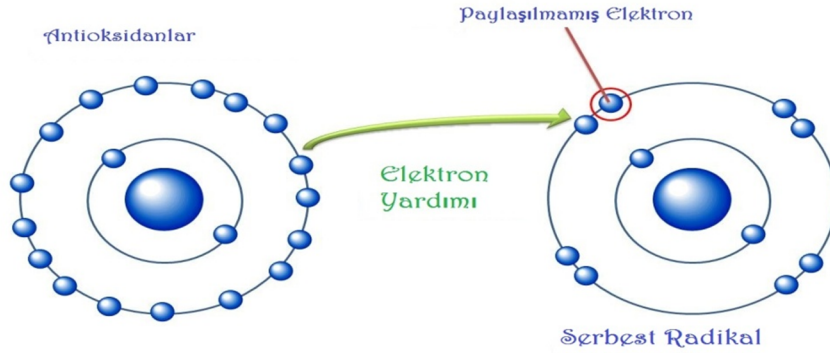
Serbest radikallerin, farklı mekanizmalar ile deoksi ribo nükleik asit (DNA) üzerinde hasara yol açarlar. OH⁻ radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA'da hasara neden olur. DNA'nın temel yapı taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Serbest radikaller özellikle bu bazlarda mutasyona neden olurlar. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (110).

2.6.2.4. Oksidatif Stresin Karbonhidratlara Etkisi

Özellikle glikoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak O₂⁻ ve H₂O₂'i meydana getirirler. Okside glikoz, protein ile reaksiyona girer ve glikolizasyon ve glikasyon ürünleri oluşturur (111).

2.7. Antioksidanlar

Nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (112). ROS'un yarılama ömürleri kısadır fakat başlattıkları serbest radikal zincir reaksiyonları ile doku hasarına sebep olmaktadır. Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır.



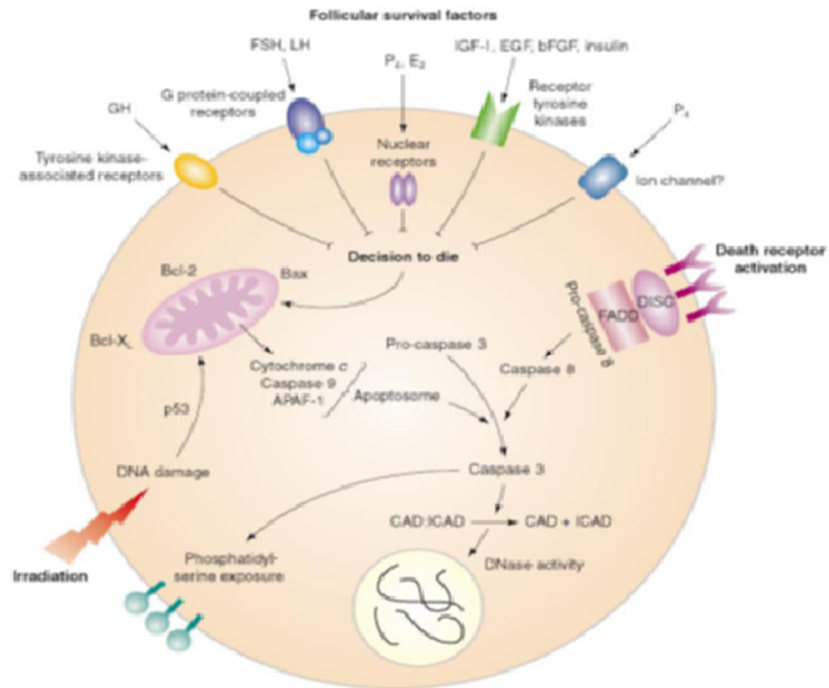
Şekil 7: Antioksidanlar ve Serbest Radikaller (95)

Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere antioksidanlar denir (113). Enzimatik antioksidanlar SOD, CAT ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir. SOD' ın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Px 'da ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metalloenzim olarak da adlandırılırlar (114). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β-karoten sorumludur. SOD, GSH-Px ve CAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitamini de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir. Her ikisi de hücre

membranlarındaki LPO zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (115).

2.7.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar; ROS ve nitrojen türlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı/yenilenmesi ve metal şelasyonu gibi farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar. İdeal bir antioksidan, bu etki şekillerinden çoğunu yerine getirebilir. Biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir (116).



Şekil 8: Foliküler granuloza hücresinde apoptoz sinyalleri (77).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

6,5 MHz'lik vaginal prob (Logio 200)

Cam pastör pipet (Swemed)

Cell Star Cell Culture Flask, Greiner (Avusturya)

Center well (IVF-Thermoscientific, Rochester-NY 14625, USA)

CO₂ inkubator: (Heal Force, Smart Cell, Japonya)

Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)

Floresan spektrofotometre: (Cary Eclipse, Varian Firması, Avustralya)

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

İnsülin iğnesi (Hayat)

Laminar Flow Kabini: Jouan B4I (Fransa)

Logio 200 marka USG cihazı

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

Olympus Stereo Mikroskop IX 70

Opu iğnesi (Labotect-Ovarial Biopsie set, Nr.3, Koompweg 12, D-37, 124,

Rosdorf, Germany)

Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
Petri plağı (IVF-Thermoscientific, Rochester-NY 14625, USA)
pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
Plate reader: Tecan Infinite M 200 Pro (96) (Avusturya)
Soğutmalı santrifüj: Kubota (Japonya)
Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

10X PBS Buffer Solutions, Sigma (Almanya)
Apopcentage Apopitoz Kiti, Biocolor (İngiltere)
Colleganase-Type 4 4188/47M9961, 100 mg, Worthington (ABD)
Dihydrorhodamine 123 (DHR 123), Santa Cruz, (ABD)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Solusyonu
DMSO (Dimethyl sulphoxide) Hybri-Max, Sigma (Almanya)
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Biochrom (Almanya)
EGTA, Merck (Almanya)
Fura-2-acetoxymethyl ester (Fura-2-AM), Invitrogen (ABD)
G mops plus (Vitrolife AB Box 9080, 400 92 Göteborg, Sweden)
Hidrojen Peroksit (H₂O₂), Sigma (Almanya)
Hidrojen Peroksit, Sigma (Almanya)
Hydrochloric Acid, Merck (Almanya)
Metanol, Merck (Almanya)

Oil-100 (Vitrolife AB Box 9080, 400 92 Göteborg, Sweden)

Potassium Tartarat, Merck (Almanya)

Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medium (Almanya)

Sodium Carbonate (Na₂CO₃), Merck (Almanya)

Sodium Chloride, Merck (Almanya)

Sodyum hidroksit (NaOH), Riedel-de H en (Almanya)

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma (Almanya)

Trypsin 1 X Solutions, Sigma (Almanya)

3.1.3. Kullanılan ilaçlar

Gonal-F® RFF Pen - follitropin alfa injection, Merck Serono, İstanbul, Türkiye ya da Puregon® Schering-Plough, İstanbul, Türkiye (GnRH analogları)

Menogon 75 U ampul, Ferring, İstanbul, Türkiye (HMG)

Cetrotide flakon® 0,25 mg, Merck Serono, İstanbul, Türkiye (luteinizan hormonu salgılatan hormonun (LHRH) antagonistidir)

Ovitrelle® PreFilled Syringechoriogonadotropin alfa injection, 250 mikrogram, Merck Serono, İstanbul, Türkiye (hCG)

3.1.4. Çalışmanın yürütüldüğü laboratuvarlar

Bu  alışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum IVF  nitesi ve Biyofizik ve Sinir Bilimleri Anabilim Dallarını ile Nörolojik

Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi (NÖROBAM) Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 3517-D2-13 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1.5. Çalışma Hastalarının Seçimi

Çalışmamıza Nisan 2013- Mart 2014 tarihleri arasında Süleyman Demirel Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Tüp Bebek Merkezine IVF tedavisi için başvuran 48 infertil hasta dâhil edildi. Çalışma prospektif ve tek merkezli olarak planlandı. Hastalardan çalışmaya katılmaları için yazılı onam alındı. Hasta anamnezleri alındı.

Jinekolojik muayeneyi takiben transvaginal USG yapıldı. Olguların tümüne temel infertilite tetkikleri yapıldı. Âdetin 3. günü hormon tayini yapıldı (Bazal FSH, LH, progesteron, estradiol, prolaktin, tiroid stimulan hormon), histerosalpingografi yapılarak infertilite nedenleri saptandı. Eşlerinden üroloji konsültasyonu ile spermiyogram tetkikleri istendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Grupların Oluşturulması

Hastalar, erkek faktör infertilitesi ve PCOS olmak üzere iki gruba ayrıldı; üremeye yardımcı teknikler kullanılarak rekombinant FSH tedavisi ile geliştirilen foliküllerden normal ovulasyon düzeyine sahip olup, aspirasyon sonucu elde edilen

oositlerin sayısı 10 ve daha fazla olan kadınlar değerlendirmeye alındı. Ovulasyon indüksiyonunu takiben istenilen olgunluğa erişen oositler ultrason eşliğinde aspire edildi.

3.2.2. Granuloza hücrelerinin izolasyonu

Bu hastalardan OPU sonrası her bir oosit etrafındaki korona radiata tabakasının mekanik ve hiyaluronidaz enzimi kullanılarak ayrılması ile granuloza hücreleri elde edildi.



Resim 1: Granuloza hücrelerinin izolasyon aşamaları (SDÜ Tıp Fak. IVF Ünitesi)

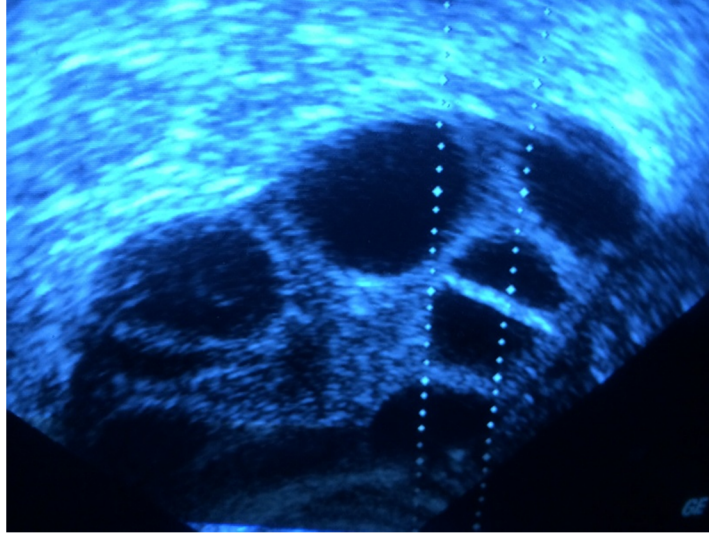
Elde edilen granuloza hücreleri planlanan analizler yapılmak üzere SDÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarına taşındı. Bu hücrelerde hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyleri, mitokondriyal depolarizasyon, hücre içi ROS üretimi, kaspaz 3-9 ile apoptoz parametrelerine bakıldı.

