

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE  
APOPİTOZUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

MÜGE KOVALI

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR - 2009

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE  
APOPTOZUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MÜGE KOVALI**

**DOÇ.DR. ÜLKER SÖNMEZ**

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından proje  
2008.KB.SAG.016 sayı ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

<b>1.</b>	<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>OVARYUM HİSTOLOJİSİ</b> .....	<b>3</b>
2.1.1.	<i>FOLLİKÜL GELİŞİMİ</i> .....	<i>4</i>
2.1.2.	<i>FOLLİKÜLER ATREZİ</i> .....	<i>10</i>
<b>2.2.</b>	<b>APOPİTOZ</b> .....	<b>12</b>
2.2.1.	<i>APOPİTOZ TANIMI VE TARİHÇESİ</i> .....	<i>12</i>
2.2.2.	<i>APOPİTOZ MEKANİZMALARI</i> .....	<i>14</i>
<b>2.3.</b>	<b>KADIN İNFERTİLİTESİ</b> .....	<b>17</b>
2.3.1.	<i>TANIMLAR</i> .....	<i>17</i>
<b>2.4.</b>	<b>REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)</b> .....	<b>20</b>
2.4.1.	<i>SERBEST RADİKALLERİN OLUŞTURDUĞU HASARLAR</i> .....	<i>23</i>
2.4.2.	<i>SERBEST OKSİJEN RADİKAL HASARININ BAŞLICA ÜRÜNLERİ</i> .....	<i>25</i>
2.4.3.	<i>ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ</i> .....	<i>26</i>
<b>3.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.</b>	<b>OLGULAR</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.</b>	<b>OVARYUM STİMÜLASYON PROTOKOLÜ</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3.</b>	<b>APOPİTOZUN BELİRLENMESİ</b> .....	<b>31</b>
3.3.1.	<i>TUNEL PROTOKOLÜ</i> .....	<i>31</i>
<b>3.4.</b>	<b>ROS VE ANTIOKSİDAN TAYİNİ</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5.</b>	<b>ULTRASTRÜKTÜREL İNCELEME</b> .....	<b>33</b>
3.5.1.	<i>ELEKTRON MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ</i> .....	<i>33</i>
<b>3.6.</b>	<b>İSTATİSTİK</b> .....	<b>35</b>
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1.</b>	<b>IŞIK MİKROSKOBU DEĞERLENDİRMESİ</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2.</b>	<b>ROS VE ANTIOKSİDAN DEĞERLENDİRMESİ</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3.</b>	<b>EM BULGULARI</b> .....	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ</b> .....	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>60</b>

## TABLO DİZİNİ

Tablo 1 Semen Analizi Normal Değerleri.....	18
Tablo 2 İnfertilite sebeplerine göre karşılaştırmalar.....	37
Tablo 3 Yaşlara göre karşılaştırmalar.....	38
Tablo 4 İnfertilite sebebine göre apoptozun değerlendirilmesi.....	38
Tablo 5 Yaşlara göre apoptozun değerlendirilmesi.....	39
Tablo 6 Gruplara göre MDA ve GPx düzeylerinin karşılaştırılması.....	46
Tablo 7 Yaşlara göre ROS - Antioksidan düzeylerinin değerlendirilmesi.....	47

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1 Yetişkin overi. (Bloom W, Fawcett DW: A Textbook of Histology. Philadelphia, WB Saunders Company, 1975).....	3
Şekil 2 Follikülogenez (Erickson, Gregory F. Normal ovarian function. Clin Obstet Gynecol 21:31, 1978).....	9
Şekil 3 Folliküler granüloza hücresinde apoptoz sinyalleri .....	12
Şekil 4 Apoptoz mekanizmaları .....	15

## RESİM DİZİNİ

Resim 1 PCOS Grubu TUNEL Değerlendirmesi (1A-1B) .....	40
Resim 2 PCOS Grubu TUNEL Değerlendirmesi (1C-1D) .....	41
Resim 3 Açıklanamayan İnfertil Grubu TUNEL Değerlendirmesi (2A-2B) .....	42
Resim 4 Açıklanamayan İnfertil Grubu TUNEL Değerlendirmesi (2C-2D) .....	43
Resim 5 Erkek Faktör Grubu TUNEL Değerlendirmesi (3A-3B) .....	44
Resim 6 Erkek Faktör Grubu TUNEL Değerlendirmesi (3C-3D) .....	45
Resim 7 PCOS Grubu TEM Değerlendirmeleri (4A-4B) .....	48
Resim 8 Açıklanamayan İnfertil Grubu TEM Değerlendirmeleri (5A) .....	49
Resim 9 Açıklanamayan İnfertil Grubu TEM Değerlendirmeleri (5B-5C) .....	50
Resim 10 Açıklanamayan İnfertil Grubu TEM Değerlendirmeleri (5D-5E) .....	51
Resim 11 Erkek Faktör Grubu TEM Değerlendirmesi (6A) .....	52

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGE VE KISALTMA	AÇIKLAMA	
IVF	In vitro fertilization	İn vitro fertilizasyon
PCOS	Polycystic ovary syndrome	Polikistik over sendromu
ROS	Reactive oxygen species	Reaktif oksijen türleri
RNS	Reactive nitrogen species	Reaktif nitrojen türleri
YÜT (ART)	Assisted reproductive technology	Yardımlı üreme teknikleri
TEM	Transmission electron microscopy	Transmisyon elektron mikroskopu
OMI	Oocyte maturation inhibitor	Oosit maturasyon inhibitörü
FSH	Follicle-Stimulating Hormone	Folikül uyarıcı hormon
LH	Luteinizing Hormone	Luteinizan hormon
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone	Gonadotropin salgılatıcı hormon
IGF 1	Insulin-like growth factor 1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
EGF	Epidermal growth factor	Epidermal büyüme faktörü
GDF-9	Growth differentiation factor	Büyüme farklılaşma faktörü
BMP	Bone morphogenetic factor	Kemik morfogenetik proteinler
FGF	Fibroblast growth factor	Fibroblast büyüme faktörü
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteini
TGF- $\beta$	Transforming growth factor	Transforme edici büyüme faktörü
SHBG	Sex hormone-binding globulin	Seks hormonu bağlayan globulin
MDA	Malondialdehyde	Malondialdehit
GPx	Glutathione peroxidase	Glutasyon peroksidaz

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimim süresince, Histoloji ve Embriyoloji Biliminde yetişmemde büyük emekleri olan, öğrencileri olmaktan büyük mutluluk duyduğum Sayın Prof. Dr. Candan Özoğul' a, tez danışmanım Sayın Doç Dr. Ülker Sönmez'e ve başta Sayın Doç. Dr. Bekir Uğur Ergür ve Sayın Doç. Dr. Alper Bağrıyanık olmak üzere anabilim dalındaki bütün hocalarıma bana verdikleri destek ve katkıları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yine bu süreçte, lisansüstü eğitimi alırken DEÜTF Tüp Bebek Merkezinde staj olanağı sağlayan Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent Gülekli başta olmak üzere, hem anabilim dalı diğer hocalarına hem de Tüp Bebek Merkezi ekibine destekleri için teşekkür ederim.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmalarımın her aşamasında laboratuvar bilgilerini esirgmeden bana sunan Dr. Müge Kiray, Bio. Sedef Menkü' ye ve Bio. Özcan Üstün'e teşekkür ederim.

Bilgisini ve sabrını zorladığım ama her zaman bıkmadan bana yardımcı olan, Bio. Fulya Aydın'er'e, birlikte olmaktan keyif ve mutluluk duyduğum Bio. Ceyda Yıldız ve Bio. Şule Doğan başta olmak üzere bütün yüksek lisans arkadaşlarıma destekleri ve katkıları için çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili Annem ve biricik ikiz kardeşim Özge'ye anlayışları ve sabırları için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Müge KOVALI

## ÖZET

### İNSAN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE APOPİTOZUN DEĞERLENDİRİLMESİ

MÜGE KOVALI

Çalışmamızda yardımcı üreme teknikleri sikluslarında follikül aspirasyonu ile elde edilen granüloza hücrelerindeki apoptoz oranlarının immunohistokimyasal ve ultrastrüktürel incelemesi ve folliküler sıvılarda ROS düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

Çalışmamız prospektif klinik gözlemsel bir çalışmadır. Dokuz Eylül Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tüp Bebek Merkezi'ne çocuk sahibi olamama şikayeti ile müracaat eden primer yada sekonder infertil tanısına ek olarak PCOS, erkek faktör ve açıklanamayan infertilite tanısı konan ve yardımcı üreme tekniği siklusuna alınan 30 hasta katıldı. Bütün olgulardan toplanan folliküler sıvılarındaki ROS spektrofotometrik yöntemle incelendi, ışık mikroskopu değerlendirmesi ile granüloza hücrelerindeki TUNEL pozitif hücre insidansı değerlendirildi ve aynı zamanda granüloza hücrelerinde meydana gelebilecek organel düzeyindeki değişiklikler Transmisyon Elektron Mikroskobu ile incelendi.

Çalışmamızda granüloza hücrelerindeki ışık mikroskopisi değerlendirilmesi sonucunda açıklanamayan infertil grubunda TUNEL pozitif hücre ortalaması PCOS ve erkek infertil gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu. Folliküler sıvı MDA düzeyleri açıklanamayan infertilite olgularında PCOS'lu olgulara ve erkek faktör grubuna göre yüksek olduğu tespit edildi. Folliküler sıvı GPx düzeylerinin ise PCOS'lu olgularda, açıklanamayan infertilite ve erkek faktör olgularına göre yüksek olduğu tespit edildi. Ancak gruplardaki folliküler sıvı MDA ve GPx seviyeleri arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. Elektron mikroskopisi değerlendirmelerinde ise hem DNA fragmentasyonunun değerlendirildiği TUNEL testi sonuçları ile hem de folliküler sıvı MDA seviyelerinin değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlara paralel olarak ince yapı değişiklikleri gözlemlendi.

Çalışmamızda TUNEL tekniği, oositi destekleyen granüloza hücrelerindeki DNA kırıklarının belirlenmesi ve böylece hücrelerin apopitotik yola girdiğinin gösterilmesi için kullanılmıştır. Buna ek olarak ultrastrüktürel olarak süreçteki dejenerasyon değerlendirilmiş ayrıca bu duruma follikül sıvısındaki oksidatif stresin etkisi de araştırılmıştır. Böylece çalışmamızda PCOS'lu olgularla açıklanamayan infertilite olgularının karşılaştırılması, bu 3 farklı teknik kullanılarak ilk kez değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Granüloza Hücresi, PCOS, Açıklanamayan İnfertilite, TUNEL, Apopitoz, Ultrastrüktür, ROS



## **SUMMARY**

### **EVALUATION OF APOPTOSIS IN HUMAN GRANULOSA CELLS**

**MUGE KOVALI**

In this study, we wanted to investigate to compare the percentage of apoptosis in granulosa cells from follicular fluid use immunohistochemistry technique and ultrastructure of granulosa cells and also assessment for ROS respectively cycles in assisted reproductive technology.

Our study was a prospective, nonrandomized clinical study. Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences Ethic committee approved our application with 13 numbered decision at 19th March 2008 and also Dokuz Eylül University Ethics Committee of Clinic And Laboratory Researches, Faculty of Medicine, approved our application with 120 numbered and 28 March 2008. This study is a workshop comprising 31 IVF cycles which has applied to 11 PCOS infertile patients, 10 unexplained infertile patients and 10 male factor infertile patients between April 2008 and December 2008, in Dokuz Eylül University Faculty Of Medicine Department Of Obstetrics and Gynecology ,IVF Center.

Follicular fluid from each follicle were separated to three groups after each case. TUNEL assay was used to detect of DNA fragmentation in granulosa cells, MDA assessment for ROS, GPx assessment for antioxidant enzyme respectively and apoptosis in granulosa cells was evaluated ultrastructurally by transmission electron microscopy.

There was statistically significant difference the percentage of apoptotic cells in granulosa cells between PCOS and unexplained infertility group. There was no statistically significant difference between the levels of MDA and GPx in follicular fluid in three groups.

With this work we have done, it was investigated immunohistochemistry and also ultrastructural apoptosis of granulosa cells which are promoting oocytes , besides the follicle fluid was investigated for the effects of oxidative stress in this situation. Consequently, in this study we broke fresh ground in PCOS and unexplained patients for used these 3 techniques.

Keyword: Granulosa Cells, PCOS, Unexplained Infertility, TUNEL, Apoptosis, ROS, Ultrastructure

## 1. GİRİŞ VE AMAC

Dünyanın ilk tüp bebeği Louise Brown'un 1978 yılında İngiltere'de doğumundan sonra in vitro fertilizasyon (in vitro fertilization, IVF) konusunda günümüze kadar çok yol alınmıştır. İnfertiliteye sebep olabilen başlıca jinekolojik sorunlar myomlar, rahim içi yapışıklıklar, rahim yapısal sorunları, polikistik over sendromu (Polycystic ovary syndrome, PCOS), endometriozis olarak sıralanabilir. Günümüzde birçok kriter içeren infertilite sebeplerinin yaklaşık %40'ı kadına bağlıdır.

Ovaryum rezervinde oositlerin dışında, follikül ve granüloza hücreleri de bulunmaktadır. Granüloza hücreleri, oosite yalnızca fiziki olarak destek sağlamakla kalmayan aynı zamanda oositin regülasyonunda ve beslenmesinde de önemli rol oynayan hücrelerdir. Bunun yanı sıra granüloza hücrelerinin yaşaması ve farklılaşmasında oositin önemli rolü vardır. Gelişmekte olan follikülde streoid hormonların, glikoproteinlerin ve büyüme hormonlarının üretiminin ve granüloza hücrelerinin proliferasyonunun artması apoptoza neden olabilmektedir. Granüloza hücrelerindeki bu süreç ise oosit maturasyonunu doğrudan etkiler. Yapılan çalışmalarda kötü oosit, embriyo kalitesinin ve düşük implantasyon oranlarının asıl nedenlerinin moleküler düzeyde olduğu tartışılmaktadır.

Apoptoz, hücre ölümünün kontrollü şekilde gerçekleşmesidir. Genellikle etrafı canlı hücrelerle çevrili tek bir hücrede başlar. Folliküler atrezinin bir göstergesi olan granüloza hücrelerindeki apoptoz bütün yaşam boyunca devam eden bir süreçtir. Apoptoz, atretik folliküllerdeki granüloza hücre sayısı ve östrojen üretimindeki azalma ile karakteristiktir(1-2). Ayrıca granüloza hücrelerindeki apoptoz oranı folliküler sıvıdaki reaktif oksijen türlerinin (Reactive oxygen species, ROS) miktarıyla da doğru orantılıdır(6).

IVF sikluslarında granüloza hücrelerindeki yüksek apoptotik hücre insidansının sikluslarda kötü prognoza sebep olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (3-4-5). Bununla birlikte apoptozun gonadotropin hiperstimülasyonu yapılan hastalardaki gebelik oranlarına etkisi halen tartışma konusudur.

Erkeklerde ROS'ların üreme potansiyeli üzerine olan etkileri pek çok çalışma ile değerlendirilmiş, reaktif oksijen türlerinin ve antioksidanların bazı fizyolojik ve patolojik etkileri gösterilmiş olmasına rağmen, kadın üreme fonksiyonları ile ilişkisi üzerine rölatif olarak daha az çalışma mevcuttur (7)

Oksidatif stres artışının kadın üreme fonksiyonları üzerine etkileri halen tartışma konusudur. Bu artışın olumsuz etkilerinin gösterildiği çalışmaların yanı sıra aksini savunan çalışmalar da bulunmaktadır.

Foliküler sıvı ovulasyon öncesi matür oositin mikro çevresinde gerçekleşen hormonal ve metabolik değişiklikleri yansıtan biyolojik bir penceredir. Bu sıvıdan elde edilen parametreler IVF’deki fertilizasyonu, embriyo klivajını, embriyo morfolojisini ve gebelik hızlarını belirlemede kullanılmıştır (8). Hem oositin kendisi hem de içinde bulunduğu folliküler sıvıda varolan steroid hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinlerle birlikte bu mikroçevrede varolan granüloza hücreleri ve lökositler de aerobik metabolizmalar sonucu ROS ve reaktif nitrojen türleri (Reactive nitrogen species, RNS) üretimine neden olmaktadır. Hücrelerin normal fizyolojik aktivitelerini sürdürebilmeleri için oksidant molekül üretiminin ve antioksidant kapasitenin dengede olması gerekmektedir (9). Folliküler sıvıda bulunan ROS, RNS’leri ve onların oosit maturasyonu, fertilizasyon, embriyo klivajı, embriyo morfolojisi, gebelik ve implantasyon hızları üzerine olan etkileri ile ilgili olarak yeterince bilgi yoktur.

Son zamanlarda yapılan in vitro kültür, in vitro fertilizasyon ve in vitro maturasyon çalışmaları ile embriyoyu meydana getirecek olan en iyi oositin seçilmesinde oositin kalitesi kadar ona desteklik sağlayan granüloza hücrelerinin de sağlıklı olmaları önem kazanmıştır. Literatür incelemesi yapıldığında IVF sikluslarında kültüre edilmemiş insan granüloza hücrelerinin ince yapısına dair yapılan çalışmalar yok denecek kadar azdır. Hiç kuşkusuz granüloza hücrelerinin ileri değerlendirimi, morfolojik analizi ve ultrastrüktürel yapısının incelenmesi de bu konuda katkı sağlayacaktır.