Çalışma öncesinde Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik Kurulu 27.03.2013 tarih ve 89 sayılı kararla çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca olmadığına karar verildi.

Çalışmaya dâhil edilme kriterleri:

1. Ek hastalık olmaması
2. Sigara, alkol, ilaç kullanmayan hastalar
3. 25-35 yaş arası en az bir yıl infertil çiftler
4. Primer infertil olanlar
5. PCOS (hasta grubu)
6. Erkek faktör infertilite olanlar (kontrol grubu)
7. OPU işleminde 10 veya daha fazla folikül gelişen hastalar

Hastaların açlık kan şekeri, üre, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), hemogram (12 saatlik açlık süresini takiben, 10 ml venöz kan örnekleme yapılarak) ölçümleri yapılarak ve elektrokardiyografi (EKG) ve akciğer filmleri çekilerek anestezi doktoru tarafından konsülte edildi. Preoperatif anestezi almasında sakınca olmadığı gösterildi.



Resim 2: Oosit pick-up işlemi sırasında overin ultrasonografik görünümü (SDÜ Tıp Fak. IVF Ünitesi)

3.2.3. Laboratuvar Analizleri

3.2.3.1. Hücre İçi Ca^{+2} Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum iyon miktarının ölçümü için granuloza hücreleri oda ısısında 45 dakika boyunca $4\mu\text{M}$ fura-2 AM flüoresan boyası ile boyanacak (117). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücre manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 10^3 olacak şekilde Na^+ -HEPES [(mM cinsinden) NaCl , 140; KCl , 4,7; CaCl_2 , 1,2; MgCl_2 , 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7.4)] solüsyonu içerisinde florasan spektrofotometrede (Varian Cary Eclipse, Australia) haznesine yerleştirilecek. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında flüoresan ışık ile uyarılacak ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alınacak.

Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon düzeyi $[\text{Ca}^{+2}]$ değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedilip (118-119) metoduna göre hesaplanacaktır. TRPV1 çalışmalarında ise uyarım kapsaisin (0.1 mM) ile

yapılırken, açılan kanalın TRPV1 mi olduğunu test etmek için, TRPV1 antagonisti kapsazepin (0.04 mM) kullanılmıştır.

3.2.3.2. Hücre İçi ROS Üretimi Tayini

İzole edilen hücreler 150 µl 1xPBS ile sulandırılacaktır. Sonrasında her bir ependorfta 50 şer µl olacak şekilde hücreler 3'e bölünecektir. Daha sonra üzerlerine 950 µl RPMI konuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 1µl Dihydrorhodamine (DHR) 123 ROS boyasından konuldu ve güzelce pipetaj yapıldı. Ependorflar 30 dk süreyle inkübatöre konuldu. Süre bitimini takiben 4x100 G devirde 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında oluşan süpernatant dökülerek üzerlerine 300 µl 1xPBS koyup güzelce pipetaj yapıldıktan sonra plate kuyucuklarına (Infinite 200 Pro, Avusturya) her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde hücreler bölündü. Plate readerda floresanlar 498 nm emisyon ve 522 nm eksitasyon (uyarım) dalga boylarında okunmuştur ve aradaki fark değer olarak belirlenmiştir (120). Değerler, kontrole kıyasla misli artış olarak verildi.

3.2.3.3. Kaspaz 3 ve 9 enzim aktiviteleri tayini

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarının hazırlanması için 2,5 ml kaspaz 3 ve kaspaz 9 un buffer ham solüsyonlarından 15 ml lik falkon tüplerine konuldu. Her 2 tampona da 2,5µl NP-40 (+23°C) kimyasalından ilave edildi, sonrasında vortekste karıştırıp floresan kaspaz DTT boyasından kaspaz 3 ve kaspaz 9 bufferlarının üzerine 10µl ve 2,5µl konulup güzelce vortekste karıştırıldı. İzole edilen granuloza hücreleri 150 µl 1xPBS solüsyonuyla sulandırıldıktan sonra her bir plate kuyucuğuna 15 µl olacak şekilde 10 kuyucuğa eşit bir şekilde konuldu. Üzerine de öncesinde hazırlamış olduğumuz kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarından 50µl konuldu ve sonrasında açığa çıkan enzimler (Infinite 200 Pro, Avusturya) cihazında 360 nm uyarılma ve 460 nm emilme dalga boylarında okunarak kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri değerlendirildi. (AC-

DEVD-AMC Kaspaz 3 ve AC-LEHD-AMC Kaspaz 9 için). Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi (121, 122).

3.2.3.4. Apoptozis analizi

İzole edilen granuloza hücreleri 150 µl 1xPBS ile sulandırıldı. Sonra her bir ependorfta 50 şer µl olacak şekilde hücreler 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950µl 1XPBS konuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 3-5µl apoptozis boyasından (Apopcentage dye 10 ml) ilave edildi ve 30 dk süreyle çalkalama cihazına konuldu. Çalkalama sonrası 3500 rpm de 5 dk santrfüj ettik ve üstte oluşan süpernatant (üstte oluşan hücresiz sıvı kısım) döküldü. Üzerine tekrar 1xPBS eklendi ve 200µl Apopcentage Release'den ilave edildi. Pipetaj yaptıktan sonra süpernatant alındı ve plate kuyucuklarımıza yerleştirerek 550 nm de Infinite 200 Pro (Avusturya) kuyucuk okuyucu cihazında okundu. Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi.

3.2.3.5. Mitokondriyal membran depolarizasyon tayini

Hücre içerisine Ca^{+2} iyon akışı, mitokondride depolarizasyon artışı yoluyla ROS üretimini artırmakta, artan hücre içi ROS miktarı, gerek hücre içi organale kapılarını açarak ve gerekse katyon kanallarına zarar vererek sitozolde Ca^{+2} miktarını artırmaktadır. Mitokondriye daha fazla Ca^{+2} girişi depolarizasyonu artırmakta ya hücre çalışması bozulmakta veya hücre apoptozise gitmektedir. Bu nedenle, mitokondriyal zar depolarizasyonu tayininin yapılması bu halkadaki zinciri tamamlayarak moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlamıştır.

Analizin yapılışı: Hücreler 0.001 mM JC-1 ile 37 °C de 15 dakika inkübe edildi (123). JC-1 boyası mitokondride depolarizasyon artışına paralel girişi

artmaktadır. JC-1 inkübasyon sonrası kırmızıdan yeşile doğru florasan artışı mitokondriyal depolarizasyonu göstermekte ve bu durum plate reader tarafından değişik dalga boylarında hemen peşi sıra cihaz tarafından otomatik olarak belirlenebilmektedir. Yeşil dalga boyları eksitasyon 485 ve emisyon 535 dalga boylarında belirlendi. Kırmızı dalga boyu değişimleri ise 540 nM (Eksitasyon) ile 590 nM (Emisyon) de belirlendi. Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

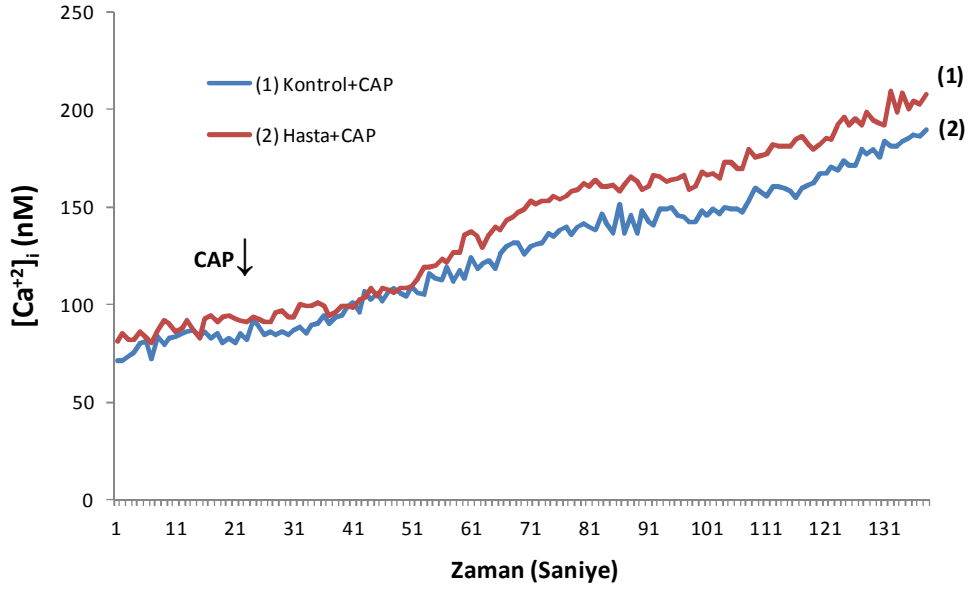
Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verilecektir. Granuloza hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS Inc. SPSS for Windows. Version 17.00, Chicago, 2009 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılacaktır. Gruplar arası fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi istatistiksel analizi ile değerlendirilecektir. Tüm istatistikî karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilecektir.

4. BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen 48 olgunun infertilite nedenlerine bakıldığında: 18 olguda erkek faktörü; 30 olguda polikistik over sendromu nedenli infertilite saptandı. Çalışmaya alınan olgular, kontrol (erkek infertilite grubu) ve hasta (PCOS) olmak üzere iki gruba ayrılarak istatistiksel analizler yapıldı. Erkek infertilitesine sahip olan 18 olguda hastanın yaş ortalaması $32,2 \pm 1,2$ iken PCOS olan 30 olguda yaş ortalaması ise $33,4 \pm 2,1$ olup ($p < 0,05$), gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

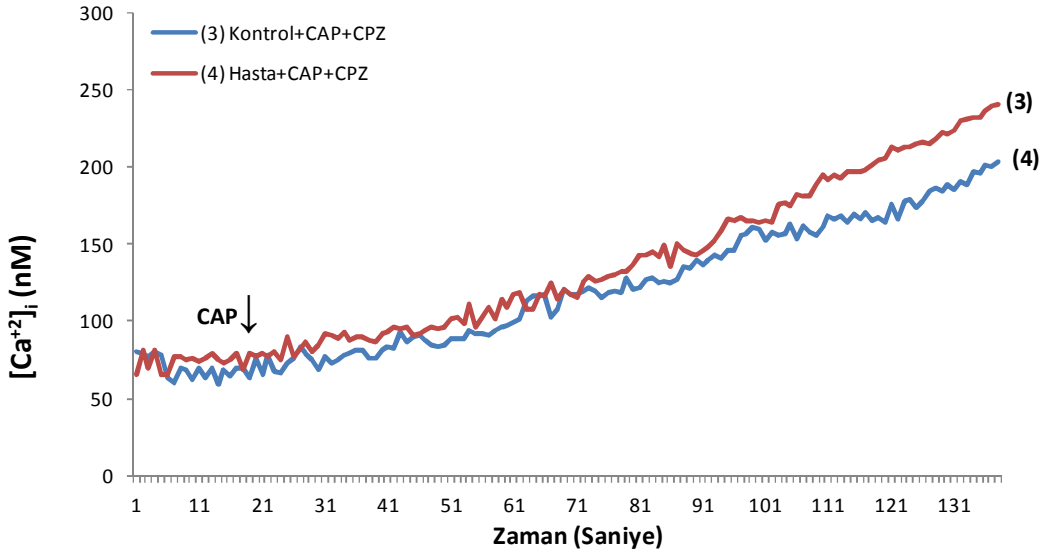
4.1. Gruplarda hücre içi serbest kalsiyum analizi sonuçları

TRPV1 kanalları yüksek ısı (≥ 43 °C), oksidatif stres, inflamasyon ve asidik pH da aktive olmaktadır. CAP kırmızı acı biberde yaygın olarak bulunmaktadır ve TRPV1 kanallarının uyarıcısı olarak kullanılmaktadır. Granuloza hücrelerinde hücre içi ROS ve Ca^{+2} artışının, granuloza hücrelerinin fizyolojik görevlerini yakından etkiledikleri iyi bilinmektedir. Hücre içerisine Ca^{+2} girişinin artışının TRPV1 kanal aracılı gerçekleşip gerçekleşmediğini test etmek için, granuloza hücreleri CAP ile uyarılarak CPZ ile bloke edildiler. Kontrol, kontrol+CAP, hasta+CAP ve hasta+CAP+CPZ gruplarının $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri çizgi grafiği olarak şekil 9-10-11 de gösterildi. Kontrol, kontrol+CAP, hasta+CAP ve hasta+CAP+CPZ gruplarının $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri sütun grafiği olarak grafik 1 de gösterildi. Bu sonuçlar incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin istatistiksel olarak ($p < 0,01$) önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. Kontrol+CAP ve kontrol+CAP+CPZ gruplarına kıyasla hasta+CAP+CPZ grubunun hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin yüksek olduğu ($p < 0,05$) gözlemlendi. Bu sonuçlar, granuloza hücrelerinde hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin arttığı ve bu artışın TRPV1 kanalları aracılığı ile gerçekleştiği gözlemlendi.

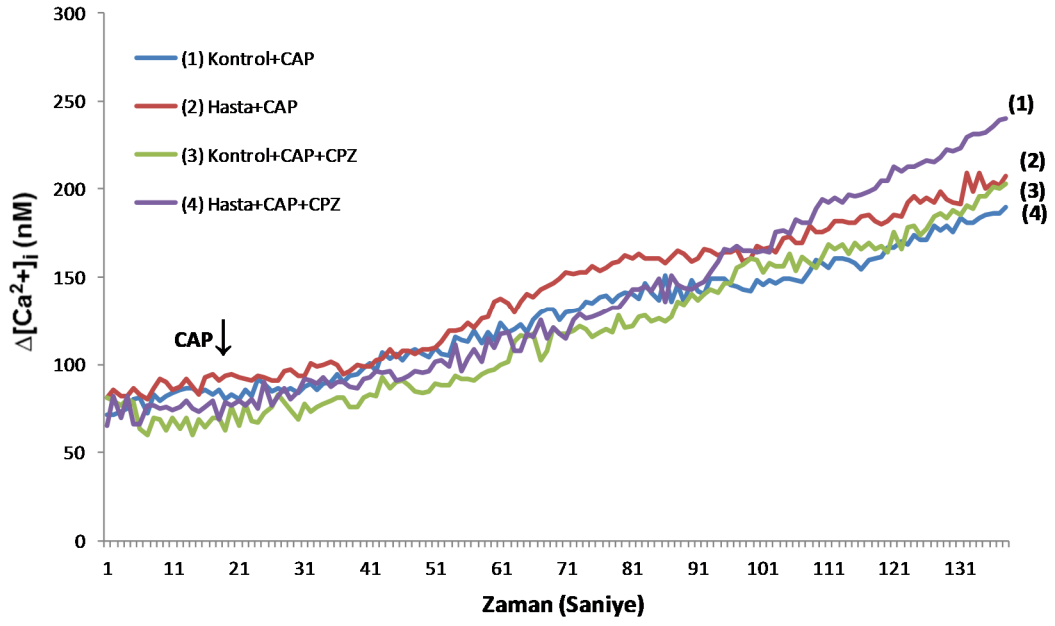


Şekil 9. Granuloza hücrelerinde kontrol ve hasta gruplarının hücre içi serbest

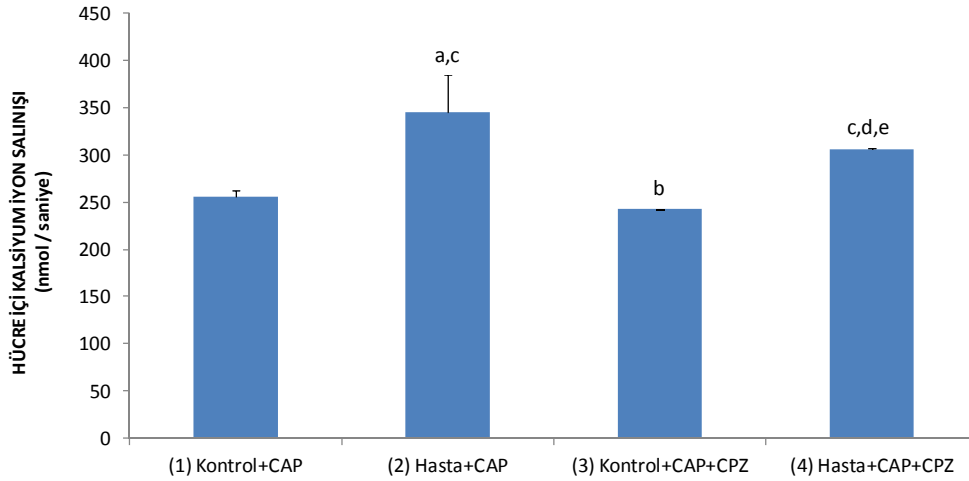
Ca²⁺ düzeyleri ([Ca²⁺]_i). (n=6).



Şekil 10. Granuloza hücrelerinde TRPV1 kanal blokörü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının hücre içi serbest Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) düzeyleri üzerine etkileri. (n=6).



Şekil 11. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokörü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri üzerine etkileri. (n=6). (Şekil 9 ve 10'un birlikte ifadesi)



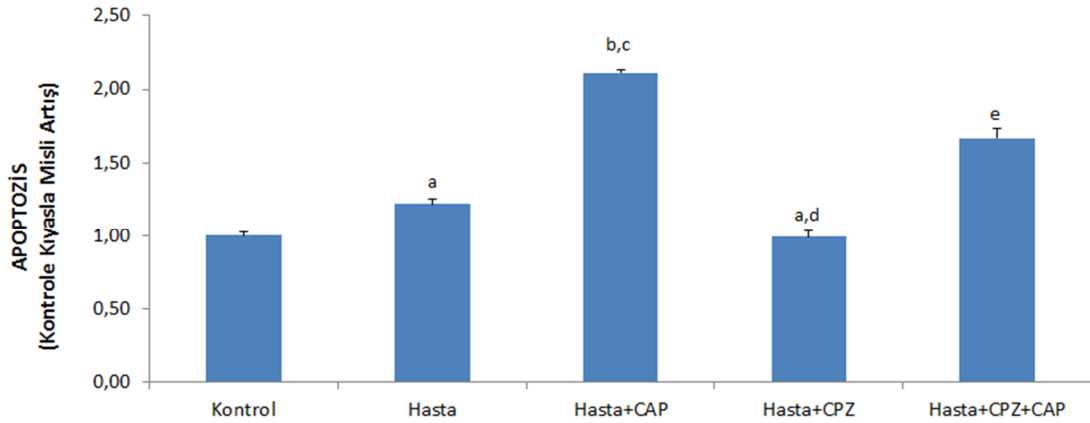
Grafik 1. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokörü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri üzerine etkileri. (n=6). ^ap < 0.01, ^cp < 0.05 ve kontrol grubuna kıyasla. ^bp < 0.01, ^dp < 0.05 ve Hasta+CAP grubuna kıyasla. ^ep < 0.05 ve Kontrol+CAP+CPZ grubuna kıyasla.

4.2. Gruplarda programlı hücre ölümü (Apoptozis), kaspaz 3 ve kaspaz 9 Sonuçları

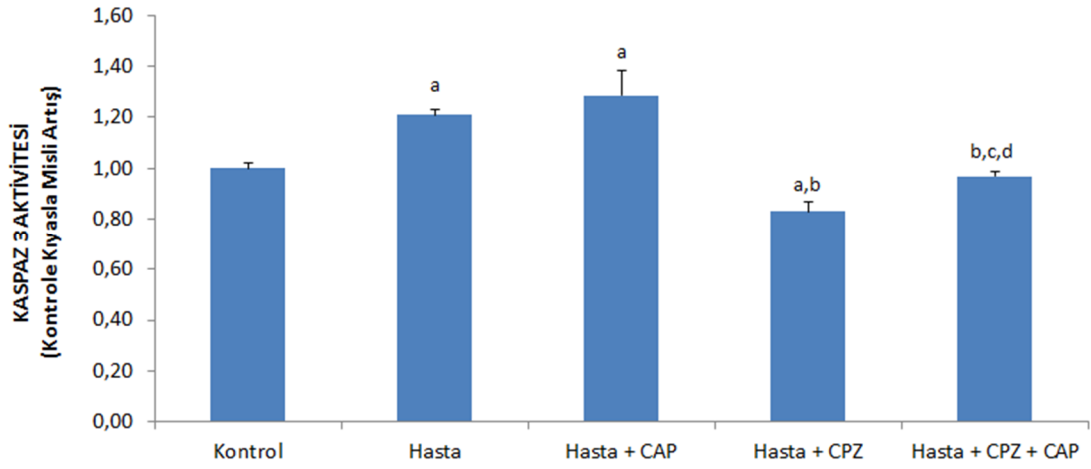
Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokörü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri üzerine etkileri sırasıyla, grafik 2-3-4 de gösterilmiştir.