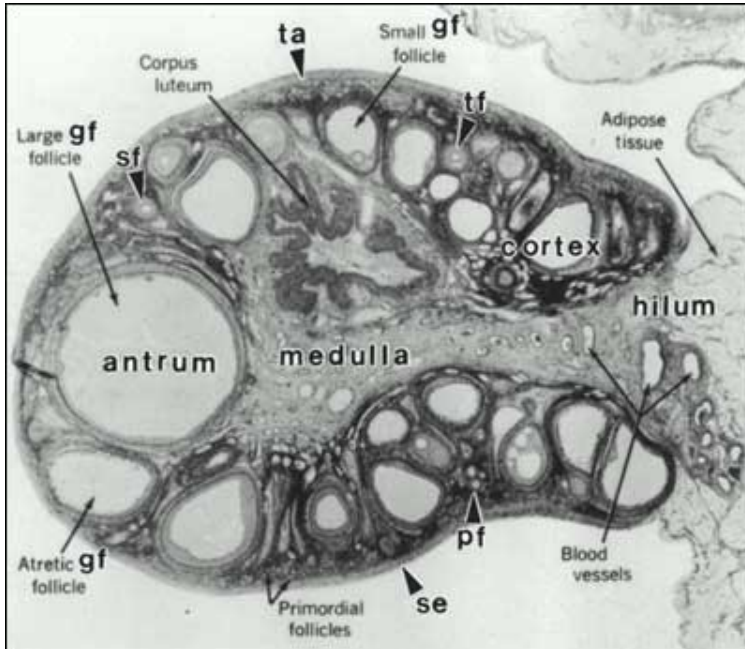
Bu bağlamda çalışmamızda yardımcı üreme teknikleri (YÜT, Assisted reproductive technology, ART) sikluslarına başvuran kadınlardan follikül aspirasyonu ile elde edilen granüloza hücrelerindeki apoptik hücre insidansı immunohistokimyasal, biyokimyasal ve ultrastrüktürel olarak karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Bu hedeften yola çıkılarak, folliküler sıvıdaki ROS spektrofotometrik yöntemle incelenmiş, granüloza hücrelerindeki DNA hasarı TUNEL yöntemi uygulanarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiş ve aynı zamanda granüloza hücrelerinde meydana gelebilecek organel düzeyindeki değişiklikler Transmisyon Elektron Mikroskobu(Transmission electron microscopy, TEM) ile incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. OVARYUM HİSTOLOJİSİ

Ovaryumlar, uterusun her iki yanında birer adet olmak üzere, karın boşluğunda, fallop tüplerinin altında yer alırlar. Yaklaşık olarak 3 cm uzunluğunda, 1.5 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığında badem biçiminde ve 4-8 gram ağırlığındadırlar.

Korteks veya kortikal bölge ovaryumun perifer bölgesidir (Şekil-1). Kortikal ve medullar bölge arasında belirgin bir sınır bulunmamaktadır. Ovulasyonun başladığı puberteye kadar overlerin üzeri düzdür, bundan sonra, yani ovulasyondan sonra, üzerlerinde girinti ve çıkıntılar oluşur. Menapozdan sonra ise üzeri yine düzleşir. Bu kortikal bölge çok sayıda ovaryum follüküllerini ve zengin bağ dokusu hücrelerini içerir. Ayrıca yaygın düz kas fibrilleri follükülleri kuşatan stromada yer alır. Merkezi bölge ise medulla veya medullar bölge olarak tanımlanmıştır. Gevşek bağ dokusu, kollajen ve elastik fibrillerden meydana gelmiş olup, geniş kan damarları, lenfatik damarları ve sinirleri içerir. Ayrıca medullada interstisiyel hücreler ve kromaffin hücre gruplarına da rastlanmaktadır. (10)



Şekil 1 Yetişkin overi. (Bloom W, Fawcett DW: A Textbook of Histology. Philadelphia, WB Saunders Company, 1975)

Hem kortikal hemde medüller stroma dar sitoplazmalı iğsi şekilli stromal hücrelerden oluşur. Özellikle geç reproduktif ve postmenapozal dönemde bu hücrelerdeki ince sitoplazmik lipid damlaları özel boyalarla gösterilebilmektedir.

İmmünohistokimyasal boyamada vimentin, aktin ve desmin sitoplazmik pozitifliği mevcuttur. Bu stromal hücreler yoğun retiküler ağ ile ayrılmaktadırlar. Luteinize stromal hücreler tek tek veya küçük gruplar halinde çoğunlukla medullada bulunur. Poligonol şekilli, geniş eozinofilik berrak sitoplazmalı, değişen miktarlarda lipid içermeleri, santral yerleşimli yuvarlak çekirdekli ve belirgin nükleollü olmaları bu hücrelerin karakteristik özellikleridir. Bu hücrelerde yapılan çalışmalarda testosteronun sitoplazmik immünreaktivitesi gösterilmiştir. Yine yapılan bir çalışmada gebelik ve postmenapozal dönemde luteinize stromal hücrelerin sayısının arttığı gösterilmiştir (11). Yapılan diğer bir çalışmada ise inhibinin luteinize stromal hücrelerde sitoplazmik olarak immünreaktivitesi gösterilmiştir (12)

Overin hilus hücreleri ise morfolojik olarak testiküler leydig hücrelerine benzemektedirler. Çocukluk döneminde bulunmayan bu hücreler fetal yaşamda mevcuttur. Pubertede tekrar görülmeye başlanır ve bütün postmenapozal kadınlarda görülür. Bu hücrelerin sayısı ve lokalizasyonu oldukça değişkendir, gebelikte ve menapozdan sonra sayısı artar. Hilus hücre kümeleri değişen boyut ve şekilde olup tipik olarak hilus ve mezoovaryum komşuluğunda görülmektedir (11)

### *2.1.1. FOLLİKÜL GELİŞİMİ*

Olgun dişi ve erkek üreme hücreleri doğrudan, gelişimin üçüncü haftası sonunda vitellus (yolk) kesesi duvarında beliren ilkel üreme hücrelerinden gelişirler. Bu hücreler vitellus kesesinden, gelişmekte olan gonadlara ameboik hareketlerle göç eder ve gonadlara 4. haftanın sonu veya 5. haftanın başında ulaşırlar. (13)

Doğum öncesi olgunlaşma olarak adlandırılan prenatal maturasyon evresi primordiyal üreme hücrelerinin dişi gonada ulaşip oogoniumlara farklanması ve içinde primer oositi barındıran primordiyal follikülün oluşması sürecidir. Ardarda mitozla çoğalan oogoniumlar kümeler oluşturarak 3.ayın sonunda yassı epitel hücreleriyle çevrili bir hal alır.

Bir küme içinde yer alan oogoniumların tamamı muhtemelen tek bir ilkel üreme hücresinden gelişirken, follikül hücreleri olarak bilinen oogoniumların çevresindeki yassı epitel hücreleri overin yüzey epitelinden köken alırlar. (13)

Oogoniumların çoğu mitozla bölünmeyi sürdürürken, bir kısmı da büyüyerek primer oositlere farklılıklar. Oluşan primer oositler hemen DNA'larını bir kat arttırarak, birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Birkaç ay içinde oogoniumların sayısı hızla artar ve gelişimin 5. ayında over içindeki üreme hücrelerinin sayısı maksimuma, tahminen 7.000.000'a ulaşır. Bu dönemden sonra başlayan hücre dejenerasyonu, oogoniumların bir çoğu ve primer oositler atrezik hale gelir. 7. ayda yüzeye yakın yerleşmiş olan birkaçı dışında oogoniumların çoğunluğu dejenere olmuş olur. Hayatta kalan primer oositlerin tamamı, birinci mayoz bölünmeye girmiş ve her biri ayrı ayrı tek katlı yassı epitel tabakasıyla çevrelenmiştir. Bu primer oosit, çevresindeki yassı epitel hücreleriyle birlikte primordiyal follikül olarak bilinir (13).

Primordiyal folliküller, folliküler gelişimin erken safhasında ve fetal gelişimin ilk üç ayı içinde baskın olarak bulunurlar. Folliküllerin büyümesi gonadotropin stimülasyonuna bağlıdır. Korteks stromasında tunika albugineanın altında bulunurlar( 14).

Follikül hücreleri yassı ve tek bir sıra halinde oositi çevreler. Oositin çapı 30µm kadardır. Nukleus, yaygın bir kromatine, bir veya daha fazla geniş nukleolusa sahiptir. Oosit 1. mayoz bölünmenin profaz safhasındadır (10).

Doğum sonrası olgunlaşma süreci ise postnatal maturasyon olarak adlandırılır. Doğumda, tüm primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz safhasındadır. Ancak, bölünme metafazla devam edeceğine, oositler çekirdek kromatinin seyrek ve düzensiz bir yapılaşma gösterdiği diploten dönemi denilen dinlenme dönemine girerler. Primer oositler, puberteye kadar I. Mayoz bölünmenin profaz safhasında (istirahat halinde) kalırlar. Bu süre boyunca, oositin olgunlaşması follikül hücreleri tarafından salgılanan oosit olgunlaşmasını inhibe eden bir madde olan oosit maturasyon inhibitörü (oocyte maturation inhibitor, OMI) tarafından baskılanır. Doğumda overlerdeki primer oosit sayısının, yaklaşık 700.000 ile 2.000.000 arasında değiştiği tahmin edilmektedir. Puberteye kadar bu oositlerin büyük çoğunluğu atrezik hale geldiğinden, puberte başlangıcında bu sayı 400.000'e düşer ve ancak 500'den daha azı kadının doğurgan periyodu içinde ovulasyonla gonad dışına atılır (13).

Geç olgunlaşan oositlerden bazıları, 40 yıl kadar bir süre birinci mayoz bölünmenin profaz safhasında bekleyebilmektedir. Bu istirahat süresinin oositi çevresel etkenlere karşı korumak için uygun bir ortam olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir. Kromozom anomalilerinin görülme sıklığının anne yaşıyla orantılı olarak arttığı dikkate alındığında, uzayan mayoz bölünme sürecinin oositleri daha kolay hasarlanabilir hale getirip getirmediği merak konusudur. (13)

Pubertenin başlamasıyla, her ovarian siklusta 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordial follikül olgunlaşmaya başlar. Hala diploten evresinde istirahat halinde olan primer oosit büyümeye başlar; oositi çevreleyen yassı epitel hücreleri önce kübikleşir, sonra çoğalarak çok sıralı bir epitel tabakası oluşturur. Çoğalan bu hücelere granüloza hücreleri denir. Bu biçimiyle follikül artık primer follikül olarak adlandırılırlar (13). Primer folliküller tunika albuginea'ya yakın konumlanmışlardır. Follikül hücreleri yassıdan izoprizmatik şekle kadar değişmiştir. Oosit büyüdükçe nukleusun hücre içinde kapladığı alan genişler. Oosit çapı 50-80 µm kadardır. Oosit sitoplazması; mitokondriler, iyi gelişmiş golgi kompleksi, granüler endoplazmik retikulum, ribozomlar, küçük veziküller, mikroveziküler cisimler, lipid damlaları ve lipokrom pigmenti içerir (14).

Memeliler de dahil bir çok türde oosit membranı (oolemma) altında kortikal granüller denen salgı vezikülleri de bulunur. Bu granüller proteaz içerirler ve ovum spermle aktive edildiğinde bu enzimler ekzositozla boşalırlar. Periyodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu ile boyanırlar. Bazen birden fazla oosit bulunduğu gibi aynı oositte birden fazla nukleus da bulunabilir. Primer follikülü çevreleyen teka tabakasının kan kapillerleri ile oosit arasında belirli bir madde alışverişi gerçekleşir. İnsanlarda oosit sitoplazmasında endoplazmik retikulumun halkavari sarımlarıyla annulate lamellae yapısı bulunur. Primer folliküle preantral follikül de denir (10).

Oosit ve granüloza hücreleri glikozaminoglikanlar ve glikoproteinlerden zengin amorf bir madde olan zona pellucidayı oluşturma özelliğindedir. Granüloza hücreleri kendilerini, çevrelerindeki, teka follikülü olarak bilinen stromal hücrelerden ayıran bir bazal membran üzerine oturlar. Follikül büyümeye devam ederken teka follikülünün hücreleri, içte salgı yapan hücrelerden oluşan teka interna ve dışta da fibroblast benzeri hücreler içeren, bağ dokusundan oluşan, teka eksterna adlı iki belirgin tabaka şeklinde farklılaşırlar (13).

Aynı zamanda, oositin çevresinde follikül hücrelerinin eldiven parmağı biçimindeki küçük sitoplazmik uzantıları, zona pellusidayı geçip oositin hücre zarının mikrovilluslarıyla iç içe geçer. Bu yapısal düzenlenmenin, maddelerin follikül hücrelerinden oosite taşınmasında önemi olduğu düşünülmektedir (13).

Foliküllerin büyümesi hipofizden salınan follikül uyarıcı hormon (Follicle-Stimulating Hormone, FSH), büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor 1, IGF-1) ile kalsiyum iyonlarının ( $Ca^{+2}$ ) etkisine bağlıdır (10).

Oosit çapı artarken, granüloza hücre sayısı mitozla artar. Granüloza hücreleri arasındaki iletişimi gap junctionlar kurar. Oositten uzanan mikrovilluslarla follikülden zona pellusida aracılığıyla oosite uzanan düzensiz uzantılar da, madde alışverişinde rol oynarlar. Follikül büyüdükçe granüloza hücreleri arasındaki boşluklara sıvı (likör follikülü) birikmeye başlar. Bu boşluklar birleşerek daha büyük boşlukları (antrum) oluşturur. Granüloza hücre katı, 6 ila 12 hücre sırası oluşturduğunda ve bu boşluklarda sıvı biriktiğinde bu folliküle sekonder veya antral follikül ismi verilir (10).

Likör follikülü hyalüronik asitten zengin bir sıvıdır. Bu dönemde oosit çapı da 125  $\mu$ m ulaşır. Büyümede duraklama OMI (1-2 kDa) peptidi içermesine bağlıdır. Bunun salgılanması granüloza hücrelerinin aktiviteyi arasında ve antral boşluğa bırakılır. Erken sekonder safhada bu salgılamamanın fazla miktarda olduğu gözlenir. Olgun follikül büyüklüğüne erişildiğinde bu salgı daha düşük konsantrasyondadır. Follikül büyüklüğü 10 mm veya daha büyük çapa ulaştığında oosit etrafında korona radiata oluşmaya başlar. Korona radiata, kumulus oophorus ile follikül duvarına bağlantılıdır. Hücreler arasındaki *gap junction*ların haberleşmedeki rolüde unutulmamalıdır. Folliküler olgunlaşma süresince granüloza hücrelerinin yüzeyindeki mikrovillus sayısında artış olur. Bu durum Luteinizan Hormon (LH) reseptörlerinin sayısına ve yüzey boşluklarının artışına da bağlıdır. Follikül granüloza hücreleri arasında hücre dışı materyal olan ve koyu boyanan PAS boyasına pozitif reaksiyon gösteren yapıya *Call Exner Cismi* denir. Granüloza hücrelerinin yer yer erimesiyle oluşur, hyaluronik asit ve proteoglikanlar içerdiği kabul edilmektedir. Follikül büyümesi esnasında granüloza hücrelerinin sayısı ve sırası artarken, bağ dokusuna ait hücrelerinin follikül etrafında yer aldığı görülür.



Folikülü çevreleyen bu hücreler fonksiyon ve özellik bakımından birbirinden ayrılırlar. Teka interna, folikülü çevreleyen hücre sırası olup daha incedir. Damarlanması fazladır ve steroid üretiminden sorumlu hücre özelliklerini taşırlar. Bu hücrelerde bol miktarda LH reseptörleri bulunur. Böylece LH stimülasyonu sorumluluğunda androjenleri sentezler ve salgırlar. Östrojen prekürsörleri içerirler (10-17).

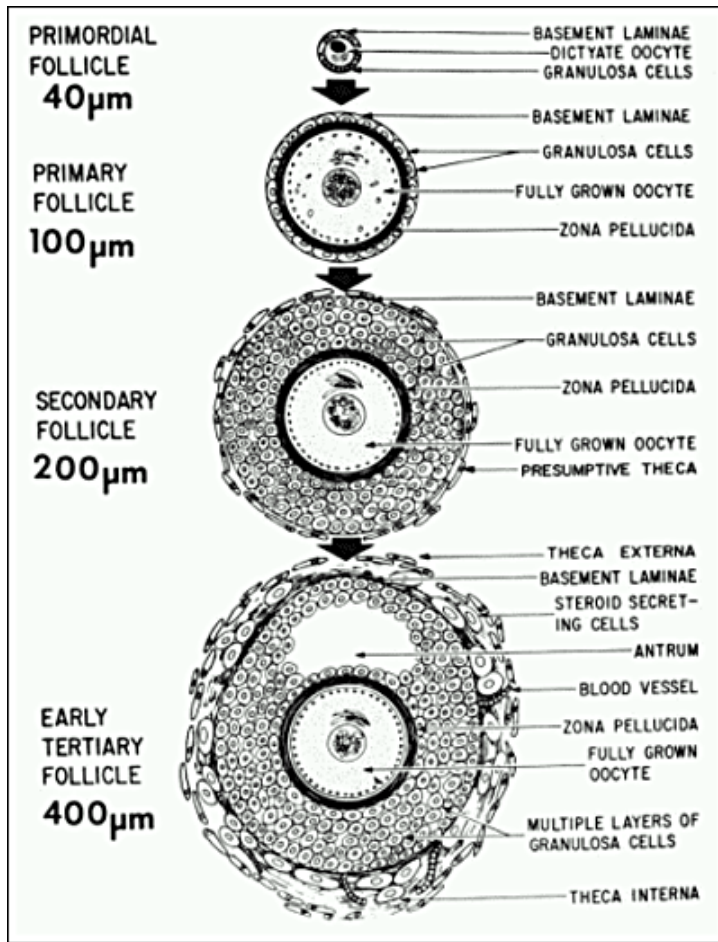
Endokrin organ özelliğine sahip bu hücreler küçük damarlar ağına sahiptir, ayrıca fibroblast ve kollajen demetleri de içerirler. Teka eksterna ise düz kas hücreleri ve kollajen fibrillerden oluşan bir dış tabakayı oluşturur. İki teka tabakası arasında kesin ayırıcı bir hat yoktur. Oysa, folikülün granüloza hücrelerini teka internadan ayıran belirgin bir sınır bulunmaktadır. Bu sınıra *Membrana Vitrea* denir. Tekanın zengin kapiller ağı folikül için gerekli besin maddelerinin kaynağını da oluşturur. Foliküller arasında ise lipitten zengin stromal hücreler yer alır (10-14).

10 mm veya daha büyük çapa ulaşmış foliküle Graaf folikül denir. Granüloza hücrelerindeki mitotik aktivite azalırken, granüloza hücre tabakası incelmış, hücreler arası boşluk ölçüsünde artış olmuştur. Granüloza hücreleri arasındaki antrum yüzeyi genişlerken oosit ile kumulus hücreleri arasındaki ilişkide gittikçe gevşeme olur. Bu durum folikülün ovulasyon yapabileceğine işaret eder. Böyle bir folikülde korona radiatalı oosit daha belirginleşir, teka tabakaları da sıkılaştır. Teka internadaki hücre sitoplazması lipid birikimi yanı sıra düz endoplazmik retikulum (smooth endoplazmic reticulum, SER) ve tubuler tip mitokondri görünümü ile steroid sentezi ile ilgili özelliklere sahip olduğunu gösterir( 10-17).

İnsanlarda Gonadotropin salgılatıcı hormon (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) artışının LH ve FSH seviyesini düzenlediği ve bu sayede folikülü ovulasyona götürdüğü bilinmektedir. Pubertede GnRH salınımının başlaması hipofizden FSH ve LH salınımını stimüle eder. Bu hipofiz hormonlarının etkisi ile overde 28-30 gün süren ovaryan siklus şekillenir. Her siklusta FSH etkisiyle 5-15 adet primer folikül gelişip büyür ve genelde bir tanesi olgun hale gelir. Ovulasyon ile içindeki olgun oositi atar. Geri kalan antral foliküller atreziye uğrarlar. Bu atreziden apoptozun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Hangi folikülün o ay büyüme fazına gireceği ve hangisinin dominant folikül olarak seçileceğini belirleyen faktörler bilinmemektedir (16) (Şekil 2).

Folikül olgunlaşması tamamlanırken oosit mayoz bölünmeyi bitirir. 1. kutup cismini oosit I membranı (oolemma) ile zona pellucida arasına bırakır. Bunu takiben ovulasyona gitmekte olan follikülde oosit II.Mayoz bölünmenin metafazına girer (17).

Teka ve granüloza hücreleri büyüme faktörleri ve onun bağlanma bölgelerini sentezlerler. Bu büyüme faktörleri tüm follikül hücrelerini doğrudan etkiler. İnsanlarda spesifik yüksek affiniteye sahip IGF-I reseptörleri graaf follikülündeki granüloza hücrelerinde ve follikül sıvısında oldukça fazla miktarda saptanmıştır. IGF-I'in fizyolojik seviyeleri insan granüloza hücrelerinden östradiol stimüle edilmesinde çok aktiftir (10).



Şekil 2 Follikülogenez (Erickson, Gregory F. Normal ovarian function. Clin Obstet Gynecol 21:31, 1978)

Preantral follikül büyümesi oosit-granüloza hücre ilişkisine (c-kit/Kit ligand) ve bir dizi lokal faktörlerin salgılanmasına bağlıdır. Bu faktörlerden bazıları şunlardır: büyüme/farklılaşma faktörü-9 (Growth differentiation factor, GDF-9), kemik morfogenetik proteinler (bone morphogenetic factor, BMP), aktivin, inhibin, fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor, b-FGF) ve EGF. Lokal faktörler özellikle gelişimin erken basamaklarında önemli rollere sahiptir.

Bu evrede granüloza hücrelerinde insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-2 (Insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP-2) ve tip 1 IGF reseptörleri izlenmişken, teka eksternada insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 (Insulin-like growth factor binding protein 3, IGFBP-3) saptanmıştır. Ayrıca in vitro olarak IGF-1 ve EGF'nin preantral follikülün büyümesini sağladığı gösterilmiştir (23-10).

Antral follikül büyümesinde de çok sayıda lokal büyüme faktörleri etkilidir. Bu faktörler arasında BMP ailesi ve reseptörleri, transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth factor, TGF- $\beta$ ) ailesi, inhibin ve aktivin gelmektedir ve bunların etkileri IGF sistemine benzemektedir (23-10).

Bunlar gonadotropinlerin faaliyetlerini arttırarak follikül farklılaşmasında rol oynarlar. Antrum şekillenmesi ile aynı zamanlarda IGF-II mRNA tekal dokuda gösterilmiştir. Tip I, IGF reseptörleri ve onun dizilerine ait IGFBP-2, -3 ve -4 de gelişim basamaklarında saptanmıştır. Ayrıca TGF- $\beta$  ailesi, FGF, EGF/TGF- $\alpha$  ve sitokinlerin folliküler büyümenin düzenlenmesinde görevli olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ovaryum fonksiyonlarında gonadotropinler haricinde başka metabolik faktörler de rol oynamaktadır. Bunların arasında insülin, glukagon, tiroid hormonları (T3, T4), hepatik IGF ve leptin bulunmaktadır (10-14).

### 2.1.2. FOLLİKÜLER ATREZİ

Oosit dejenerasyonu doğumdan önce başlar, puberteye kadar artarak devam eder, üretken çağda da devam eder. Follikül gelişiminin herhangi bir aşamasında atrezi başlayabilir. Granüloza hücreleri kapillerler tarafından işgal edilip, antral boşluğa dökülürler. Teka hücreleri hipertrofiye olup, karakteristik parlak membran görünümü oluştururlar. Oosit kısa zamanda dejenere olur. Granüloza hücre dökülmesi ile follikül duvarı kollabe olur, boş ve kollabe zona pellucida bir süre daha bağ dokusu içinde kalabilir. Hipertrofiye olan teka hücrelerinde lipid depolanması olur. Daha sonra parlak membran parçalanır, hücre parçaları over dokusuna yayılır ve fibröz skar oluşur (16).

#### 2.1.2.1. Over Follikül Gelişim Aşamalarında Apoptoz

Normal gametogeneizde kadın germ hücrelerinde gelişimsel ölümler görülür. Normal ve patolojik durumlarda gelişen bu ölümlerde etki mekanizması apoptoz olabilir (18).

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apopitoz embriyolojik gelişmeden, büyüme ve farklılaşmaya kadar pek çok durumda istenmeyen hücrelerin ölümünü sağlayan bir mekanizmadır (19). Prenatal ve postnatal dönemdeki normal germ hücre atrezisinde apopitozun rolünü tarifleyen çalışmalar vardır (20-21).

Gebeliğin 5. ayında insan fetal overinde en fazla sayıda (yaklaşık  $8 \times 10^6$ ) germ hücresi vardır. Overlerde mevcut folliküller primordiyal folliküler formasyona girmeden önce dejenerasyon oluşmaya başlar. Doğuma kadar germ hücre sayısında belirgin azalma olur. Doğumda maksimum sayının %20'sinden daha az follikül vardır. Mevcut bu folliküllerin de %99.9'dan daha fazlası menapoza kadar hiçbir zaman ovulasyona uğramaz (22-23).

Apopitoz, atreziye uğrayan follikülün ölümünden sorumlu yüksek organizasyonlu bir mekanizmadır. Gelişen folliküllerin büyük kısmının azalması ovulasyona tek follikülün ulaşmasını sağlar. Memeli follikülünde santral yerleşimli oosit, etrafında granüloza hücreleri ve bunların dışında da teka hücre tabakası yer alır (22-23).

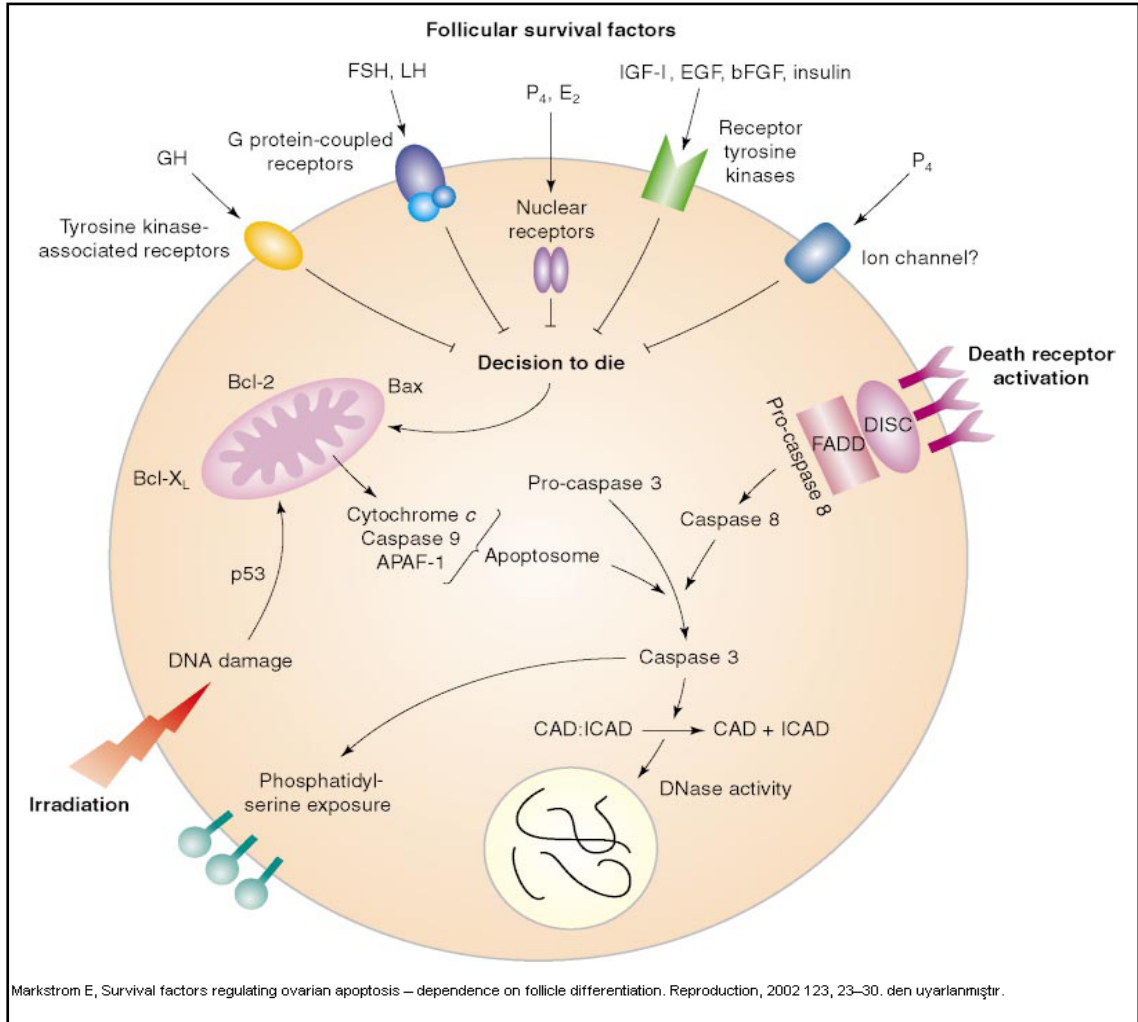
Havuzdan gelişecek primordiyal folliküllerin seçilmesi, bunların gelişmesi, dominant follikül seçimi, ovulasyon ve lüteinizasyon basamaklarından sonra follikül maturasyonu sağlanır (22-23).

Gelişme ve farklılaşmanın her basamağında atrezi görülebilir. Antral kavite oluşuktan sonra follikül FSH'a bağımlı hale gelir. LH pikine cevap veren folliküllerin sayısı korpus luteum sayısı ile aynıdır. LH pikine cevap veren folliküller ovulasyona kadar apopitoza uğramazlar. Folliküler atrezi, FSH-LH gibi endokrin faktörler, IGF-1, EGF, bFGF, aktivin, IL-1  $\beta$  gibi parakrin faktörler tarafında regüle edilirler. TNF $\alpha$ , GnRH, androjenler, IL-6 ve serbest radikaller de önemlidir. Granüloza hücre apopitozu protein sentez ve transkripsiyonuna bağımlı aktif hücrel bir olaydır (22-23).

Omurgalı canlıların overinde süregelen apopitoz doğumdan önce başlayıp reproduktif yaşam boyunca devam eder. Yapılan çalışmalarda, omurgalı overlerinde follikül atrezisinin apopitoz aracılığı ile olduğu gösterilmiştir. Hem germ hücrelerindeki hem de granüloza hücrelerindeki apopitoz fizyolojik veya patolojik sinyallerle başlatılabilir (23) (Şekil 3).

Bu sürecin merkezinde intraselüler sistein proteazlardan oluşan kaspaz ailesi vardır. Sürecin başlangıcından sonuna kadar farklı kaspazlar rol almaktadır. Aynı zamanda pek çok yolak ve intraselüler protein de rol oynar (24). Farklı gelişme aşamalarında farklı faktörler apopitozu regüle ederler. Folliküler atrezi ile ilgili çok sayıda çalışma modeli oluşturulmuştur. Granüloza hücre kültürlerinde serum yokluğunda spontan apopitoz izlenmiştir.

Hayatta kalım veya proapoptotik faktörlerin ortama eklenmesi spontan apoptoz oranını etkilemektedir. Ayrıca folliküler gelişimin tüm aşamalarında da apoptoz gösterilmiştir (23).



Şekil 3 Folliküler granüloza hücresinde apoptoz sinyalleri

## 2.2. APOPTOZ

### 2.2.1. APOPTOZ TANIMI VE TARİHÇESİ

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen “Apoptoz” 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 folliküler atrezi sırasındaki granüloza hücrelerinin kaybindan sorumlu olduğu tarif edilmiştir. Bundan iki yıl sonra da aynı araştırmacı aynı ölüm sürecini testiküler germ hücre dejenerasyonunda gözlemlemiştir. Bu çalışmalarda, apoptoz terimi kullanılmamış olsa da morfolojik olarak apoptotik hücrelerin ayrıntılı şekilde gösterilmesinden dolayı o dönemde en çok ilgi çeken çalışmalar olmuştur (25).

Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından, Yunancada apo (ayrılan) ve ptosis (düşen) terimleri birleştirilerek, 'ağaçtan dökülen yapraklar' anlamındaki 'apoptosis' terimiyle açıklanmıştır (25).

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 (26). 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 yada küçülmesi (nükleer piknosis) ve sitoplazma membranı içindeki fragmantasyonlar olarak bilinen apoptotik cisimciklerin (eski adıyla *Councilman bodies*) gözlemlenmesiyle karakterize etmişlerdir (25-26).

Wyllie 1984'de apoptotik hücrede morfolojik değişimlerin yanı sıra birçok karakteristik biyokimyasal belirteçin de olduğunu gözlemlemiştir (27). Bunlardan en önemlisi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile DNA da mono ve oligonukleozomal (180-200bp) birimlerin merdiven gibi belli aralıklarla kırıklar göstermesinin nükleer kromatin fragmantasyonu olarak bilinmesidir (25).

1999'da Horvitz ve arkadaşları tarafından, memelilerde apoptozun gelişimsel süreçteki moleküler mekanizması *C. elegans* (yuvarlak solucan) ile yapılan deneylerle açıklanmıştır. Çalışmada başlangıçtaki 1090 somatik hücreden 131'inin programlı bir şekilde öldüğü ve bunun apoptoz ile genetik olarak kontrol edildiği ortaya konmuştur (28). 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 (29). Apoptoz ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir (27).

Belirli bir dokuda hücre proliferasyonu mitozla, o dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenir (29). 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 (26-28).

Apoptoz 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, nörodejeneratif düzensizliğin nedeni olduğunu saptamıştır (30).

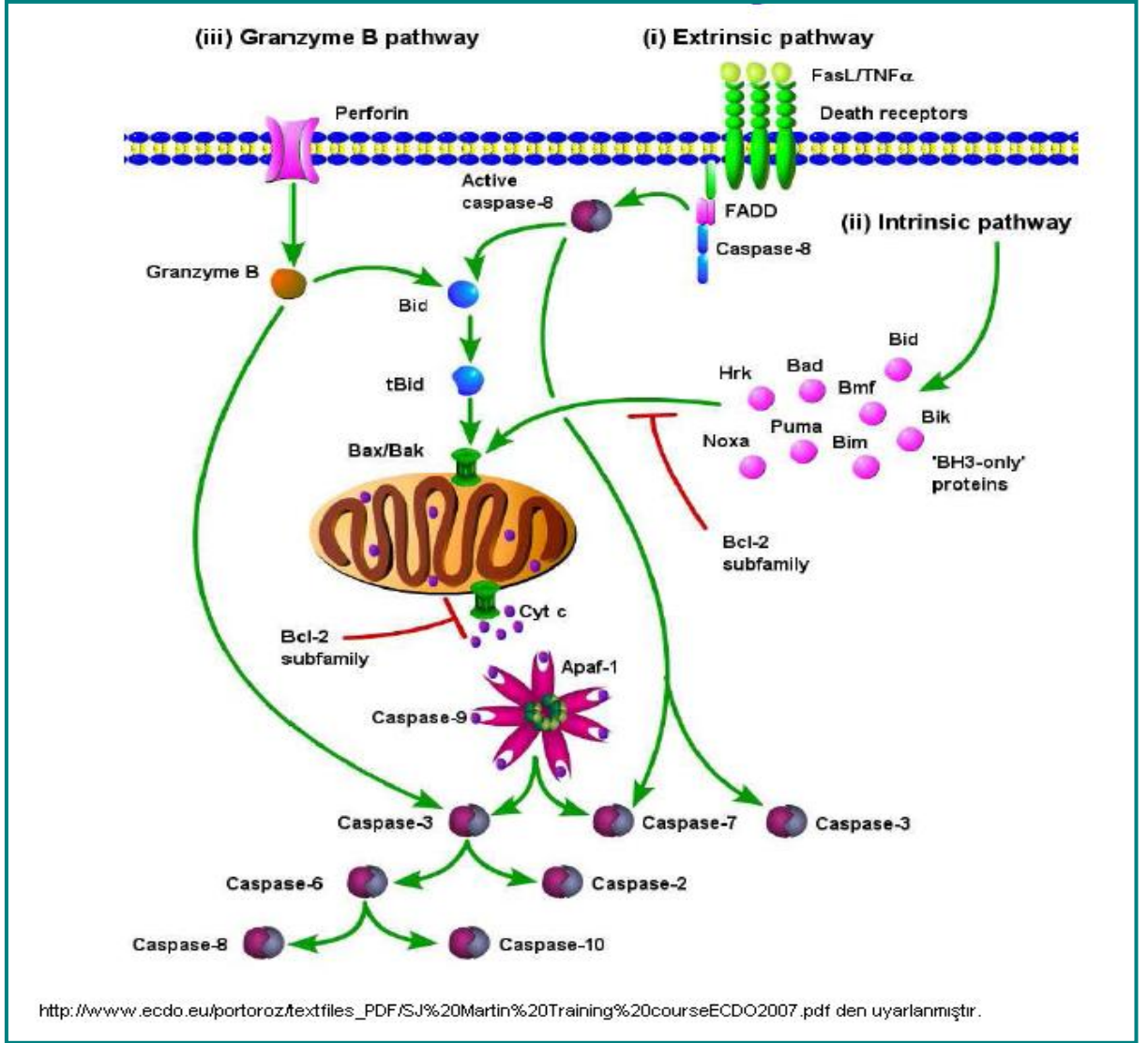
### 2.2.2. APOPTOZ MEKANİZMALARI

Apoptoz mekanizması oldukça karmaşık ve enerji bağımlı moleküler aktivite kaskadını içerir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, intrinsek ve ekstrinsek olmak üzere iki ana apoptotik yolak olduğu bildirilmiştir. Ancak bazı araştırmacılar Endoplazmik retikulum aracılı apoptozu üçüncü bir sınıf olarak tanımlamaktadırlar. Bir kısım araştırmacı, hücresel stresin kalsiyum salınımı ile mitokondriyal yolağı ya da Kaspaz 12 yi aktive etmesiyle apoptozu indüklediği görüşünü savunmaktadır (31). Bazı araştırmacılar ise intrinsek ve ekstrinsek yol ile bağlantılı olan ve bu yollardan birinin moleküllerini etkileyen başka bir apoptotik yolak olduğunu ileri sürmektedirler (32).