Kontrol grubuna kıyasla, hasta grubunda apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri önemli düzeyde ($p < 0.05$) fazla olduğu gözlemlendi. Hasta grubu hücrelerinin CAP ile uyarılması sonucu apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri kontrol ve hasta grubuna kıyasla daha da arttığı gözlemlendi ($p < 0.001$). Bununla beraber apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri CPZ ile inkübe edilmesi sonucu apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri daha da azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$).

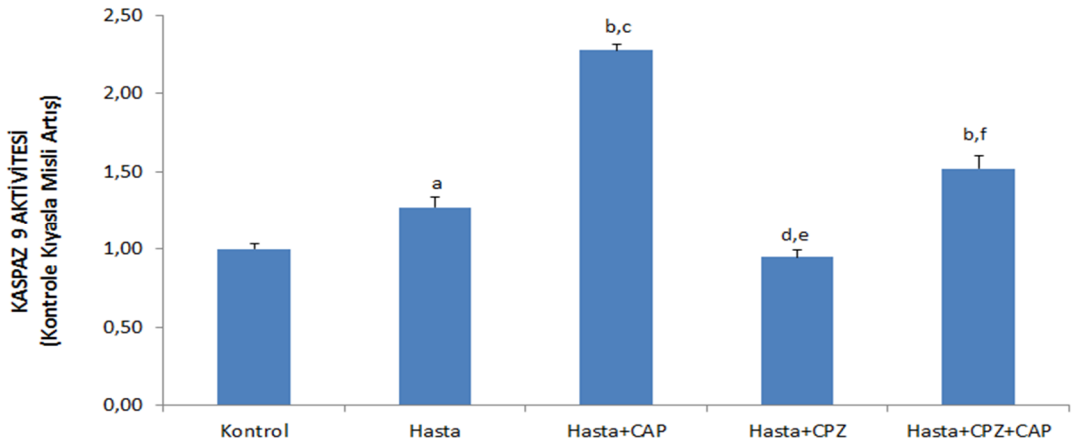
Bu sonuçlara göre, hasta granuloza hücrelerinde apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerlerinin TRPV1 kanal aracılı gerçekleştiği gözlemlendi.



Grafik 2. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokörü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının apoptozis düzeyleri üzerine etkileri. (n=6). ^ap < 0.05, ^bp < 0.001 ve kontrol grubuna kıyasla. ^cp < 0.001 ve Hasta grubuna kıyasla. ^dp < 0.001 ve Hasta+CAP grubuna kıyasla. ^ep < 0.001 ve Hasta+CPZ grubuna kıyasla.



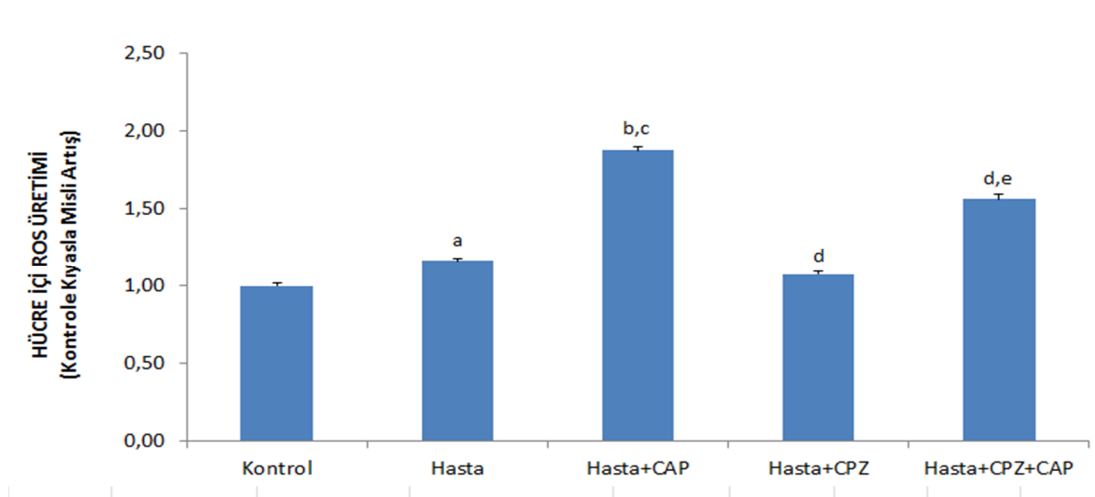
Grafik 3. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokörü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının kaspaz 3 aktivitesi üzerine etkileri. (n=6). ^ap < 0.05, ^bp < 0.001 ve kontrol grubuna kıyasla. ^cp < 0.001 ve Hasta grubuna kıyasla. ^dp < 0.001 ve Hasta+CAP grubuna kıyasla. ^dp < 0.05 ve Hasta+CPZ grubuna kıyasla.



Grafik 4. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokörü kapsazepin CPZ in kontrol ve hasta gruplarının kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkileri. (n=6). ^ap < 0.05, ^bp < 0.001 ve kontrol grubuna kıyasla. ^cp < 0.001, ^dp < 0.05 ve Hasta grubuna kıyasla. ^ep < 0.001 ve Hasta+CAP grubuna kıyasla. ^fp < 0.001 ve Hasta+CPZ grubuna kıyasla.

4.3. Gruplarda hücre içi ROS analizi sonuçları

ROS sonuçları grafik 5 de gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda ROS'un önemli düzeyde ($p < 0.05$) arttığı gözlemlendi. CAP TRPV1 kanal aktivatörüdür. Hasta grubunda granuloza hücrelerini CAP ile muamele edildiğinde ROS'u daha da artırdığı (kontrole göre) görüldü ($p < 0.001$). CPZ TRPV1 kanal blokürüdür. Hasta+CPZ grubuna kıyasla, hasta+CAP+CPZ ($p < 0,001$) gruplarında hücre içi ROS düzeylerinin önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlarda ROS üretiminde TRPV1 kanallarının önemini göstermektedir

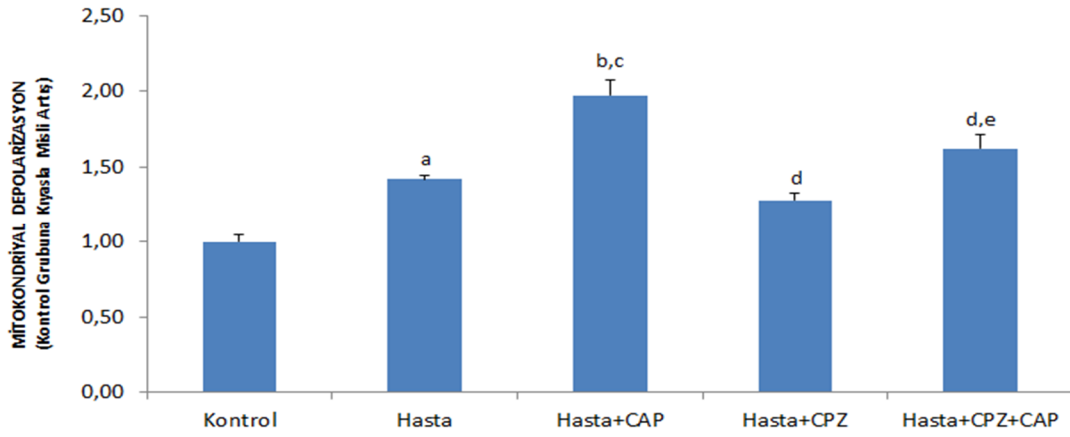


Grafik 5. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokürü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının hücre içi ROS üretimi üzerine etkileri. (n=6). ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.001$ ve kontrol grubuna kıyasla. ^c $p < 0.001$ ve Hasta grubuna kıyasla. ^d $p < 0.001$ ve Hasta+CAP grubuna kıyasla. ^e $p < 0.001$ ve Hasta+CPZ grubuna kıyasla.

4.4. Gruplarda mitokondriyal depolarizasyon analizi sonuçları

Mitokondriyal depolarizasyon analizi sonuçları grafik 6 da gösterilmiştir.

Kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda mitokondriyal depolarizasyonun önemli düzeyde ($p < 0.05$) arttığı gözlemlendi. CAP kalsiyum kanal aktivatörüdür. Hasta grubunda granuloza hücrelerini CAP ile muamele edildiğinde mitokondriyal depolarizasyonu daha da artırdığı (kontrole göre) görüldü ($p < 0.001$). CPZ, TRPV1 kanal blokürüdür. Hasta+CPZ grubuna kıyasla, hasta+CAP+CPZ ($p < 0,001$) gruplarında mitokondriyal depolarizasyon düzeylerinin önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlarda mitokondriyal depolarizasyon üretiminde TRPV1 kanallarının önemini göstermektedir.



Grafik 6. Granuloza hücrelerinde CAP ve TRPV1 kanal blokürü CPZ in kontrol ve hasta gruplarının mitokondriyal depolarizasyon oranı üzerine etkileri. (n=6). ^ap < 0.001, ^bp < 0.001 ve kontrol grubuna kıyasla. ^cp < 0.001 ve Hasta grubuna kıyasla. ^dp < 0.001 ve Hasta+CAP grubuna kıyasla. ^ep < 0.001 ve Hasta+CPZ grubuna kıyasla.

5. TARTIŞMA

İnfertilite, herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl süre ile gebe kalmamama durumu olarak tanımlanmaktadır. Toplumda çiftlerin yaklaşık %10-20'sini etkileyen çok boyutlu ciddi bir problemdir. Temel olarak erkek ve kadına bağlı birçok etmen infertilite de yer almaktadır (2). Son yıllarda infertiliteye yönelik tedavilerde çok ciddi adımlar atılmış olmasına rağmen (1) elde edilen başarı oranları istenilen seviyeye ulaşamamıştır. Üremeye yardımcı tedavilerde başarı oranlarını artırma yolundaki araştırmalar ise halen sürmektedir (3).

İnfertilite tedavisinde, üremeye yardımcı tedaviler kullanılarak kontrollü over hiperstimülasyonu yapıldığı halde, ovulatuvar bozukluklardan PCOS halen en sık karşılaşılan problemlerden biri iken (4) erkek infertilitesi oranları ise günden güne artmaktadır (5).

Granuloza hücreleri, ovaryan folikülün somatik hücrelerini oluşturur. Oosit kalitesinin dışı fertilitesi üzerinde anahtar bir rolü vardır. Kaliteli bir oosit oluşumu ve bu süreçte işleyen mekanizmalar ile ilgili halen kısıtlı bilgi mevcuttur (6- 10). Oositler folikül içerisinde olgunlaşıp geliştiklerinden granuloza hücreleri ile karşılıklı ve yoğun bir etkileşim içindedir (6 -14).