Bu sonradan tanımlanan yolak, T hücre aracılı sitotoksikite ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içerir. Ekstrinsek, intrinsek ve perforin-granzim yollarının üçü de aynı ölüm yolunda birleşirler.(Şekil4) Bu yol kaspaz-3 ün yarılanması ile başlatılır ve DNA fragmantasyonu, 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 (28).

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. Ekstrinsek; Ölüm reseptörleri yolu
2. İnterinsek; Mitokondriyal yol
3. Perforin –Granzim Yolu; Granül bağımlı Granzim A ve Granzim B yolu

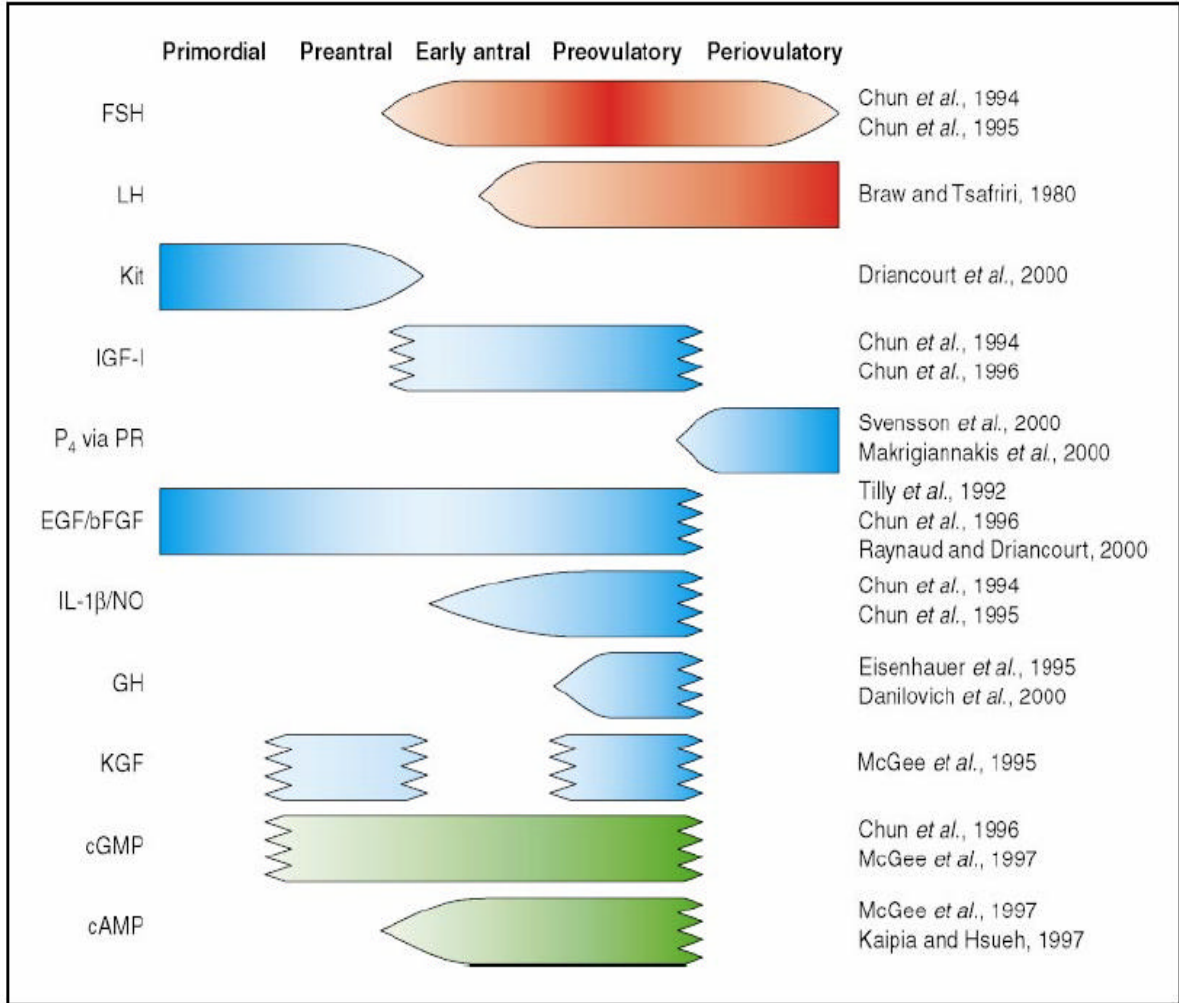


Şekil 4 Apoptoz mekanizmaları

Hücrede ölüm kararı verildiği zaman apoptotik ölüm araçlarının koordinasyonuyla 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) (Şekil 5). Sağlıklı folliküllerde kaspaz-3 inaktif formda bulunurken atretik folliküllerde aktif kaspaz-3 konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. Postnatal hayatta primordiyal follikül aşamasından preantral aşamaya kadar olan folliküllerde apoptoz özellikle oositin ölümüyle başlar (24)



Preantral folliküllerden preovulatuvar folliküle kadar olan atrezide ise apoptoz granüloza hücrelerinde başlar. İnfertil ovulatuvar sikluslarda korpus luteum regresyonunda da apoptozun önemli olduğu gösterilmiştir. Kaspaz 1,3,9 korpus luteum regresyonunda önemli kaspazlardır (24).



Şekil 5 Overde follikül gelişim basamaklarına bağlı olarak apoptozda etkili olan faktörler. Kırmızı: Gonadotropinler; mavi: lokal faktörler; yeşil: intraselüler mediatörler.

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 hücre artıkları ortamdaki uzaklaştırılır (23).

Apoptozun basamaklarını kısaca özetleyecek olursak;

- ☞ Apoptozun indüksiyonu,
- ☞ Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması,
- ☞ Sitokrom c'nin salıverilmesi,
- ☞ Apoptozom oluşumu (sitokrom c + Apaf-1 + kaspaz-9),
- ☞ Mitokondriyal transmembran potansiyelinin değişmesi,
- ☞ Kaspazların aktivasyonu,
- ☞ Fosfatidilserinin 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 (28).

## 2.3. KADIN İNFERTİLİTESİ

### 2.3.1. TANIMLAR

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. Doğurganlık çağındaki çiftlerin % 10-15'inde infertiliteye rastlanır. İnfertilitenin sıklığı ve nedenleri bir toplumdan diğerine farklılık gösterir. Çiftlerin yaklaşık %30-40'ında erkek, %40-50 sinde ise kadın infertiliteden sorumludur. Yüzde 10-15 çiftte ise günümüzdeki mevcut standart tanısal testler ile izah edilemeyen (açıklanamayan) infertilite mevcuttur (33-34).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organisation) kriterlerine göre normal semen parametrelerine sahip bir erkeğin değerleri aşağıdaki tablodaki gibidir:

**Tablo 1 Semen Analizi Normal Değerleri**

SEMEN ANALİZİ NORMAL DEĞERLERİ (WHO 1999)
Volüm: 2.0 ml veya daha fazla
pH: 7.2 - 8.0
Spermatozoon konsantrasyonu: 20 milyon spermatozoa/ml veya daha fazla
Total sperm sayısı: 40 milyon spermatozoa/ejakulat veya daha fazla
Motilite: Ejakulasyonu takiben 60 dakika içerisinde, %50 veya daha fazlasının ileri progresyon göstermesi (a + b kategorisinde); veya %25 yada daha fazlasının hızlı (a kategorisinde) progresyon göstermesi.
Morfoloji: %30 veya üzerinde normal form.
Vitalite: %75 veya üzerinde canlı (boya almayan) spermatozoa.
Lökosit: 1 milyon/ml'den az.
İmmunobead test: Partikül yapışmış spermatozoa oranının %20'den az olması.
MAR testi: Partikül yapışmış spermatozoa oranının %10'dan az olması.

Kadın infertilitesinin araştırılmasında öykü ve fizik muayene çok önemlidir. Sırasıyla tubo-peritoneal, ovulatuvar ve uterin nedenler değerlendirilir (35). Özellikle ovulatuvar nedenlere yönelik öykü çok şey anlatabilir. Düzenli adet öyküsü %91-97 ihtimalle ovulasyonun var olduğunu gösterir. Ovulasyonun varlığı ve kalitesi için kullanılan testler bazal ısı grafisi, serum progesteron ölçümü ve endometrial biyopsidir.

Uterin, tubal ve peritoneal nedenler için ultrasonografi (USG), histerosalpingografi (HSG), laparoskopi, histeroskopi kullanılmaktadır. USG ile Müller sistemine ait konjenital anomaliler, intramural ve submüköz myomlar, endometrial polipler, endometriomalar veya dermid kistler gösterilebilir. İnfertilite araştırmasında erken dönemde çekilecek HSG ile uterin anomaliler, intrauterin lezyonlar, intramural oklüzyonlar, intramural lezyonlar (tubal açıklık korunmuş olsa dahi), distal tubal oklüzyon ve bu olgularda gebelik açısından prognostik önemi olan intratübal mukozal katlantılar değerlendirilebilir. Histeroskopi ile intraservikal ve intrauterin lezyonlar değerlendirilir ve aynı seansta cerrahi işlem uygulanabilir (36).

Kronik anovulasyonun % 80 nedeni olan Polikistik Over Sendromu ilk olarak 1935 yılında Irving F. Stein ve Michael L. Leventhal tarafından amenore, hirsutizm, anovulasyon ve büyük polikistik overlerle karakterize semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır (3738).

Polikistik over, makroskopik olarak normal over büyüklüğünün 2-5 katı kadardır. Gros olarak beyaz bir kapsülle çevrilidir. Aynı sayıda primordial follikül vardır, ancak gelişen ve atreziye giden follikül sayısı iki kat artmıştır. Mikroskopide yüzeyel korteks, fibrotik ve hiposellülerdir ve damarları içerir. Küçük atrofik folliküllere ilaveten, artmış sayıda luteinize teka interna içeren folliküller de vardır (39). En dıştaki tunica kalınlığı 1/2 kat, kortikal stroma 1/3 kat, subkortikal stroma 5 kat artmıştır. Stromadaki artış, hem teka hücre hiperplazisine hem de aşırı follikül atrezisine bağlıdır. Over hilus hücre toplulukları normalden 4 kat fazladır (40).

Normal kadınlarla karşılaştırınca sürekli anovulasyonu olan PCOS'lu olgularda, LH konsantrasyonu daha yüksek, FSH konsantrasyonu ise düşük veya normalin alt sınırındadır (41). Yüksek LH ve düşük FSH şeklindeki gonadotropin tablosunun GnRH salgısının frekansında artış sonucunda hipofizde kısmi duyarlılık kaybına bağlı olması da mümkündür (42). Hipofiz ve hipotalamustaki duyarlılık artışına, östron düzeylerinde yükselmenin neden olduğu düşünülmüş, fakat son zamanlarda seks hormonu bağlayan globulin (Sex hormone-binding globulin, SHBG) konsantrasyonunda azalmanın da bu konuda etkin bir faktör olduğu bildirilmiştir. LH düzeyinde yükselme de serbest östradiol düzeyindeki yükselme ile pozitif bir bağlantı gösterir. FSH düzeyi tam supresyona uğramadığından sürekli olarak yeni folliküller gelişmekte ancak tam olgunluğa erişememekte ve ovulasyon olmamaktadır. Böylece bazen 15mm'ye dek büyüeyebilen, çoğunlukla 2-8mm çapında olan çok sayıda follikül kistleri oluşmaktadır. (37)

Atrezi sırasında granüloza 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 artırır, SHBG sentezi baskılanır. Sonuçta östrojen düzeyinde yükselmeye neden olur. SHBG'de azalma, serbest testosteronda iki kata yakın bir artışa neden olmaktadır (37).

Tubal Faktör; İnfertil çiftlerin %30-35'inde görülür. Laparoskopik adezyolizis sonrası, ilk bir yıl içerisinde, 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.

Açıklanamayan infertilite; İnfertil çiftlerin %10-30'ında görülür. Bu hastalar, normal semen ve normal ovuluar fonksiyona sahip, normal uterus yapısı ve bilateral tubal açıklığı olan hastalardır. Bu hastalarda siklus fekunditesi(çiftin fertilite potansiyeli) %2-4 tür. (Ortalama siklus fekundabilitesi normalde %20-25). Tedavi siklus fekunditesini arttırmaya yöneliktir (43).

#### **2.4. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)**

Serbest radikal reaksiyonları biyolojik sistemlerde önemli bir yer tutmaktadır. Serbest radikaller; son yörüngelerinde bir yada daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, kimyasal olarak çok aktif, zararlı moleküller olarak tanımlanırlar. Serbest radikaller; radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla veya radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşmaktadır. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabildiği gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşabilirler. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok reaktif olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermekte ve yararlı biyomoleküllerin fonksiyonlarını yitirmesine neden olmaktadır (44). Başlıca serbest oksijen radikalleri kaynaklarını şöyle sınıflandırabiliriz:

##### Endojen kaynaklar:

- \* Mitokondrial elektron transport zinciri
- \* Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda membrana bağlı sitokromların oksidasyonu
- \* Redoks döngüsü
- \* Araşidonik asit metabolizması (enzimatik lipit peroksidasyonu)

- \* Fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar vs.) ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar.
- \* Ksantin Oksidaz, NADPH Oksidaz vs. enzimler.
- \* Otoksidasyon reaksiyonları.

## Eksojen Kaynaklar:

\*Zararlı ışınlar (X-ray, U.V.)

- \* Diyet faktörleri
- \* Çevresel faktörler (hava kirliliği)
- \* İlaçlar, ksenobiyotikler

Serbest radikaller, genellikle toksinlere, infeksiyon etmenlerine, çevre kirleticilerine, ozona ve gün ışığına (özellikle ultraviyole ışınlar) maruz kalma sonucu aerobik hücre metabolizmasının bir yan ürünü olarak ortaya çıkar (45).

Düz kasların gevşemesi, damarların dilatasyonu, beyinde sinir iletimi, immun fonksiyonlar, trombosit agregasyonu gibi bir çok biyolojik süreçte sinyal ileticisi olarak rol alan NO ise yüksek konsantrasyonlarda toksiktir ve doku hasarına yol açabilir. (45)

Vücutta en sık oluşan serbest radikal moleküler oksijene bir elektron eklenmesi ile ortaya çıkan superoksit anyonudur. Hücreler hasta veya yaşlı olduğu zaman fazla miktarda serbest radikal üretirler. (45)

Organik moleküllerdeki yapısal öneminin dışında, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle oksijen, hayati bir öneme sahiptir. Aerobik organizmalar solunumla aldıkları oksijenin % 90'dan fazlasını Mitokondrial Elektron Taşıma Zincirinde enerji üretimi için kullanırlar. Oksijenin % 1-3'ü tam olarak suya dönüşemez ve süperoksit radikali ile hidroksil radikali oluşturur (46).

Oksijenli ortamda, çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS); hücrel protein, karbonhidrat, nükleotid ve lipidlerin kimyasal modifikasyonu ile doku hasarına sebep olabilmekte ve kanser, ateroskleroz, artrit, yaşlanma, inflamasyon, iskemi reperfüzyon hasarı ve birçok dejeneratif olayın da patogenezinde rol oynayabilmektedir (46). Önemli bazı ROS ve RNS molekülleri:

$O_2^-$	Süperoksit anyonu	Organizmada çeşitli kaynaklardan oluşur. Oluşum yerinden fazla uzağa difüzenmez ve ROS oluşur
$H_2O_2$	Hidrojen peroksit	Serbest radikal değildir. Fe, Cu gibi geçiş metalleri ile serbest radikal oluşturup, hücre membranını içe ve dışa geçebilir.
OH	Hidroksil radikali	Biyolojik moleküllere en kuvvetli atak yapan ve $H_2O_2$ varlığında, metal iyonu varlığında oluşan radikallerdir.
$RO\cdot, R\cdot, R-S\cdot$	Organik radikaller	Sırasıyla ROH, RH, RSH gibi yapıları moleküllerden köken alırlar
$RCOO\cdot$	Peroksit radikali	$LOO\cdot$ olarak da gösterilen örneğin lipid yıkımında oluşan organik peroksil radikali
HOCl	Hipoklor asidi	Zararlı mikroorganizmaları yıkan, nötrofi 1 oksidatif patlama reaksiyonunda üretilir. OCL halogenizasyon ve oksidasyon reaksiyonları için toksiktir.
$O_2$	Singlet Oksijen	Yüksek oksijen basıncında UV ışını in vivo toksik etkisi yoktur.
NO	Nitrik Oksid	NO sentaz ile endojen iyonlarına bağlanır. $O_2$ ve diğer $O_2$ içeren radikallere farklı RNS'lar üretir.
ONOO-	Peroksinitrit	Serbest radikal olmayan RNS, fakat güçlü okside ajan olarak, radikal olan $NO_2$ (nitrojendioksit) oluşturabilir.