Hücrel bir çok işlevin yerine getirilmesinde iyonlar temel olarak görev almaktadır. Hayatın ilk basamağı olan fertilizasyondan başlayarak gen transkripsiyonu, hormon salınımı, hücrelerin farklılaşması, gelişmesi, nekroz ve apoptozla tanımlanabilecek hücre ölümü gibi birçok olaydan sorumlu olan bir hücre içi ikincil haberci olan kalsiyumun evrenselliği, birçok hücrel reaksiyonda üstlendiği görevden kaynaklanmaktadır. Hücre dışındaki Ca^{+2} iyon konsantrasyonu hücre içine oranla yaklaşık olarak 20.000 misli daha fazla olması (84) mikro düzeyde bakıldığında ise hücrelerdeki yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için de belli bir denge denkleminde bir takım iyon kanalları vasıtasıyla iki yönlü hareketi söz

konusudur. Hücre içerisinde çok kısa sürelerde değişen bu hassas denge hücre içi Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) sinyalini oluşturmaktadır.

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen “Apoptoz” geçmişten günümüze yapılan birçok araştırma sonucunda tanımlanabilmiştir. Gelişimin normal sürecinde fizyolojik olarak görülmekle birlikte bir denge içinde olmalıdır. Bu dengenin bozulması çeşitli patolojilere yol açabilir. Bu konuda birçok araştırmacı apoptozun düzenlenememesinin birçok insan patolojisi, kanserleri, otoimmün hastalıklar ve infertiliteye neden olduğunu saptamıştır (15).

Bilindiği gibi mitokondri protein, karbonhidrat ve yağların değerlendirilmesinde önemli bir hücre içi organelidir. Bu fizyolojik aktiviteler sırasında artık ürün olarak ROS oluşmaktadır. Kas hücrelerinde sarkoplazmik retikulum, sinir hücreleri gibi diğer hücrelerde endoplazmik retikulum, katyon kanalları aktivasyonu yoluyla sitozole akan Ca^{+2} iyonları mitokondride porların açılarak depolarizasyonu neden olarak ROS üretiminin daha da artmasına neden olmaktadır. Bu artan ROS TRPV1 ve voltaja duyarlı kalsiyum iyon kanallarını daha fazla açarak hücre dışından içine Ca^{+2} akışına neden olmaktadır. Bu zincirleme olaylar ya hücrelerin çalışmasını zorlaştırmakta veya hücreleri apoptozise götürmektedir (16, 17). Bütün bu patofizyolojik olaylarda oksidatif stres, kaspaz aktiviteleri, apoptozis, mitokondriyal depolarizasyon oranlarında değişiklikler gözlenmektedir.

Tez çalışmamda farklı infertilite nedenleri ile IVF sikluslarında tedavi gören hastalardan elde edilen granuloza hücrelerinde, oksidatif stresin, kalsiyum sinyalinin, apoptoz ve apoptotik yolların nasıl etkilendiğini ve TRPV1 kanallarının etkisinin olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık.

Markstom ve ark. (77)'de foliküler gelişimin tüm aşamalarında da apoptozun varlığından bahsetmişler ve preantral foliküllerden preovulatuvar foliküle kadar olan atrezide ise apoptozun granuloza hücrelerinde başladığını rapor etmişlerdir. Çeşitli araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda granuloza hücrelerindeki apoptotik cisimlerin bulunmasının IVF başarısında kötü prognozun belirlenmesinde prediktif olabileceğini bildirmiş, doğal sikluslarda granuloza hücrelerinde en düşük sayıda apoptotik cisim gözlemlendiğinden bahsetmiş (124, 125) ve hamile olan grupta apoptotik granuloza

hücre indeksi 0,01 den düşük bulmuşlardır (11, 21- 25), Toya ve ark. (126) yaptıkları bir çalışmada ise farklı infertilite türlerinde granuloza hücrelerinde apoptotik cisimlerin bulunuşunun erkek faktöründe en alt düzeyde iken diğer gruplarda yüksek olduğunu rapor etmiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında TRPV1 kanalları ile granuloza hücreleri ve kalsiyum mekanizmasına ilişkin bir çalışma tespit edilememiştir.

Hücrede ölüm kararı verildiği zaman apoptotik ölüm aracılarının koordinasyonu ile çok sayıda alt program aktive edilir. Kaspaz ailesi ve Bcl-2 ailesi en önemli apoptotik düzenleyici faktörlerdir. Sürecin başlangıcından sonuna kadar farklı kaspazlar rol almaktadır (76). Johnson (76) ve Glamoclija (127) sağlıklı foliküllerde kaspaz 3 inaktif formda bulunurken atretik foliküllerde aktif kaspaz 3 konsantrasyonunun arttığı ve kaspaz 3'ün gelişimde ve oositin kalitesinde de belirleyici olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer şekilde dondurulan granuloza hücrelerindeki apoptozda kaspaz 3-8-9'un etkin olduğunu bildirmişlerdir (128). Buna karşın Claveroa ve ark. (129) ICSI sikluslarında granuloza hücrelerindeki apoptozun oosit maturasyonu ve fertilizasyonunu değiştirmediğini belirtmiştir.

Yaptığım çalışma ile elde edilen sonuçlara bakıldığında mitokondriyal depolarizasyona bağlı olarak sitozole kalsiyum girişinin artarak apoptozun tetiklendiğini gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, hasta grubunda apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri önemli düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi. Hasta grubunun CAP ile uyarılması sonucu apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri kontrol ve hasta grubuna kıyasla daha da arttığı gözlemlendi. Bununla beraber apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri CPZ ile inkübe edilmesi sonucu apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri daha da azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlara göre, hasta granuloza hücrelerinde apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerlerinin TRPV1 kanal aracılı geręekleřtięi gözlemlendi.

Normal fizyolojik şartlar altında hücresel reaksiyonlar sonucunda oluşan serbest radikaller, ROS olarak adlandırılmaktadır. ROS'lar biręok antioksidan tamponlama mekanizması tarafından etkisiz hale getirilebilmekte ve ROS'lar ile tamponlama mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması ise oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Kadın üreme sisteminde serbest radikaller ve ROS apoptozda

zincir reaksiyonlar ile etki gösterir (130) ve ayrıca ROS ve antioksidanlar folikülogenezis, oosit maturasyonu, luteal regresyon ve fertilizasyonda fizyolojik rol oynarlar (2).

Yapılan bazı çalışmalarda infertilite de ROS üretiminin arttığı bildirilmiştir. Granuloza hücrelerinin antioksidanları üreterek oositi ROS'ların zararlı etkilerinden koruduğu belirlenmiştir. Çeşitli araştırmacılar yardımcı üreme tekniklerinde elde edilen başarı oranlarının gamet ve embriyo kalitesi tarafından etkilendiğini, foliküler sıvı ve granuloza hücrelerinin oositle yakın ilişkide olduklarından bunların incelenmesi ile elde edilen sonuçlar IVF başarısını tespit etmede kullanılabileceğini rapor etmiştir. Örneğin granuloza hücrelerindeki geliştirilmiş ROS üretimi düşük oosit fertilizasyon kabiliyeti, düşük embriyo kalitesi ve azalmış implantasyon oranları ile ilişkili bulunmuştur. Sonuçta oksidatif stres üreme ve gelişme patolojisi ile ilişkili gibi durmaktadır. Granuloza hücrelerindeki antioksidan enzimler oosit maturasyonunu düzenler ve yardımcı üreme tekniklerindeki başarı oranları ile ilişkilidir. Üreme ve fertilizasyonun düzenlenmesinde ROS ve antioksidanların önemi dikkate alınmalıdır (26- 31, 125)

Yine tez çalışmamda elde ettiğimiz sonuçlara göre kontrol grubuna kıyasla hasta grubunu granuloza hücrelerinde sitozole Ca^{+2} girişinin arttığı gözlemlenirken buna paralel ROS üretimininde arttığı gözlemlendi. Bu Ca^{+2} girişinin TRPV1 kanal aracılı mı olduğunu belirlemek için CAP ile inkübe edilip CPZ ile bloke edildiler. Literatürde granuloza hücreleri ROS ve TRPV1 aracılı kalsiyum girişinin birlikte araştırıldığı çalışmalara rastlamadık.

Hücre içi ikincil haberci sisteminin en önemli elemanlarından biri olan Ca^{+2} hücrel birçok hayati fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Chen ve ark. (131) kalsiyum mobilizasyonunun germ hücre hattı gelişiminde, döllenme fonksiyonu ve üremede son derece önemli olduğunu rapor etmiştir, benzer şekilde Sun ve Machaca (132) Ca^{+2} düzeyindeki düzensizliklerin oositlerde geri dönüşümsüz bir etki gösterdiğini söylemektedir. Ayrıca çeşitli araştırmacılar kalsiyumun granuloza hücrelerinde mayozun ilerlemesi ve devamı ile maturasyon ve döllenmede etkili olduğu düşünselerde de ek çalışmalara ihtiyaç bulunduğunu belirtmişlerdir (32 -35) ve Bernabo ve ark. (36) manyetik alana maruz

kalan domuz granuloza hücrelerinde intraselüler kalsiyum artışına bağlı morfoloji, metabolizma, fonksiyon bozuklukları ve üreme bozuklukları görüldüğünü bildirmişler (143). Nazıroğlu (133)'de sitosoldeki Ca^{+2} düzeyinin azalmasıyla mitokondriyal depolarizasyonun azaldığını ve serbest radikal oluşumunda da azaldığından bahsetmiştir. Buna rağmen Tola ve ark. (134) fertilize olan oositlerden alınan granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} 'u yüksek bulmuşlardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, granuloza hücreleri ve oositler arasındaki kanalların, sadece metabolit transferinde önemli olmadığını, aynı zamanda oositin mayotik duraklamasının sürdürülmesinde de önemli rol üstlendiğini göstermektedir. Bu kanalların önemi ise günden güne önem artmaktadır (4, 18, 20, 45,142).

Yaptığımız literatür çalışmalarında TRPV1 aracılı kalsiyum girişini granuloza hücrelerinde gösteren bir çalışmaya rastlamadık ancak Shukla ve ark (135) çeşitli kation kanallarının sperm fizyolojisi ve fertilite de etkili olduğunu bunlardan bir tanesinin de TRP kanalı olduğunu söylemiştir. Benzer şekilde Köse ve Nazıroğlu (37)'te PCOS hastalarında kalsiyum sinyalinin TRPV1 kanalı yoluyla etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Laporta ve ark. (136, 141) tavuk granuloza hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada kalsiyumun L tip kanallar aracılığı ile ovaryum gelişiminde etkili olduğundan bahsetmiştir, ayrıca Montalbetti ve ark. (137) gebelikteki ROS'un insan sinsityoblastlarındaki TRPP2 (PC2) kanalları yoluyla aktive olabileceğini bildirmişlerdir, benzer şekilde Teilmann ve ark. (138) PC1-2'nin fare granuloza hücrelerinde ovaryan folikülerin gelişiminde ve olgunlaşmasında önemli olduğunu bildirmişlerdir. Yine kuşlarda yapılan bir çalışmada T ve L-tip Ca^{+2} kanallarının varlığı gösterilmiştir (139).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında sonuçlar incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. Kontrol+CAP ve Kontrol+CAP+CPZ gruplarına kıyasla Hasta+CAP+CPZ grubunun hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, granuloza hücrelerinde hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin arttığı ve bu artışın TRPV1 kanalları aracılığı ile gerçekleştiğini göstermektedir.

Tez çalışmamda farklı infertilite nedenleri ile IVF sikluslarında tedavi gören hastalardan elde edilen granuloza hücrelerinde, oksidatif stresin, kalsiyum sinyalinin, apoptoz ve apoptotik yolakların nasıl etkilendiğini ve TRPV1 kanallarının bu etkideki rolünü gördük.

TRPV1 kanalları yüksek ısı ve oksidatif stresle aktive oldukları iyi bilinmesine rağmen, bizim yaptığımız literatür taramalarında, granuloza hücreleri ile TRPV1 kanalları arasındaki etkileşime dair bir bildiri mevcut değildi. Bu çalışmamızda, oksidatif stresin neden olduğu Ca^{+2} akışında TRPV1 kanallarının da rolünün olduğu gözlemlendi.

İnfertilitede, hücre içerisine Ca^{+2} akışının artışı ve buna bağlı olarak mitokondriyal depolarizasyon artışı, serbest oksijen radikallerinin üretimini artırdığı, sonuç olarak da kaspaz aktivasyonlarını artırarak apoptozisi tetiklediği bilinmektedir. Fakat granuloza hücrelerinde bir etkisinin varlığı bu çalışmamızla literatürde ilk kez tespit edilmiş olup neticede granuloza hücrelerinden sitozole Ca^{+2} akışının artışının, hücre içi ROS üretimini, apoptoz, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerini artırdığı gözlemlendi.

Bu sonuçlara göre çeşitli infertilite nedenlerinde TRPV1 kanallarının önemi gözlemlendi. Çalışmada Ca^{+2} , apoptozis, hücre içi ROS sonuçları incelendiğinde uyum içerisinde olduğu gözlenmektedir. Diğer bir ifadeyle, hücre içi aşırı Ca^{+2} iyon akışının hücre canlılığını azalttığı, ROS üretimini artırdığı ve hücre ölümünü tetiklediği gözlemlendi.

Bu etkilerin değerlendirilmesinin belki de halen karışık bir etyolojiye sahip olan infertilite tedavilerinde gebelik ve implantasyon oranlarını artırma ve başarı yönünde katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

ÖZET

IVF İLE ELDE EDİLEN GRANULOZA HÜCRELERİNDE APOPİTOZ, KALSİYUM SİNYALİ VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnfertilite, herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl süre ile gebe kalmamama durumu olarak tanımlanır ve çok boyutlu ciddi bir problemdir. Granuloza hücreleri, ovaryan folikülün somatik hücreleridir. Oositler folikül içerisinde olgunlaşp geliştiklerinden granuloza hücreleri ile karşılıklı ve yoğun bir etkileşim içindedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, granuloza hücreleri ve oositler arasındaki kanalların önemli roller üstlendiğini göstermektedir.

PCOS (hasta) ve erkek infertilitesi (kontrol) nedeniyle tedavi gören IVF hastalarından elde edilen granuloza hücrelerinde, oksidatif stresin, kalsiyum sinyalinin, apoptoz ve apoptotik yolların nasıl etkilendiğini ve TRPV1 kanallarının etkisinin olup olmadığını değerlendirdik.

Bu tez çalışmasında sonuçlar incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda hücre içi kalsiyum düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. Kontrol+CAP ve Kontrol+CAP+CPZ gruplarına kıyasla Hasta+CAP+CPZ grubunun hücre içi kalsiyum düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, granuloza hücrelerinde hücre içi kalsiyum düzeylerinin arttığı ve bu artışın TRPV1 kanalları aracılığı ile gerçekleştiği gözlemlendi. Ayrıca infertilitede, hücre içerisine Ca^{+2} akışının artışı ve buna bağlı olarak mitokondriyal depolarizasyon artışı, serbest oksijen radikallerinin üretimini artırdığı, sonuç olarak da kaspaz aktivasyonlarını artırarak apoptozu tetiklediği iyi bilinmesine rağmen granuloza hücrelerinde bu etkinin varlığı bu çalışmamızla literatürde ilk kez tespit edilmiş olup neticede granuloza hücrelerinden sitozole Ca^{+2} akışının artışının, hücre içi ROS üretimini, apoptoz, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerini artırdığı gözlemlendi.

Bu sonuçlara göre çeşitli infertilite nedenlerinde TRPV1 kanallarının önemi gözlemlendi. Çalışmada Ca^{+2} , apoptozis, hücre içi ROS sonuçları incelendiğinde uyum içerisinde olduğu gözlenmektedir. Diğer bir ifadeyle, hücre içi aşırı Ca^{+2} iyon akışının hücre canlılığını azalttığı, ROS üretimini artırdığı ve hücre ölümünü tetiklediği gözlemlendi.

Anahtar sözcükler: granuloza hücreleri, kalsiyum sinyali, oksidatif stres ve apoptoz

ABSTRACT

EVALUATING APOPTOSIS, CALCIUM SIGNAL AND OXIDATIVE STRESS MARKERS ON GRANULOSA CELLS OBTAINED BY IVF

Infertility is defined as the failure to conceive a recognized pregnancy after 1 year of unprotected intercourse and its multidimensional serious problem. Granulosa cells are somatic cells of ovarian follicle. Because of oocytes matured and evolved in follicular, they are in intense interaction with granulosa cells. In recent years, studies show that the channels between granulosa cells and oocytes have important roles.

We evaluated oxidative stress, calcium signal and apoptosis in granulosa cells, obtained from PCOS (patients) and male infertility (control) treated for IVF, affected by how and TRPV1 channels whether influence.

When examining the results in this thesis, in the patient group compared to the control group, a statistically significant level of intracellular calcium levels was observed to increase. Control CAP and control+CAP+CPZ group compared to the patient group+CAP+CPZ had higher levels of intracellular calcium were observed. These results showed that, intracellular calcium levels increase in granulosa cells and this increase were observed to take place by TRPV1 channels. Also infertility, increase of Ca^{2+} flow into cell and consequently mitochondrial depolarization increases, the free oxygen radicals production increases, as a result, caspase activation by increasing apoptosis triggered well known, but this effect of granulosa cells in our study is the first report are located and consequently the flow of Ca^{2+} increase from granulosa cells into the cytosol, this increases intracellular ROS production, apoptosis, caspase 3 and caspase 9 activity.

According to these results, the importances of TRPV1 channels varieties of infertility were observed. In this study, Ca^{+2} , apoptosis, intracellular ROS results are observed to be in harmony. In other words, excess of intracellular Ca^{2+} ions flow reduced cell viability, increased ROS production and induced cell death was observed.

Key words: granulosa cell, calcium signal, oxidative stress and apoptosis

KAYNAKLAR

1. Cramer DW, Liberman RF, Powers D, Hornstein MD, Meshane P and Barbieri RL. Recent trends in assisted reproductive techniques and associated outcomes. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 61-66.
2. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3: 28.
3. Lindeberg M. Molecular and morphological studies of folliculogenesis, oocyte maturation and embryogenesis in humans. Karolinska Institutet. Department of Clinical Sciences Intervention and Technology, Division of Obstetric and Gynecology, Thesis for Doctoral Degree; Stockholm, Sweden 2008.
4. Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, Bafaro G and Colacurci N. Female poor responders. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000; 161: 59-66.
5. Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* 6th ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 1999: 487-522, 1013-1132.
6. Canipari R. Oocyte- granulosa cell interactions. *Human Reproduction Update* 2000; 6(3): 279-289.
7. Delibaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler (Sperm/Oosit) Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim. Serono Yayınları: 2000.
8. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 2004; 82-83: 431-446.
9. Pangas SA. Growth factors in ovarian development. *Semin Reprod Med* 2007; 25: 225-234.
10. Çelik Ö, Yıldırım A. Folikülojenesisin moleküler temelleri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2010; 17(1): 59-63.
11. Suh CS, Jee BC, Choi YM, Kim JG, Lee JY, Moon SY and Kim SH. Prognostic implication of apoptosis in human luteinized granulosa cells during IVF-ET. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2002; 19(5): 209-214.

12. Senbon S, Hirao Y, Miyano T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reproduction and Development* 2003; 49(4): 259-269.
13. Parakh TN, Hernandez JA, Grammer JC, Weck J, Hunsicker-Dunn M, Zeleznik AJ and Nilson JH. Follicle-stimulating hormone/ cAMP regulation of aromatase gene expression requires β - catenin. *PNAS* 2006; 103(33): 12435-12440.
14. Luo W and Wildbank MC. Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction* 2006; 75: 217-225.
15. Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005; 21: 35-56.
16. Nazıroğlu M. Molecular Mechanisms of Vitamin E on Intracellular Signaling Pathways in Brain. In *Reactive Oxygen Species and Diseases*. 1st Ed. ed. Laszlo Goth, India: Research Signpost Press, 2007: p. 239-256.
17. Nazıroğlu M, Dikici DM, Dursun S. Role of Oxidative Stress and Ca^{2+} Signaling on Molecular Pathways of Neuropathic Pain in Diabetes: Focus on TRP Channels. *Neurochem Res*. 2012c; 37: 2065-2075.
18. Madankumar R, Cohen MA, and Brenner SH. Age and fertility. *Prim Care Update Ob/Gyns* 2003; 10(6): 270-273.
19. Gordon DJ, Speroff L. Çeviri: Işık AZ, Vicdan K. *Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite El Kitabı*. Ankara. Nobel Tıp Kitapevleri: 2003: s.431-440.
20. Serdaroğlu H. İnfertilite. İçinde: *Jinekoloji*. Berkman S, Topuz S. Eds. 1.Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri 2004: s.260-266.
21. Nakahara R, Ohta N, Saito H, Takahashi T, Saito T, Hiroi M et al. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict in vitro fertilization prognosis of ova from patients participating programs. *Fertility and Sterility* 1997; 68: 312-7.
22. Oosterhuis GJ, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1998 Oct;70(4):747-9.