#### 2.4.1. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞTURDUĞU HASARLAR

Serbest radikaller aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan savunma sistemi yetersiz kaldığında biyomoleküllere zarar verirler. Serbest oksijen türleri, membran lipidlerinin peroksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına enzimlerin ve proteinlerin sülfidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlanmalarına, DNA yapısının bozulmasına ve mukopolisakkaritlerin depolimerizasyonuna neden olarak doku hasarı oluşturur. Serbest radikaller hücre ve dokuda bir çok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir (47-48-50).

##### 1. Karbonhidratlara etkileri

Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzalaldehitler meydana gelir. Okzalaldehitler, DNA, RNA, ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterirler (49).

Karbohidratların proteinlere bağlanması, proteinleri serbest radikal hasarına daha duyarlı kılmaktadır. Böylece hormonal ve nörotransmitter yanıtlarda rol oynayan hücre reseptör işlevleri değişmektedir (51-52). Bir mukopolisakkarit olan hyalüronoik asit gözün vitreusunda bol miktarda bulunur. Hyalüronoik asidin oksidasyonu katarakt oluşumuna katkıda bulunur (49).

##### 2. Proteinlere etkileri

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin, özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Protein fonksiyonu için kritik pozisyonda olan amino asitler (örneğin enzimin aktif bölgesindeki amino asitler), özellikle radikal hasarına duyarlıdır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril (-SH) grubu bulunduran amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler, oksidasyona en fazla maruz kalanlardır (53).

Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır.



Bunun yanı sıra iskemi-reperfüzyon sürecinde hücre içi enzimlerden olan antioksidan enzimlerin oksidasyonları da bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın nedenlerinden birini oluşturabilmektedir (53).

### 3. Membran lipidlerine etkileri

Hücre membranı, bol miktarda doymamış yağ asidi içerdiğinden serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır. Ortamda bulunan serbest radikaller yağ asitlerinden bir proton kopararak “Lipid peroksidasyon” olarak bilinen reaksiyonun başlamasına neden olurlar (47).

Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi maddeler hücrenin bir çok komponentiyle reaksiyona girerek hücrenel ve metabolik fonksiyonlar üzerine toksik etki gösterirler (54).

Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur (54).

MDA, membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey determinantlarının bazı özelliklerini değiştirmektedir. Bu özelliklerinden dolayı MDA, mutajenik genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (54).

### 4. Nükleik asitlere etkileri

Serbest oksijen radikallerinin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makromolekül nükleik asitlerdir. Kalıtsal bilgiyi taşıyan deoksiribonükleik asidin (DNA) temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlar ile reaksiyona girerek değişikliklere yol açar (49).

#### 2.4.2. SERBEST OKSİJEN RADİKAL HASARININ BAŞLICA ÜRÜNLERİ

Reaktif oksijen türleri (ROS) DNA gibi hücrel makromoleküller, proteinler, lipidlerle reaksiyona girebilir ve çok çeşitli ürünler ortaya çıkmasına yol açabilirler. Bu ürünlerin bir kısmı oksidatif stresin biyokimyasal göstergeleri gibi kullanılmaktadır.

Serbest oksijen radikallerinin reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişlerinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadırlar. Oksidan moleküller organizmada başlıca glikozun oksidasyonu olmak üzere bütün anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırası ve sonrasında sürekli bir oluşum halindedir.

Endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından sürekli etkisizleştirme süreci içerisinde. Bu oluşum ve etkisizleştirme olayları organizmalarda bir denge halindedir (55-49). Serbest oksijen radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyöz ajanlara karşı savunmasındaki önemli moleküllerdir. Ancak, serbest radikaller belirli düzeyin üzerinde oluşur ve antioksidanlar yetersiz kalırsa söz konusu serbest radikaller hücrenin yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerin yapılarını bozarak zararlı etkilere yol açarlar (56). Bunlardan özellikle lipitler, serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna neden olurlar (57).

Serbest radikaller aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan savunma sistemi yetersiz kaldığında biyomoleküllere zarar verirler (47). Serbest oksijen radikalleri, membran lipidlerinin peroksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına enzimlerin ve proteinlerin sülfidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlanmalarına, DNA yapısının bozulmasına ve mukopolisakkaritlerin depolimerizasyonuna neden olarak doku hasarı oluşturur. (47-48).

Hücrelerin çoğunluğu, olağan koşullar altında kendilerini serbest radikallerin hasar verici etkilerine karşı koruyacak hücre içi ve hücre dışı kimyasal mekanizmalarla donatılmışlardır. Radikal moleküller, antioksidan savunma gücü ile dinamik bir denge içinde bulunduğu sürece organizma için yararlıdır. Fagositik hücreler tarafından mikroorganizmaların öldürülmesinin ana mekanizması serbest radikal üretimidir. Serbest radikaller apoptozun tetikleyicisi, habercisi ve efektörü olarak görev yaparlar (48-59)

Bu şekilde; aşırı hücre poliferasyonunu önleyerek homeostaziste de yer almaktadırlar. Antioksidan savunmanın çökmesi de apoptozi tetiklemektedir. Serbest radikaller ikinci haberci olup, transkripsiyon faktörlerini aktive ederler. Hücreler arası haberleşmede görev alırlar. Hücrenin büyümesini sağlayan olayları düzenlerler (48-49).

Sitozolde ve mitokondride üretilen serbest oksijen radikali, protein sistein kalıntılarının redoksunu düzenleyerek proteinlerin yapı ve işlevinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Serbest oksijen radikalleri üretimi ve antioksidatif savunma mekanizması arasındaki denge bozulduğunda, serbest oksijen radikalleri düzeyi artar. Radyasyon, oksijen toksisitesi, postiskemik reperfüzyon hasarı, enfeksiyonlar, enflamasyonlar yanı sıra yaşlanma ile ilgili hastalıklardan katarakt, ateroskleroz, karsinogenez, diyabet ve nörolojik hastalıklar serbest oksijen radikalleri üretimini artırır (47-48-50-58).

#### 2.4.3. *ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ*

Aerobik canlılarda serbest oksijen radikalleri, normal metabolik olaylar esnasında oluşmaktadır. Serbest radikaller, aşırı miktarlarda üretildikleri zaman serbest radikallere bağlı hasarlar ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar, dört farklı mekanizma ile serbest radikal hasarını engellerler:

- 1.Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi
- 2.Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi
- 3.Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi
- 4.Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilirler

1. Yapılarına göre

- a) Enzimler
- b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller

2. Kaynaklarına göre

- a) Organizmaya ait olanlar (Endojen)
- b) Dışarıdan alınanlar (Eksojen)

3. Çözünürlüklerine göre

- a) Suda çözünenler
- b) Yağda çözünenler

4. Buldukları yere göre

- a) Hücre içinde bulunanlar
- b) Plazma ve diğer vücut sıvılarında bulunanlar

#### Antioksidan Etki Tipleri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme şeklinde izlenen etkidir. Antioksidan enzimler toplayıcı etki gösterirler.

2) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bir H<sup>+</sup> aktararak onları inaktive etme şeklindedir. Vitaminler ve flavonoidler bu şekilde etki gösterirler.

3) Onarıcı etki

4) Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme şeklindedir. Bu şekilde etki eden antioksidanlar hemoglobin, seruloplazmin, vitamin E, C, A, transferrindir (59).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. OLGULAR**

Bu çalışmaya Nisan 2008 ile Aralık 2008 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tüp Bebek Merkezi'ne çocuk sahibi olamama şikayeti ile müracaat eden primer yada sekonder infertil tanısına ek olarak PCOS, erkek faktör ve açıklanamayan infertilite tanısı konan ve yardımla üreme tekniği siklusuna alınan 30 hasta katıldı. Hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek, aydınlatılmış onamları alındı. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun 19/03/2008 gün ve 13 sayılı kararı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 28/03/2008 gün ve 120 sayılı kararı ile çalışmaya başlandı.

Olguların çalışmaya alınma kriterleri;

- En az bir yıldır infertilite öyküsü olan,
- Primer ya da sekonder infertil,
- PCOS, erkek faktör ve açıklanamayan infertilite tanısı konan
- Menstrasyonun 3. günü yapılan transvajinal USG ile her iki overdeki toplam antral follikül sayısı < 8 olan
- Basal FSH < 12, >9 olan
- Adetin 3. günü yapılan FSH düzeyi 10 mIU /L'den az olan hastalar,

Çalışmamızda yaş sınırlaması yoktur. PCOS tanısı, diğer etyolojik nedenler ekarte edildikten sonra aşağıdaki şu üç kriterden ikisinin birlikteliği ile koyulmuştur :

1. Oligo-anovulasyon,
2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları,
3. Ultrasonografide polikistik overler.

Çalışma, erkek faktör, PCOS ve açıklanamayan infertilite nedenleri ile kliniğimize yardımla üreme tekniklerinden birinin uygulanması için başvuran hastalardan elde edilen follikül sıvılarında ve bu sıvılarla beraber gelen granüloza hücrelerinde gerçekleştirildi.

### 3.2. OVARYUM STİMÜLASYON PROTOKOLÜ

Çalışmaya katılan 30 olgudan gerekli görülen hastalara (n= 28 ) GnRH analogu (Lucrin; Abbot, Türkiye / Suprefact; Sanofi Aventis, Türkiye) ile bir önceki siklusun luteal fazının ortasından başlayarak uzun protokol ile hipofizer down regülasyon yapıldı.

Optimum down regülasyon sağladıktan sonra bireyselleştirilmiş dozlarda rekombinant FSH (Gonal-F, Serona, Türkiye/Puregon; Organon, Türkiye) veya Human menopozal gonadotropin (Menogon; Erkim, Türkiye/ Menopur; Erkim, Türkiye) ile indüksiyon başlandı. Analog kullanılmayan hastalara (n=3) gonadotropin tedavisi başladıktan beş ile altı gün sonra GnRH antagonist (Orgalutron; Organon, Türkiye/ Cetrotide; Serona, Türkiye) tedavisi eklenerek eksojen gonadotropin uyarısına devam edildi. Folliküler büyüme düzenli olarak ultrason ölçümleri ile takip edildi. En az iki follikül çapı 18 mm olunca 10.000 IU hCG (Human koryonik gonadotropin) (Pregnyl, Organon, Türkiye) uygulandı.

Oosit toplama işlemi hCG yapıldıktan ortalama 35,5 saat sonra gerçekleştirildi. Oosit toplama öncesi hastalardan idrarlarını yapmaları istendi. Hastalara intravenöz sedasyon için midazolam (dormicum ampul 5mg/5ml, Roche, Türkiye) 0,02mg/kg, fentanyl (fentanyl citrate ampul, Abbot, Türkiye) 1mcg/kg ve propofol (propofol flakon 500mg/ml, Abbot, Türkiye) 1mg/kg dozlarında kullanıldı. Oosit toplama işlemi öncesi vajen steril salin solüsyonuyla yıkandı. Steril bir kılıf içindeki transvajinal USG probu (7,5 MHz Endovaginal Probe, Siemens, Japonya) ve beraberinde tutturulmuş aspirasyon iğnesi (Gynetics, Hamont-Archel, Belçika) overleri görmek ve follikülleri aspire etmek için kullanıldı. Çalışmaya dahil edilecek hastaların oosit toplama işlemi öncesi yapılan ultrasonografik incelemeleri sonucunda 10 ve üzerinde folliküle sahip olan olgular çalışmaya dahil edildi. Alınan folliküler sıvılar, 16 G'lik iğneler ile 15–20 mm büyüklüğündeki ve proba en yakın folliküllere keskin olarak girildikten sonra, 125 mmHg vakum basıncında aspire edilerek elde edildi.

Her bir follikül ayrı ayrı aspire edildi. Her aspirasyondan sonra bir sonraki follikül sıvısının kontaminasyonunu önlemek için set temizlendi ve yeni toplama tüpü kullanıldı. Her bir hastadan çalışma için 1–4 arası follikül aspire edildi. Her follikülden ortalama 2–7 ml sıvı alındı. Çalışma için yapılan follikül aspirasyon işleminden sonra standart yöntemlerle hastanın yumurta toplama işlemi tamamlandı. Yıkama sıvısı ve kan ile kontamine olmuş follikül sıvıları ve oositleri çalışmaya dâhil edilmedi. Aspire edilen her follikül sıvısı 60x15 mm'lik polisteren dişlere (BD Falcon 60x15mm petri dish, Biosciences, ABD) ayrı ayrı kondu.

Oosit elde edilen sıvı, içerisindeki oosit alındıktan sonra steril pipetle ayrı steril, ajirojen, polipropilen konik tabanlı 15 ml hacimli tüplere (BD Falcon, Biosciences, ABD) konu.

Folikül sıvılarından elde edilen granüloza hücreleri yumurta toplam günü hazırlanan kültür kabına alındı. Bu kültür kabının (Falcon 353037,60x15 mm ) dışına 2 ml, iç kısmına 1 ml HEPES ile desteklenmiş Quinn's Advantage medyum (SAGE Biopharma, Bedminster, NJ, ABD) konularak hazırlandı. Alınan follikül sıvı örneği, debrisi ve granüloza hücrelerini uzaklaştırmak için, 2000 devir/dk hızda, 4°C de, 10 dk santrifüj edildi.

Süpernatant 6 ayrı steril polipropilen tübe en az 0,5 ml sıvı içerecek şekilde her bir follikül için ayrı steril pipet kullanılarak eşit miktarlarda bölündü. Materyaller -80°C'de analiz gününe kadar saklandı.

Standart oosit toplama işlemi tamamlandıktan sonra işlem sırasında center well dishe alınan granüloza hücreleri lizinli lamlara yayılarak kurumaya bırakıldı. Olgu başına 3 lam yayıldı. Lamlar kuruduktan hemen sonra alkol fiksasyonuna tabi tutuldu ve bu lamlar boyama yapılacak güne kadar +4°C'de saklandı.

Ultrastrüktürel olarak transmisyon elektron mikroskopunda hücre morfolojisi değerlendirmesi yapılacak örnekler için granüloza hücreleri oosit toplama işlemi sırasında elde edilen aspirasyon sıvısının tamamı kullanılarak hazırlandı. Granüloza hücrelerinin eldesi için birçok yöntem olmasına karşın en çok hücreyi gradient yöntemi ile elde edebileceğimiz için üçlü gradient yöntemi kullanıldı. PureCeption™ 100 stok solüsyondan %40lık, %60lık ve %80lik solüsyonlar hazırlandı. En yüksek derişimden en az derişime doğru olacak şekilde 3 tabaka halinde bu solüsyonlar konik tüplere konu ve en az 10 dk ısınması için bekletildi. İçinden oositler alınmış aspirasyon sıvısı steril pipetle ayrı steril, ajirojen, polipropilen konik tabanlı 15 ml hacimli tüplere (BD Falcon, Biosciences, ABD) konu ve 3000 devir/dk hızda, 4°C de, 10 dk santrifüj edildi. Oluşan süpernatant uzaklaştırılarak pelletler hazırlanan üçlü gradient sıvısının üstünden yavaşça konu ve granüloza hücreleri ile diğer hücreleri ve artıkları ayırabilmek için 3000 devir/dk hızda, 4°C de, 10 dk santrifüj edildi. Orta tabakada biriken granüloza hücreleri dikkatlice alınarak başka bir tüpe aktarıldı(yaklaşık 1,5ml).

Granüloza hücrelerinin agregasyonunun önlenmesi için 5µl hyaluronidaz solüsyonu ilave edilip pastör pipeti ile mekanik olarak karıştırıldı. Hem bu enzimin hem de yıkama sıvısının uzaklaştırılması için iki kez fosfat tampon solüsyonu (phosphat buffer solution, PBS, Biochrom AG®) ile yıkama yapıldı.

Bu işlem 2000 devir/dk hızda, 4°C de, toplam 10 dk santrifüj olacak şekilde yapıldı. Son yıkama işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine %2,5luk glüteraldehit solüsyonu konularak TEM takip prosedürü yapılacak güne kadar +4°Cde buzdolabında bekletildi.

### **3.3. APOPİTOZUN BELİRLENMESİ**

#### *3.3.1. TUNEL PROTOKOLÜ*

- DNA kırığının antikor ile terminal uçtan işaretlenmesi esasına dayanır.
- Hazır kit solüsyonlarından birinci şişe Enzim solüsyonu ikinci şişe İşaretleme (Label) solüsyonudur. Boyamaya başlanmadan önce bu solüsyonların karıştırılarak TUNEL reaksiyon karışımının hazırlanması gerekir. Bunun için ikinci şişeden 100µl negatif kontrolde kullanılmak üzere ayrıldı. Kalan stok solüsyonun üzerine ilk şişeden 50µl eklenip iyice vortekslendi. Böylece 500µl lik reaksiyon karışımı elde edildi.
- Oosit toplama günü işlem sırasında elde edilerek lizinli lamlara yayılan ve %96lık etanolle fikse edilip +4°C de muhafaza edilen lamlar boyama işlemine başlanmadan önce PBS ile yıkandı.
- 400µl %30luk stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,6 ml PBS ile karıştırılarak %3 lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hazırlandı.
- Lamlar PBS ile yıkandıktan sonra belirlenen alana %3 lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koyulup 10dk oda sıcaklığında bekletildi.
- PBS ile yıkanma yapıldı. Belirlenen alanın etrafındaki fazla sıvı alındıktan sonra reaksiyon karışımı alanın tamamını kapatacak şekilde konup ve 60 dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- 3kez PBS ile yıkanıp fazla sıvısını kurulan lamların üzerine 50 µl Converted POD (3.şişe) ilave edildi ve 30 dk 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- Bu süre içinde bir sonraki basamakta kullanılacak olan DAB yarım saat önceden hazırlandı. Bunun için 300 µl DAB substratı 2700 µl DAB dilüsyon ile karıştırıldı ve karanlık bir yerde bekletildi.
- İnkübasyon süresi sonunda 3 kez PBS ile yıkanıp fazla sıvısını alınan lamın üzerine hazırlanan DAB solüsyonunu koyulup yaklaşık 2 dk beklendi.



\*Hücrelerin boyanması mikroskopta takip ederek süre değiştirilebilir. Ancak 10 dk fazla süre tutulmamalıdır.

- Distile suyla durulanan lamaların üzerine Harris Hematoksilen konup 10-15 sn beklendi yine distile suyla yıkandı.
- Zemin boyaması yapılan lamalar kurutulmadan ksilolden geçirilip entellan ile kapatıldı.
- İmmersiyon yağı altında X100 'lük ışık mikroskobuyla incelendi.
- Preparat başına en az 1000 hücre sayılarak sonuçlar % cinsinden değerlendirildi.

### 3.4. ROS VE ANTIOKSİDAN TAYİNİ

Oksidatif stresin belirlenmesi için, yıkamasız alınan follikül sıvılarında ROS ve antioksidan enzimlere ayrı ayrı bakıldı. ROS için, lipit peroksidasyon oluşumu spektrofotometrik yolla ölçüldü.

#### *SPEKTROFOTOMETRİK MDA (MALONDİALDEHİT) ÖLÇÜMÜ*

- OPU işlemi sırasında alınıp -80 °C'de bekletilen follikül sıvıları 10 dakika oda ısısında çözüldü.
- 200 µL tüplere konuldu.
- Her tüpe 10'ar µL probukol eklendi. (Bioxytech, Oxis Research, MDA 586®)
- Her tüpe 640 µL R1 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslendi.
- Her tüpe 150 µL R2 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslendi.
- 45°C de 60 dakika inkübe edildi.
- Temiz bir süpernatant için örnekler santrifüj edildi (ör. 10,000g X 10 dk).
- Temiz süpernatant kısım ölçüm küvetine konularak spektrofotometre ile 586 nm absorbanla ölçüldü (HACH-LANGE DR 5000®).

#### *SPEKTROFOTOMETRİK GLUTATYON PEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ*

- OPU işlemi sırasında alınıp -80 °C'de bekletilen follikül sıvıları oda ısısında çözüldü.
- Spektrofotometre absorbanı 340 nm ye ayarlandı (sıcaklık 23-25°C).
- Distile su ile sıfırlanarak ölçüm yapıldı.

- Çabucak örnek tampon solüsyonla 1/10 oranında dilüe edildi (Ör 30 µL + 270 µL tampon) (Bioxytech Oxis research GPx 340®).
  - Pipetle ölçüm küvetine, 350 µL Tampon solüsyonu, 350 µL NADPH reaktifi, 70 µL örnek konuldu.
  - Küvet spektrofotometreye yerleştirildi.
  - Küvete 350 µL dilüe tert-Butyl Hydroperoxide reaktifi eklenerek köpürtmeden pipetle karıştırıldı.
  - 3 dakika boyunca A340 nm’de değişim kaydedildi.
- Çalışma solüsyonu dilüe edildi. 1/100 dilution of tert-Butyl Hidroksit: 0.05 mL tert-Butyl Hydroperoxide stoktan + 4.95 mL distile su, 1/100 ara solüsyon dilüesi, 0.2 mL ara solüsyon + 19.8 mL distile su) (HACH-LANGE DR 5000®).

#### *TOTAL PROTEİN ÖLÇÜMÜ*

- OPU işlemi sırasında alınıp –80 °C’de bekletilen follükül sıvıları oda ısısında çözüldü.
- Tüpe 1000µL reaktif 1 konuldu.
- 20µL örnek ilave edildi ve 5 dk 37 °C ‘de bekletildi.
- Spektrofotometre ile ölçülerek değerler yazıldı.

### **3.5. ULTRASTRÜKTÜREL İNCELEME**

#### *3.5.1. ELEKTRON MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ*

- PureCeption™ 100 stok solüsyondan %40lık, %60lık ve %80lik solüsyonlar hazırlanıp en yüksek derişimden en az derişime doğru olacak şekilde 3 tabaka halinde bu solüsyonlar konik tüplere konup en az 10 dk ısınması için bekletildi.
- Aspirasyon sıvısı steril pipetle ayrı steril, apirojen, polipropilen konik tabanlı 15 ml hacimli tüplere (BD Falcon, Biosciences, ABD) konup 3000 devir/dk hızda, 4°C de, 10 dk santrifüj edildi.
- Oluşan süpernatant uzaklaştırılarak pelletler hazırlanan üçlü gradient sıvısının üstünden yavaşça kondu ve granüloza hücreleri ile diğer hücreleri ve artıkları ayırabilmek için 3000 devir/dk hızda, 4°C de, 10 dk santrifüj edildi.
- Orta tabakada biriken granüloza hücreleri dikkatlice alınarak başka bir tüpe aktarıldı (yaklaşık 1,5ml).

- Granüloza hücrelerinin agregasyonunun önlenmesi için 5µl hyaluronidaz solüsyonu ilave edilip pastör pipeti ile mekanik olarak karıştırıldı.
- Hem bu enzimin hem de yıkama sıvısının uzaklaştırılması için iki kez fosfat tampon solüsyonu (phosphat buffer solution, PBS, Biochrom AG®) ile yıkama yapıldı. Bu işlem 2000 devir/dk hızda, 4°C de, toplam 10 dk santrifüj olacak şekilde yapıldı.
- Son yıkama işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 2ml %2,5luk glutaraldehit solüsyonu konularak TEM takip prosedürü yapılacak güne kadar +4°Cde buzdolabında bekletildi.
- Lam üzerine agar damlatılarak (%5) kuruduktan sonra küçük parçalara bölünerek doku takibine alındı.
- Sorensen fosfat buffer ile 3–4 kez değiştirilerek 15–20 dk yıkandı (glutaraldehit şişelerinden boşaltılıp üzerine tampon solüsyonu konuldu).
- 1 kısım PBS+1 kısım osmium tetroksit (OsO<sub>4</sub>) solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi. (ependorf tüplerin içine 500 µl OsO<sub>4</sub> + 500 µl tampon konuldu. Bu işlem her şişe için otomatik pipet kullanılarak yapıldı. Tüpler alüminyum folyo ile kapatılıp oda sıcaklığında 1 saat karanlık ortamda bekletildi.)
- PBS ile 15–20 dk yıkandı (Üç küçük beher içine PBS konuldu. OsO<sub>4</sub>' ten çıkan parçalar çalkalandı. Çıkan parçalar kurutma kâğıdında süzdürülüp en son içinde tampon olan eppendorf tüpe konuldu.)

#### Dehidratasyon İşlemi

- % 70 Alkol .....10 dakika
- %100 ( Absolu) Alkol.....10 dakika
- %100 ( Absolu) Alkol.....10 dakika
- Propilen oksit .....15 dakika
- Propilen oksit .....15 dakika

#### İnfiltrasyon işlemi

- Dokudaki propilen oksiti (Merk®), agara gömülen pellet parçalarını kurutmayacak şekilde 1:1 oranında hazırlanan propilen oksit + araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
- Arada hafif hareketlerle karıştırıldı.

- Agara gömülen pellet parçaları (1:1) araldite CY212 Resin (TAAB®) ve DDSA (dodecenyl succinic anhydride TAAB®) karıştırılarak her şişeye 2 mL konuldu. Yeni araldit karışımında yaklaşık 6-12 saat bekletildi.
- Araldite CY212 Resin (TAAB®) ve DDSA (TAAB®) 1:1 oranında karıştırılarak bu yeni karışıma gömülecek materyal sayısına göre hesaplanarak BDMA (Benzyl Dimethylamine TAAB®) ilave edildi. Böylece gömme aralditi hazırlanmış oldu.
- Pellet parçaları önceden hazırlanan bu gömme aralditine alındı.
- Bu karışım içine gömülen parçalar 60°C 'lik etüvde 48 saat polimerize edildi.
- Daha sonra yarı ince kesitleri alınarak toluidin mavisiyle boyanıp alan belirlendi.
- Belirlenen alanlardan ince kesitler formvarlanmış gridler üzerine alındı.
- Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlaması yapılarak trasmisyon elektron mikroskopunda (Carl Zeiss Libra 1200) değerlendirildi.

### 3.6. İSTATİSTİK

Granüloza hücrelerindeki apoptozun değerlendirilmesinde Mann-Whitney U-testi yada Kruskal- Wallis testi, parametreler arasındaki korelasyonun araştırılmasında Pearson's linear korelasyon yöntemi, ROS üretimi ve granüloza hücrelerindeki apoptoz arasındaki ilişkinin saptanmasında ise Linear regresyon yöntemi kullanıldı. Bu analizler yapılırken SPSS 16.0 for Windows versiyonu kullanıldı. Sonuçlar sunulurken ortalamalar standart hataları ile birlikte verildi (Ort±SH).

#### 4. **BULGULAR**

Çalışmamıza dahil edilen 30 olguyu çeşitli parametrelerde değerlendirdiğimizde Tablo2 deki sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, çalışmamıza dahil edilen olguların yaş ortalaması  $28,84 \pm 0,7$  olarak bulundu. İnfertilite sebeplerine göre değerlendirme yapıldığında PCOS olgularında yaş ortalaması  $29 \pm 1,3$  , açıklanamayan infertil grubunun yaş ortalaması  $29 \pm 0,9$  ve erkek faktör grubunun yaş ortalaması ise  $28,5 \pm 1,5$  olarak bulundu. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p < 0,005$ , Tablo 2). Bu değerlendirme bize çalışmaya dahil edilen olguların yaş dağılımının düzenli olduğu sonucunu verdi.

Bu olgulardan alınan follikül sıvıları volümleri ortalaması  $3,6 \pm 1,9$  mL iken PCOS grubunda  $4,2 \pm 1,2$  mL, açıklanamayan infertil grupta  $3,2 \pm 2,5$  mL, erkek faktör grubunda  $3,8 \pm 1,2$  mL olup aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu.

Çalışmamıza dahil edilen olgularda elde edilen oosit sayıları infertilite sebebine göre karşılaştırıldığında; PCOS lu olgulardan elde edilen oosit sayısı ortalaması  $24,45 \pm 2,3$ , açıklanamayan infertil grubundaki oosit sayısı  $19,10 \pm 2$  ve erkek infertil gruptaki oosit sayısı da  $17,40 \pm 2$  olarak bulundu. Yapılan değerlendirme sonucunda PCOS ile diğer iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen ( $p < 0,05$ ), açıklanamayan infertil grubu ile erkek infertil grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ( $p > 0,05$ ).

Her ne kadar çalışmamızın planlanmasında oosit maturasyonu, endometrium kalınlığı ve gebelik faktörlerinin değerlendirilmesi ve kıyaslamaların 35 yaş sınırına göre yapılması planlanmamış olsa da genel hasta popülasyonunun değerlendirilmesi amacıyla bu veriler de karşılaştırılmıştır.

Elde edilen oositlerin maturasyonları değerlendirildiğinde; PCOS lu olgularda hem sitoplazmik hem nukleer maturasyonlarını tamamlamış oositlerin ortalaması (MII oosit)  $19,1 \pm 1,6$  , açıklanamayan infertil grupta  $14,1 \pm 1$  ve erkek faktör grubunda ise  $13,9 \pm 2$  idi. PCOS grubu ile diğer iki grup arasındaki oosit maturasyonları açısından elde edilen bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. ( $p = 0,03$ , Tablo 2).

İnfertilite sebebine göre endometriyum kalınlıkları karşılaştırıldığında ise her üç grupta da genel ortalamaya yakın değerler bulundu ve bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 0,4$ , Tablo 2)

**Tablo 2 İnfertilite sebeplerine göre karşılaştırmalar**

	PCOS	AÇIKLANAMAYAN	ERKEK	TOPLAM	P
N	11	10	10	31	-
Yaş	29 ± 1,3	29 ± 0,9	28,5 ± 1,5	28,84 ± 0,7	>0,005
Siklus sayısı	1,27 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,26 ± 0,1	0,94
Oosit sayısı	24,45 ± 2,3	19,10 ± 2	17,40 ± 2	20,45 ± 1,3	0,07
M2	19,1 ± 1,6	14,1 ± 1	13,9 ± 2	16,1 ± 1	0,03
M1	1,64 ± 0,5	1,3 ± 0,36	0,6 ± 0,2	1,19 ± 0,24	0,22
GV	1,55 ± 0,45	1,7 ± 0,79	1,1 ± 0,31	1,45 ± 0,31	0,73
Endo. (mm)	9,5 ± 0,46	9,1 ± 0,52	10,2 ± 0,65	9,6 ± 0,31	0,40
Gebelik	0,45 ± 0,15	0,5 ± 0,16	0,40 ± 0,16	0,45 ± 0,09	0,91

Çalışmamıza dahil edilen olgular yaşlarına göre değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar Tablo 3 te gösterilmiştir. Bu verilere göre 35 yaş altı gruptaki olgulardan elde edilen oosit sayısı ortalaması (24,67±1,8) , 35 yaş ve üstü gruptaki olgulardan elde edilen oosit sayısı ortalamasına (20±1,4) göre yüksek bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,255).

Elde edilen oositlerin maturasyonları değerlendirildiğinde; 35 yaş altı grupta hem sitoplazmik hem nukleer maturasyonlarını tamamlamış oositlerin ortalaması 21,67±1,8 iken bu ortalama 35yaş ve üstü grupta 15 ± 1,4 olarak bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0,045, Tablo 3). Benzer şekilde elde edilen oositlerden maturasyonlarını tamamlayamamış olanlarının (M1ve GV safhasındaki) ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 35 yaş altı grupta daha düşüktü (Tablo 3). Bu veri bize 35 yaşın kadın infertilitesi açısından önemini göstermektedir.

**Tablo 3 Yaşlara göre karşılaştırmalar**

	< 35	≥ 35	P
N	28	3	-
TUNEL (%)	32,76 ± 1,38	45,08 ± 0,8	<b>0,013</b>
GPx (mU/mL)	31,53 ± 3,7	62,01 ± 4,5	<b>0,027</b>
MDA (µM)	8,4 ± 0,18	7,9 ± 0,45	0,285
Oosit sayısı	21,67 ± 1,8	15 ± 1,4	<b>0,045</b>
M2	19 ± 1,7	15,79 ± 1,2	0,403
M1	1,1 ± 0,2	2 ± 1,15	0,293
GV	1,36 ± 0,3	2,33 ± 0,6	0,143

#### 4.1. IŞIK MİKROSKOBU DEĞERLENDİRMESİ

Granüloza hücrelerinin ışık mikroskopik değerlendirilmesinde, uygulanan TUNEL testinde sonuçlar % cinsinden değerlendirilerek incelendi. Bütün olgularda TUNEL pozitif hücre ortalaması %33,95 ± 1,41 di. Gruplar içinde infertilite sebebi PCOS olan olgularda hücre ortalaması %32,21 ± 2,24 (Resim1-2), erkek faktör olgularında %28,7 ± 1,97(Resim5-6) ve açıklanamayan infertilite olgularında ise %41,11 ± 1,41 (Resim3-4) bulundu. Açıklanamayan infertil grubunda TUNEL pozitif hücre ortalaması istatistiksel olarak da anlamlı şekilde yüksek bulundu. (p<0,01, Tablo4) .