23. Sifer C, Benifla JL, Branger M, Devaux A, Brun-Vezinet F, Madelenat P, Feldmann G. Effects of hepatitis C virus on the apoptosis percentage of granulosa cells in vivo in women undergoing IVF: preliminary results. *Hum Reprod.* 2002 Jul;17(7):1773-6.
24. Benifla JL, Sifer C, Bringuier AF, Blanc-Layrac G, Camus E, Madelenat P, Feldmann G. Induced apoptosis and expression of related proteins in granulosa cells from women undergoing IVF: a preliminary study. *Hum Reprod.* 2002 Apr;17(4):916-20.
25. Feldmann G, Benifla JL, Madelenat P. Apoptosis of granulosa cells as a predictive marker of in vitro fertilization success?. *Gynecol Obstet Fertil.* 2006 Jul-Aug;34(7-8):574-82.
26. Tarin JJ. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 717–724.
27. Seino T, Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Kurachi H. Eight-hydroxy-2-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization embryo transfer program. *Fertil Steril* 2002; 77: 1184–1190.
28. 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; 45(5): 314-20
29. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S, Reznick AZ, Ishai D, Lahav-Baratz S, Shiloh H, Koifman M, Dirnfeld M. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 82: 1171–1176.
30. Abhay KS, Ratna C, Baidyanath C, Koel C, Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF, *Reproductive Toxicology* 2013;42: 116– 124
31. Karuputhula NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF. *Syst Biol Reprod Med.* 2013; 59(2): 91-98. doi:10.3109/19396368.2012.743197.
32. Homa ST. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol Reprod Dev* 1995;

33. He CL, Damiani P, Parys JB, Fissore RA. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 1997; 57: 1245–1255.
34. Silvestre F, Boni R, Fissore RA, Tosti E. Ca²⁺ signaling during maturation of cumulus-oocyte complex in mammals. *Mol Reprod Dev.* 2011; 78(10-11):744-56. doi: 10.1002/mrd.21332. Epub 2011 Jun 8.
35. Gioia L, Saponaro I, Bernabo N, Tettamanti E, Mattioli M, Barboni B. Chronic exposure to a 2mT static magnetic field affects the morphology, the metabolism and the function of in vitro cultured swine granulosa cells. *Electromagn Biol Med* 2013; 32(4): 536–550.
36. Bernabò N, Saponaro I, Tettamanti E, Mattioli M, Barboni B. Acute exposure to a 2 mT static magnetic field affects ionic homeostasis of in vitro grown porcine granulosa cells. *Bioelectromagnetics.* 2014; 35(3): 231-4. doi: 10.1002/bem.21838.
37. Köse SA, Nazıroğlu M. Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Biol Trace Elem Res.* 2014; 158(2): 136-142. doi: 10.1007/s12011-014-9929-3.
38. Shoham Z, Di Carlo C, Patel A, Conway GS, Jacobs HS. Is it possible to run a successful ovulation induction program based solely on ultrasound monitoring? The importance of endometrial measurements. *Fertil Steril* 1991; 56: 836-841.
39. Gomel VUB, Yarali H. Investigation of the infertile couple. In *Reproductive Endocrinology and Infertility* eds. Aksel S. Beksaç, MS. Ankara: Medical Network, 1993: p.143-155.
40. Kışnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Öneroğlu LS. Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi.* Ed. Kışnişçi HA. Ankara: Güneş, 1996: s.1287.
41. Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod* 1998; 13: 1532- 1539.
42. Kavlak O, Saruhan A. İnfertil kadınlarda yalnızlık düzeyi ve bunu etkileyen faktörlerin incelenmesi. *Ege Tıp Dergisi* 2002; 41(4): 229-232.
43. Şencan D, Göksedef PÇ, Görgen H, Çetin A, Dane C. İnfertil olgularda uterin kavitenin değerlendirilmesi. *Haseki Tıp Bülteni* 2006; 44(3): 121-125.

44. Vicdan K, Işık AZ. İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanüpilasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Ankara, Çağdaş Medikal Yayın Dağıtım; 1999.
45. Velde ER, Imani B, Eijkemans MJ, Habbema JD, Fauser BC. Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.*1998; 83(7): 2361-5.
46. Bankowski BJ, Hearne AE, Lambrov NC, Fox HE, Walach EE. Çeviri editörleri:
47. Imani B, Eijkemans MJC, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility. *Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(7): 2361-2365.
48. Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. *Novak's Gynecology 12th Edition* Egypt: Mass; 1996: p.837.
49. Hugheston PE. Morphology and morphogenesis of Stein-Leventhal ovary. *Obstet Gynec Survey* 1982; 37: 59-62.
50. Rebor RW. Gonadotropin secretion in PCOS. *Seminars Reprod Endoc* 1984; 2: 223.
51. Waldstreicher J, Santoro NF, Hail JE, Filicori M. Hyperfunction of the hypothalamicpituitary axis in women with PCOS; indirect evidence of partialgonadotropin desensitization. *J Clin Endoc Metab* 1988; 66: 165-169.
52. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Stenkampf MP, Efficacy of treatment of unexplained infertility, *Fertil Steril* 1998; 70 (2): 207-213.
53. Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol.* 2002; 4: 41-49.
54. WHO 2010, Semen analysis: spermogram according to WHO 2010 criteria.
55. Barbieri RL, Female infertility. In Strauss FJ, Barbieri RL (eds). *Reproductive endocrinology*. Pennsylvania: Elsevier Inc, 5th ed.2004: p 839-873.
56. Schlegel PN, Sarah KG. In vitro fertilization for male factor infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82(3): 709-716.
57. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji (Türkçe Çeviri) 9. Baskı*. Ankara: PalmeYayıncılık; 2005, s.22-340.

58. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi (Türkçe Çeviri) 6. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri,2002: s.22-323.
59. Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in woman; variations at different ages. Acta Anat (Basel) 1952; 14: 108-123.
60. Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human reproduction I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. Hum. Reprod Update 1997; 3: 281- 295.
61. Junquera LC, Carneiro J. Basic Histology Text and Atlas.10th ed. USA: McGraw-Hill: 2003: p. 449-457.
62. Kierszenbaum A L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Türkçe Çeviri). Palme Yayıncılık. 2006.
63. Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. Özel Histoloji 2.bs. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi, 2007.
64. Ben Cherit A, Gotlieb L, Wong PY, Casper RF. Ovarian response to recombinant human follicle-stimulating hormone in luteinizing hormone depleted women: examination of two cell, two gonadotropin theory. Fertil. Steril. 1996; 65: 711-717.
65. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Philadelphia: Saunders; 2001, s.382-402.
66. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology a Text and Atlas, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins 2003, s.678-695.
67. Bükülmez O, Arici A. Assessment of ovarian reserve, Curr Opin Obstet Gynecol 2004; 16(3): 231-237.
68. Rutherford AJ, Strauss JF, Van A, Molecular biology in reproductive medicine: Fauser BCJM,; Parthenon Publishing Group Inc. New York – 1999
69. Kerr J.F.R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. Toxicology. 2002;181-182: 471-74.
70. Majno G. and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. American Journal of Pathology. 1995; 146: 3-15.
71. Hengartner M.O. The Biochemistry Of Apoptosis. Nature. 2000; 407 (6805):770-776.
72. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007; 35(4): 495–516.

73. Fengzhi L. Apoptosis. Oncology for Scientists. Hilleboe Auditorium:2006
<http://hosted2.roswellpark.org/o4s/slideshows/fall2006/Apoptosis%20oncology%20class%20talk%20V2.pdf>.
74. Igney FH. and Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2 (4): 277-288.
75. Apoptoz mekanizmaları (www.ecdo.eu/course.ECDO.2007).
76. Johnson AL. Caspase mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reprod.* 2002; 124: 19-27.
77. Markstrom E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. *Reprod.*2002; 123: 23-30.
78. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and Calcium signalling. *Nature*. 1993; 361(6410): 315-325.
79. Petersen OH, Petersen CC, Kasai H. Calcium and hormone action. *Annu Rev Physiol.* 1994; 56: 297-319.
80. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature* 1998; 395(6703): 645-648.
81. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Signal transduction. The Calcium entry pas de deux. *Science*, 2000a; 287(5458): 1604-1605.
82. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García AG, García-Sancho 82. J, Alvarez J. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(2): 57-61.
83. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of Calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000b; 1: 11-21.
84. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(7): 517-529.
85. Berridge MJ. Capacitative Calcium entry. *Biochem J.* 1995; 312 (Pt1): 1-11.
86. Trepakova ES, Csutora P, Hunton DL, Marchase RB, Cohen RA, Bolotina VM. Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000; 275 (34): 26158-26163.

87. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. Calcium signalling-an overview. *Semin Cell Dev Biol.* 2001; 12(1): 3-10.
88. Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L. Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(26): 14955-14960.
89. Minke B. TRP channels and Ca^{2+} signaling. *Cell Calcium.* 2006 Sep; 40(3): 261-75.
90. Katz B, Minke B. Drosophila photoreceptors and signaling mechanisms. *Front Cell Neurosci.* 2009; 3: 2.
91. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426: 517-524.
92. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP Channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Therap* 2008; 118: 337-351.
93. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1): 165-217.
94. Özgül C. Arka kök gangliyon hücrelerinde oksidatif stresle aktive edilen TRPM2 katyon kanallarının inhibisyonunda n-asetil sisteinin etkisinin, patch-clamp sistemi ile araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu), 2013
95. Övey İS. Homosisteinin hipokampus kalsiyum sinyali, apoptozis, TRPV1 ve TRPM2 katyon kanalları üzerine etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Isparta, (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu), 2013
96. Taylor-Clark TE, Udem BJ. Sensing pulmonary oxidative stress by lung vagal afferents. *T Respir Physiol Neurobiol.* 2011; 178(3):406-413.
97. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997; 389(6653): 816-24.