**Tablo 4 İnfertilite sebebine göre apoptozun değerlendirilmesi**

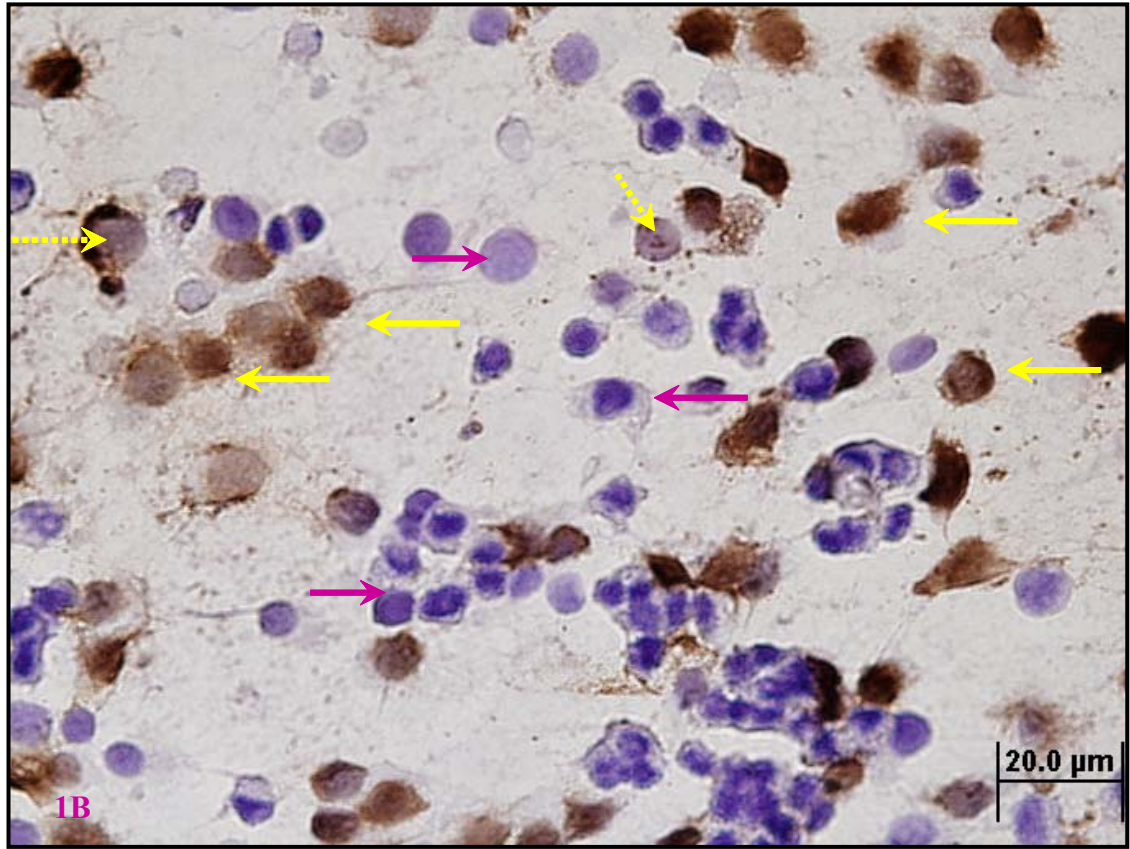
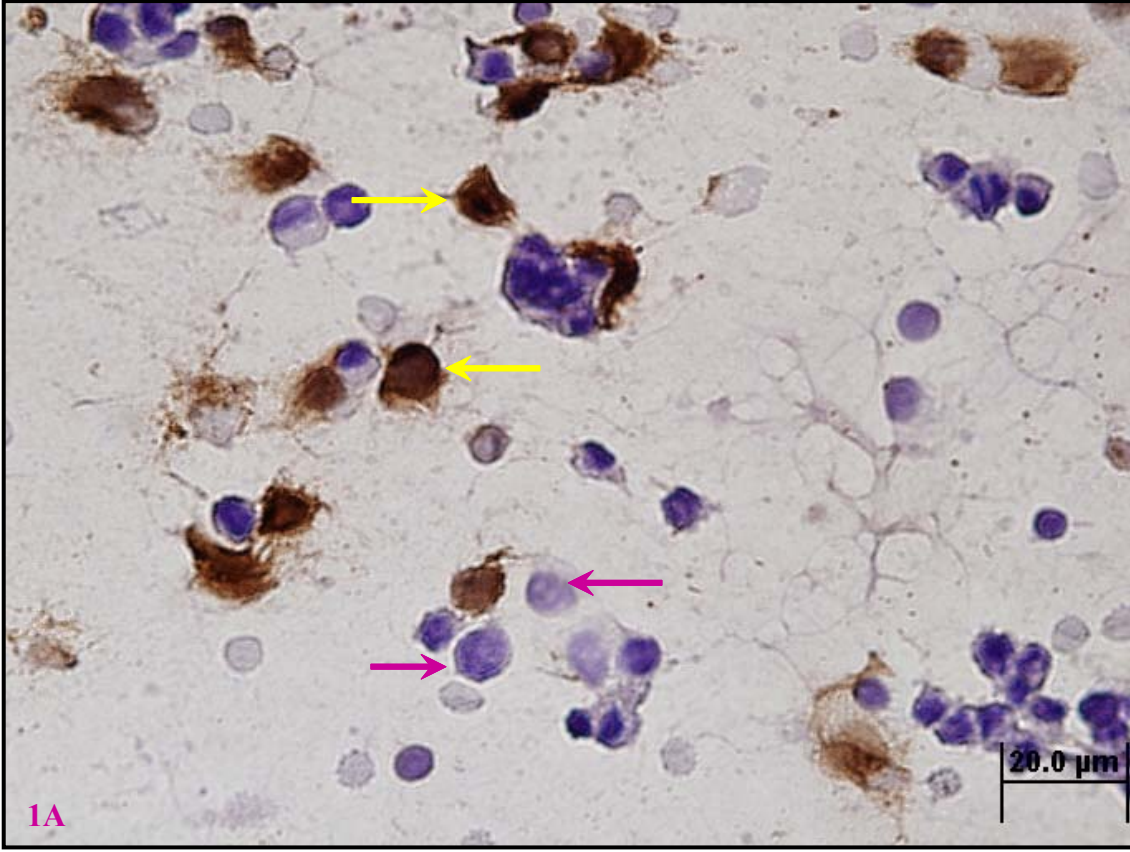
	PCOS	AÇIKLANAMAYAN	ERKEK	TOPLAM	P
N	11	10	10	31	-
TUNEL (%)	32,21 ± 2,24	41,11 ± 1,28	28,7 ± 1,96	33,95 ± 1,41	< 0,001

Granüloza hücrelerindeki TUNEL pozitiflik yaşa göre değerlendirildiğinde 35 yaş altı olgularda hücre ortalaması  $32,76 \pm 1,38$  olarak, 35yaş ve üstündeki yaşlarda ise  $45,08 \pm 0,8$  olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı idi ( $p < 5$ , tablo 5)

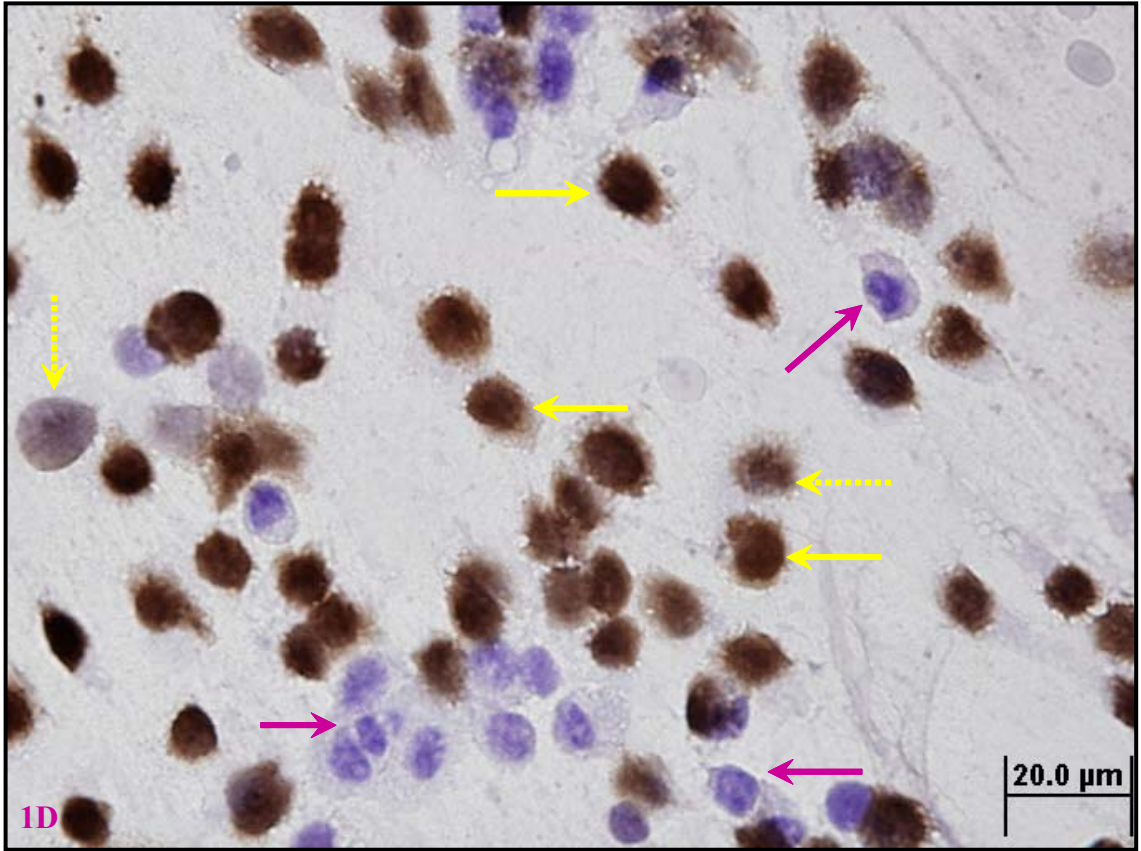
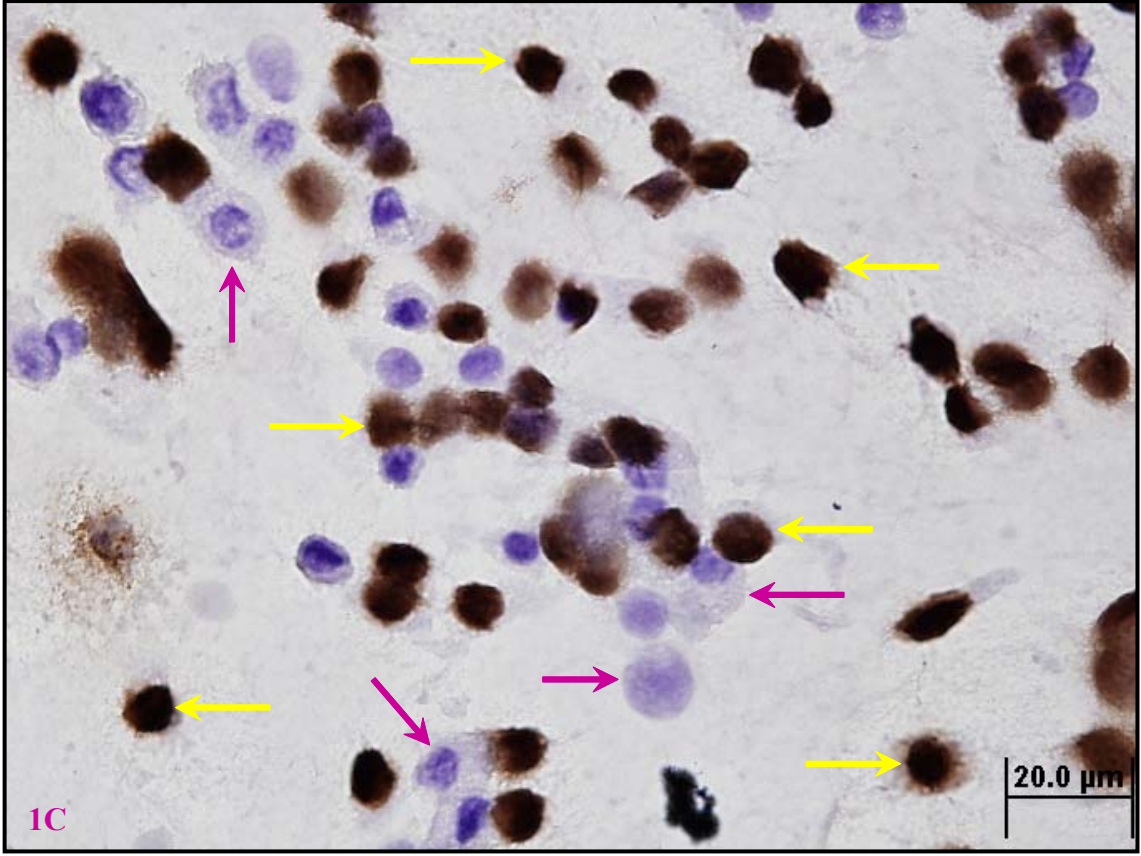
**Tablo 5 Yaşlara göre apoptozun değerlendirilmesi**

	<b>&lt; 35</b>	<b>≥ 35</b>	<b>P</b>
N	28	3	-
TUNEL (%)	$32,76 \pm 1,38$	$45,08 \pm 0,8$	<b>0,013</b>

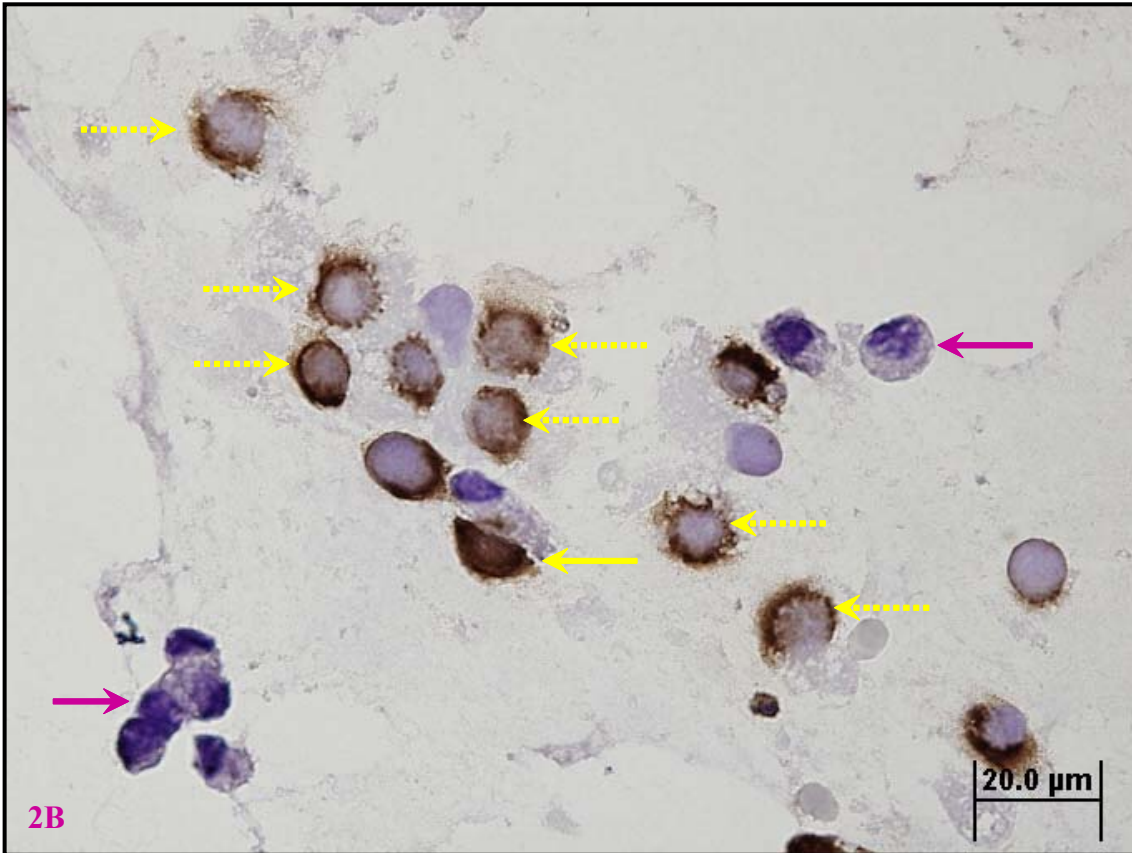
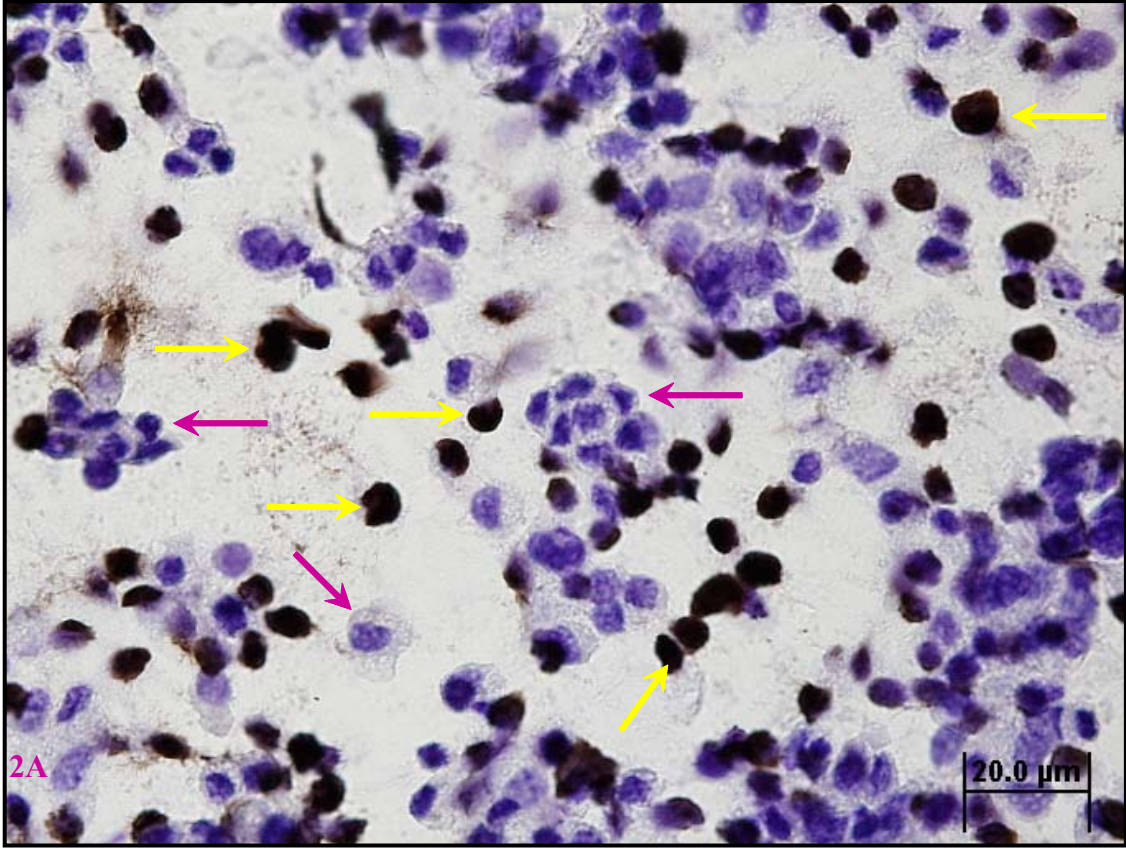




**Resim 1 PCOS Grubu TUNEL Değerlendirmesi (1A-1B)**  
( → ) Kahverengi boyanan hücreler TUNEL (+)  
( → ) Mavi-mor boyanan hücreler TUNEL (-)



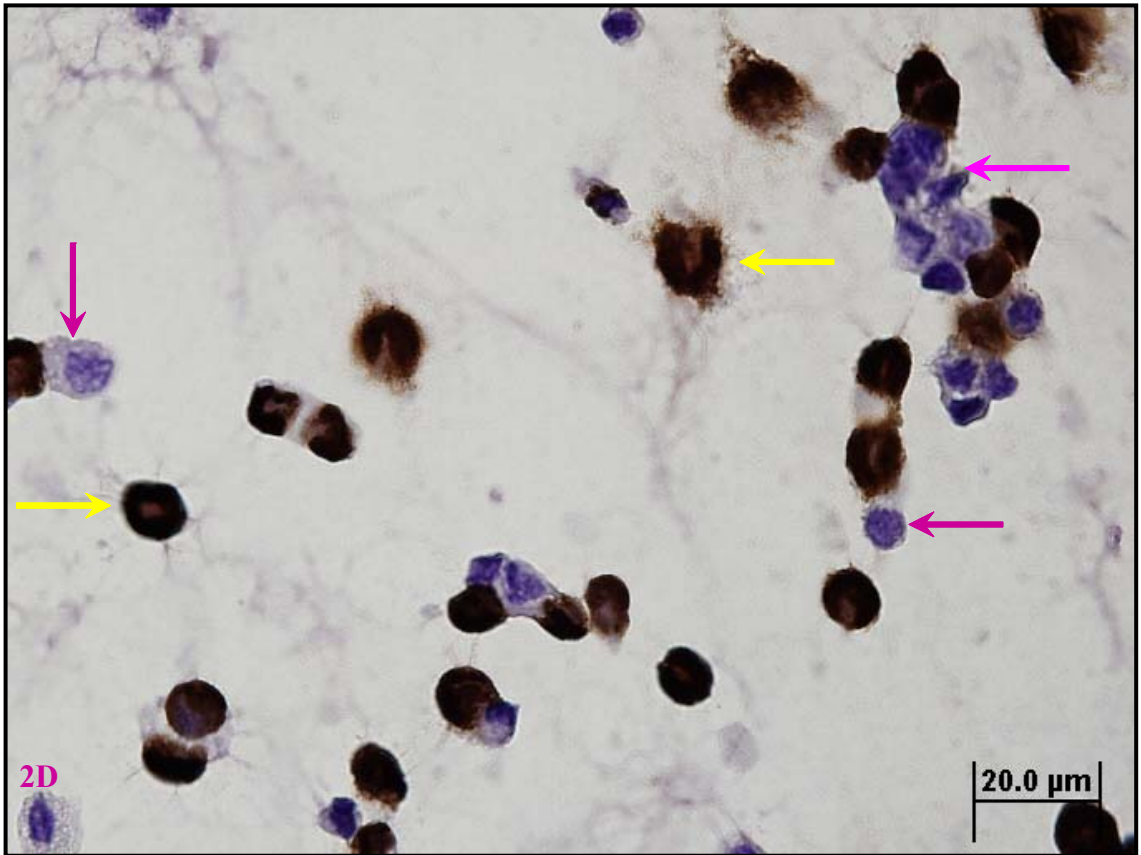
Resim 2 PCOS Grubu TUNEL Değerlendirmesi (1C-1D)  
( → ) Kahverengi boyanan hücreler TUNEL (+)  
( → ) Mavi-mor boyanan hücreler TUNEL (-)



Resim 3 Açıklanamayan İnfertil Grubu TUNEL Değerlendirmesi (2A-2B)

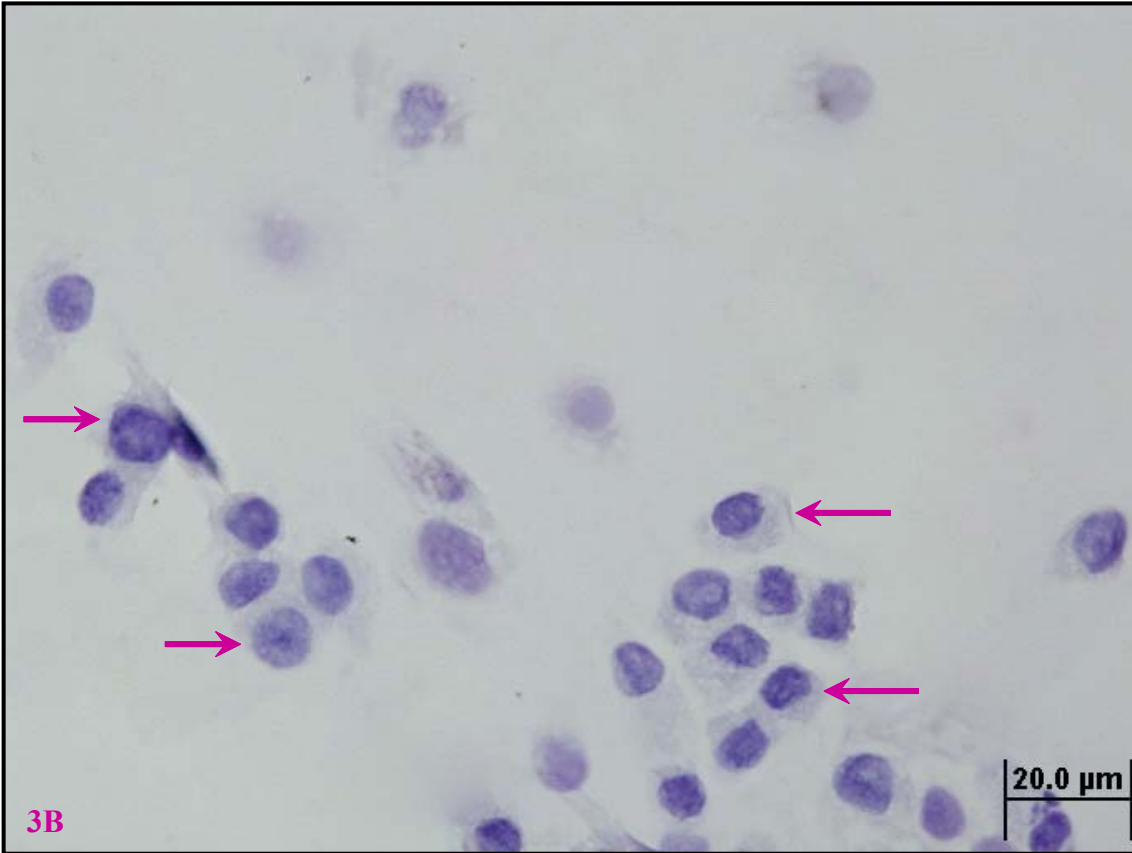
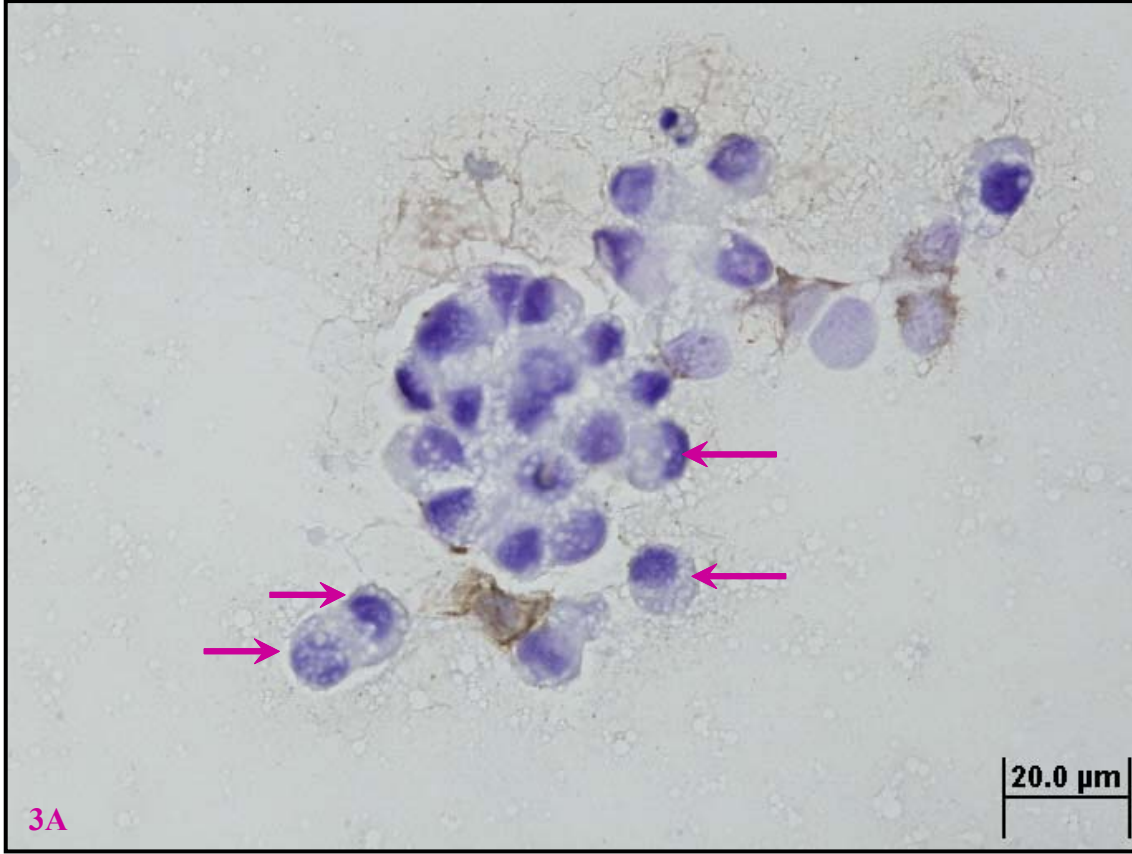
( → ) Kahverengi boyanan hücreler TUNEL (+)

( → ) Mavi-mor boyanan hücreler TUNEL (-)



Resim 4 Açıklanamayan İnfertil Grubu TUNEL Değerlendirmesi (2C-2D)

- (→) Kahverengi boyanan hücreler TUNEL (+)
- (→) Mavi-mor boyanan hücreler TUNEL (-)



**Resim 5 Erkek Faktör Grubu TUNEL Değerlendirilmesi (3A-3B)**  
( → ) Kahverengi boyanan hücreler TUNEL (+)  
( → ) Mavi-mor boyanan hücreler TUNEL (-)



Resim 6 Erkek Faktör Grubu TUNEL Değerlendirilmesi (3C-3D)

- (→) Kahverengi boyanan hücreler TUNEL (+)
- (→) Mavi-mor boyanan hücreler TUNEL (-)

#### 4.2. ROS VE ANTIOKSİDAN DEĞERLENDİRMESİ

Çalışmamızda reaktif oksijen türlerinin düzeyini belirlemede kullanılan lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA (malondialdehit) oranları tüm olgularda ortalama  $8,38 \pm 0,94 \mu\text{M}$  olarak saptandı. Folliküler sıvı MDA düzeyleri infertilite sebebi PCOS olan olgularda  $7,9 \pm 0,28 \mu\text{M}$ , açıklanamayan infertilite olgularında  $8,71 \pm 0,24 \mu\text{M}$  ve erkek faktör grubunda ise  $8,5 \pm 0,32 \mu\text{M}$  idi. Folliküler sıvı MDA düzeyleri infertilite sebebi PCOS olan olgularda, erkek faktör ve açıklanamayan infertilite olgularına göre düşük olduğu tespit edildi.

Ancak gruplar arasındaki bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunamadı (Tablo 6). Malondialdehit için yapılan varyans analizinde MDA düzeyindeki farkın PCOS grubundan kaynaklandığı ve açıklanamayan infertil grubu ve erkek faktör grubuna göre anlamlı olmasa da düşük olduğu ancak açıklanamayan infertil ve erkek faktör grupları arasında fark olmadığı tespit edildi.

Antioksidan kapasitesi GPX düzeyleriyle saptandı ve tüm çalışma grubunda ortalama  $34,48 \pm 3,71 \text{ mU/mL}$  idi. Gruplara baktığımızda, PCOS olgularında ortalama  $37,56 \pm 7,21 \text{ mU/mL}$  iken, infertilite sebebi açıklanamayan olgularda ortalama  $34,79 \pm 7,61 \text{ mU/mL}$  ve erkek faktör olan olgularda ortalama  $30,80 \pm 4,71 \text{ mU/mL}$  idi. Bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunamadı (Tablo 6).

**Tablo 6 Gruplara göre MDA ve GPx düzeylerinin karşılaştırılması**

	PCOS	AÇIKLANAMAYAN	ERKEK	TOPLAM	P
N	11	10	10	31	-
MDA ( $\mu\text{M}$ )	$7,9 \pm 0,28$	$8,71 \pm 0,24$	$8,5 \pm 0,32$	$8,38 \pm 0,94$	0,18
GPx (mU/mL)	$37,56 \pm 7,21$	$34,79 \pm 7,61$	$30,80 \pm 4,71$	$34,48 \pm 3,71$	0,72

Reaktif oksijen türleri ve antioksidan seviyeleri yaşa göre değerlendirildiğinde ise 35yaş altı olgularda GPx seviyesi ( 31,53 ± 3,7 mU/mL) istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde 35yaş ve üstü gruba (62,01 ± 4,5 mU/mL) göre düşük bulundu (p <0,005, Tablo7). MDA düzeyleri için yapılan değerlendirmede 35 yaş altı grup (8,4 ± 0,18µM) ile 35 yaş üstü grup (7,9 ± 0,45) arasında fark bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p =0,285 Tablo7)

**Tablo 7 Yaşlara göre ROS - Antioksidan düzeylerinin değerlendirilmesi**

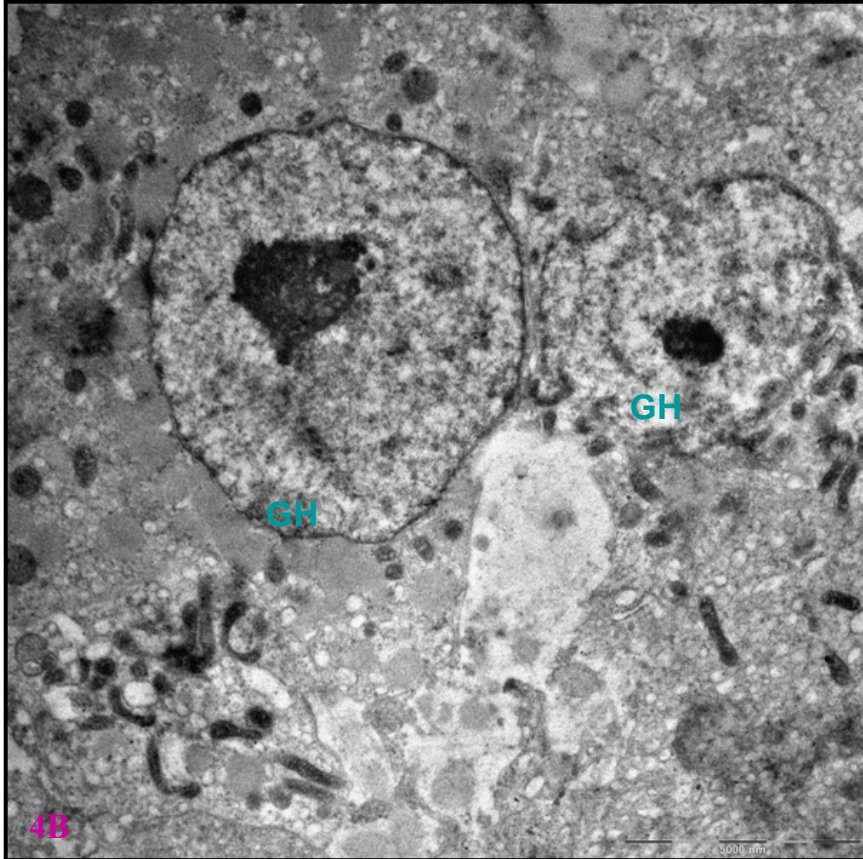
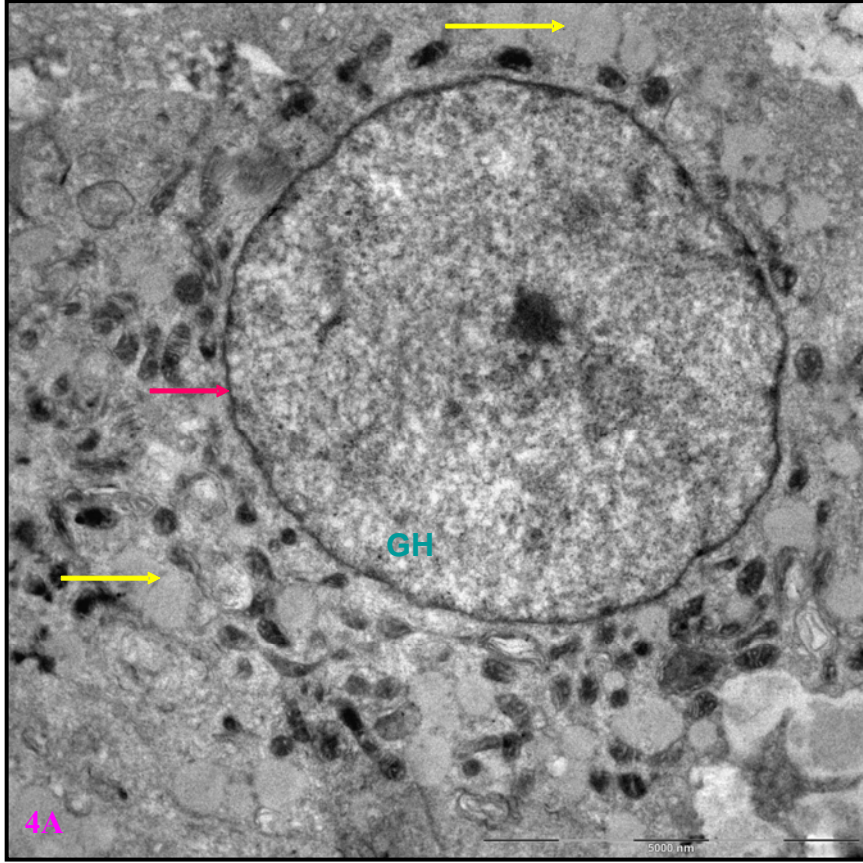
	< 35	≥ 35	P
N	28	3	-
GPx (mU/mL)	31,53 ± 3,7	62,01 ± 4,5	<b>0,027</b>
MDA (µM)	8,4 ± 0,18	7,9 ± 0,45	0,285

### 4.3. EM BULGULARI

Polikistik Over grubu granüloza hücrelerinde;

- İntersellüler alanda sitoplazmik fragmantasyonlar, apoptotik hücre, çekirdek ve hücre zarı düzensizliği gözlenmedi.
- Hücre ilişkileri düzgündü.
- Granüloza hücrelerinde lipid vakuolleri genellikle periferal dağılımlı, organeller ise normal görünümde ve genel dağılım göstermekteydi(Resim 7)