98. Susankova K, Tousova K, Vyklicky L, Teisinger J, Vlachova V. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol Pharmacol.* 2006; 70(1):383-394.
99. Jin Y, Kim DK, Khil LY, Oh U, Kim J, Kwak J Thimerosal decreases TRPV1 activity by oxidation of extracellular sulfhydryl residues. *2004 Neurosci Lett* 369: 250-255.
100. Chuang HH, Lin S. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009. 106: 20097-20102.
101. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49(3): 481-93.
102. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci.* 2000; 30(2): 145-158.
103. Vladimirov YA, Proskurnina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Mosc).* 2009; 74(13): 1545-1566.
104. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3: 30-39.
105. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33(2): 110-118.
106. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31(2): 51-6.
107. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS.* 2007; 115(2): 81-103.
108. Gümüştaş MK, Atukeren P. Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklar ile ilişkisi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi* 2008; 62: 329-340.
109. Erdal N, Altunkaynak Y, Altunkaynak E, Öztürk M, Mutluay B, Köksal A, Baybaş S. Migrenli Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Düşünen Adam* 2005; 18(3): 129-135.
110. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi,* 2008; 35(3): 211-5.
111. Halliwell B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol.* 1984; 62 (2): 71-77.

112. Klouche K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud JJ, Cristol JP. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. *Eur J Clin Invest* 2004; 34(9): 619-625.
113. Kleinová M, Hewitt M, Brezová V, Madden JC, Cronin MT, Valko M. Antioxidant properties of caROSenoids: QSAR prediction of their redox potentials. *Gen Physiol Biophys* 2007; 26(2): 97-103.
114. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot.* 2003; 91: 179-194.
115. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 136-347.
116. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
117. Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress. *Neurochem Res.* 2012; 37(8): 1631-1638.
118. Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol.* 2009; 232(1-3): 15-23. doi: 10. 1007/s00232-009-9212-2.
119. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985; 260 (6): 3440-3450.
120. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(5-6): 612-616.
121. Espino J, Bejarano I, Ortiz A, Lozano GM, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB. Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2010; 94(5): 1915-1917. doi: 10. 1016/j.fertnstert.2009.12.082.
122. Espino J, Ortiz Á, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, García JF, Rodríguez AB, Pariente JA. Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertil Steril.* 2011; 95(7): 2290-2296. doi: 10. 1016/j.fertnstert.2011.03.063.

123. Espino J, Mediero M, Lozano GM, Bejarano I, Ortiz A, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB. Reduced levels of intracellular calcium releasing in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7: 11. doi: 10.1186/1477-7827-7-11.
124. Bates BA, Detterbeck FC, Bernard SA, Qaqish BF, Tepper JE. Concurrent radiation therapy and chemotherapy followed by esophagectomy for localized esophageal carcinoma. *J Clin Oncol*. 1996 Jan;14(1):156-63.
125. 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 (2-3): 91-97.
126. Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 2000; 73(2): 344-50.
127. Glamoclija V, Vilović K, Saraga-Babić M, Baranović A, Sapunar D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2005; 83(2): 426-31.
128. Zhang JM, Wang HC, Wang HX, Ruan LH, Zhang YM, Li JT, Tian S, Zhang YC. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Jan;166(1):52-5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.09.011.
129. Clavero A, Castilla JA, Núñez AI, García-Peña ML, Maldonado V, Fontes J, Mendoza N, Martinez L. Apoptosis in human granulosa cells after induction of ovulation in women participating in an intracytoplasmic sperm injection program. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Oct 10;110(2):181-5.
130. Miller JE, Smith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Hum Reprod*. 2001; 16(5):918-24.
131. Chen H, Kui C, Chan HC. Ca⁽²⁺⁾ mobilization in cumulus cells: role in oocyte maturation and acrosome reaction. *Cell Calcium*. 2013 Jan;53(1):68-75. doi: 10.1016/j.ceca.2012.11.007.

132. Sun L, Machaca K. Ca²⁺(cyt) negatively regulates the initiation of oocyte maturation. *J Cell Biol* 2004; 165(1):63-75.
133. Naziroglu M. TRPM2 Cation Channels, Oxidative Stress and Neurological Diseases: Where Are We Now? *Neurochem Res*. 2011; 36(3): 355-366.
134. Tola EN, Mungan MT, Uğuz AC, Naziroğlu M. Intracellular Ca²⁺ and antioxidant values induced positive effect on fertilisation ratio and oocyte quality of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilisation. *Reprod Fertil Dev*. 2013; 25(5): 746-752. doi: 10. 1071/RD12144.
135. Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. *J Androl*. 2012; 33(5): 777-88.
136. Luca L, Elisabetta M, Nicoletta CS, Angela MM, Girolamo Di M, Antonia Z. A functional study on L-type calcium channels in granulosa cells of small follicles in laying and forced molt hens, *Animal Reproduction Science* 2011;126(3-4): 265–270.
137. Montalbetti N, Cantero MR, Dalghi MG, Cantiello HF. Reactive oxygen species inhibit polycystin-2 (TRPP2) cation channel activity in term human syncytiotrophoblast. 2008 *Placenta*; 29(6): 510-8. doi: 10. 1016/j.placenta. 2008.02.015.
138. Teilmann SC, Byskov AG, Pedersen PA, Wheatley DN, Pazour GJ, and Christensen ST. Localization of Transient Receptor Potential Ion Channels in Primary and Motile Cilia of the Female Murine Reproductive Organs, *Molecular Reproduction and Development* 2005; 71: 444–452.
139. Elikplimi KA, Wuxuan Q, Stanley GR, Effect of basal lamina of ovarian follicle on T- and L-type Ca²⁺ currents in differentiated granulosa cells, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2002; 282(1): E184-E196
140. Hui C, Christopher K, Hsiao CC, Ca²⁺ mobilization in cumulus cells: Role in oocyte maturation and acrosome reaction, *Cell Calcium* 2013; 53: 68–75.
141. Kamla KS, Abbas AM and Singh R. Ion Channels in Sperm Physiology and Male Fertility and Infertility. *Journal of Andrology* Vol. 2012; 33(5): 777-788.
142. Lu S. and Khaled M. Ca²⁺cyt negatively regulates the initiation of oocyte maturation *The Journal of Cell Biology* 2004; 165 (1):63-75.

143. Nicola B, Ilaria S, Enzo T, Mauro M, Barbara B. Acute exposure to a 2mT static magnetic field affects ionic homeostasis of in vitro grown porcine granulosa cells. *Bioelectromagnetics* 2014; 35: 231-234.

T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

SAYI : B.08.6.YÖK.2.SD.F.71.0.05.10.050/1216

KONU : Etik Kurul Kararı

28 Mart 2013

Sayın: Prof. Dr. Meral ÖNCÜ
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji A.D. Öğretim Üyesi

Sorumlu araştırmacı olduğunuz "IVF ile elde edilen granuloza hücrelerinde apoptozis, Ca²⁺ sinyali ve oksidatif stress parametrelerinin değerlendirilmesi" isimli çalışmanızın kurulumuz tarafından uygun görüldüğüne ilişkin 27.03.2013 tarih ve 89 sayılı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı yazımız ekinde gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.



Prof. Dr. Mustafa AKÇAM
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

EKİ: 1 Adet Etik Kurulu Kararı (2 Sayfa)

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
İLAÇ DIŞI KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 89	Tarih: 27.03.2013
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Mustafa AKÇAM

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mustafa AKÇAM	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr Halil AŞCI	Farmakoloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.A.Nesimi KİŞİOĞLU	Halk Sağlığı	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mustafa TÜZ	Kulak Burun Boğaz Hast.	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Fatih GÜLTEKİN	Tıbbi Biyokimya	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serpil DEMİRCİ	Nöroloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Doğan ERDOĞAN	Kardiyoloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mekin SEZİK	Kadın Hastalıkları ve Doğum	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Zeynep Dilek AYDIN	İç Hastalıkları	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Derya YILDIRIM	Ağız Diş ve Çene Radyolojisi	SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Metin TOPCUOĞLU	Hukuk	SDÜ Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm.Dr. Kenan Ahmet TÜRKDOĞAN	Acil Tıp	Isparta Devlet Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Kadir KARAKUŞ	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Isparta Devlet Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzman Halil KARAKOÇ	Biyomedikal	SDU Araştırma Uyg. Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Osman PARÇAOĞLU	Sivil Üye	Osman Fotokopi İSPARTA	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* : Toplantıda Bulunma

HASTA ONAM FORMU

Yapacağımız doktora tez çalışmasında standart ICSI protokolü uygulanacak olan gönüllü hastalardan alınacak granuloza hücreleri kullanılacaktır. Bu hücreler, oosit eldesi için folikül aspirasyonu esnasında zaten alınmakta ve sonrasında kullanılmamaktadır. Hücreler alınırken vericilere hiçbir şekilde farklı cerrahi bir müdahalede bulunulmayacaktır. Bu nedenle çalışmamızın neden olacağı herhangi bir hastalık riski veya hayati tehlike bulunmamaktadır. Gönüllü vericiden ve bağlı olduğu sosyal sağlık kurumundan hiçbir şekilde maddi talepte bulunulmayacaktır. Gönüllü vericilerden alınacak hücreler apoptozis, kalsiyum sinyali ve oksidatif stres tanı yöntemlerine tabi tutulacaktır. Çalışma tamamen etik kurallar çerçevesinde yürütülecek olup, başka amaçlar için kullanılmayacaktır.

Vericiler izin belgesini imzalamış olsalar dahi, çalışmanın herhangi bir evresinde izinlerini iptal etme hakkına sahiptirler.

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum, dinledim, anladım. İstediğim soruları sordum ve cevaplarını aldım. Bu klinik araştırmaya gönüllü olarak hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

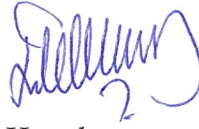
Araştırmacının Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

BEYAN

“IVF ile elde edilen granuloza hücrelerinde apopitoz, kalsiyum sinyali ve oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Hazırlayan

Dilek ULUSOY KARATOPUK



I. Danışman

Prof. Dr. Meral Öncü



II. Danışman

Prof. Dr. Mustafa Naziroğlu

ÖZGEÇMİŞ

Dilek ULUSOY KARATOPUK

Kişisel Bilgiler:

Doğum Tarihi: 28.08.1978

Doğum Yeri: Isparta

Yabancı Dil: İngilizce

Yazışma Adresi: Modern evler Mah. 3167 sok. Ersan Evleri No: 9 A Blok

Daire: 10 32300 Isparta

Telefon No: 0 505 503 23 12

Elektronik Posta : dilekulusoy@hotmail.com

Öğrenim Durumu:

Derece/ Bölüm/ Program/ Üniversite/ Yıl

Yüksek Lisans Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Süleyman Demirel Üniversitesi 2007

Lisans Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hacettepe Üniversitesi 2003

Doktora Tezi ve Danışmanı:

“ IVF ile Elde Edilen Granuloza Hücrelerinde Apoptoz, Kalsiyum Sinyali ve Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi”

1.Danışman: Prof. Dr. Meral ÖNCÜ

2. Danışman: Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU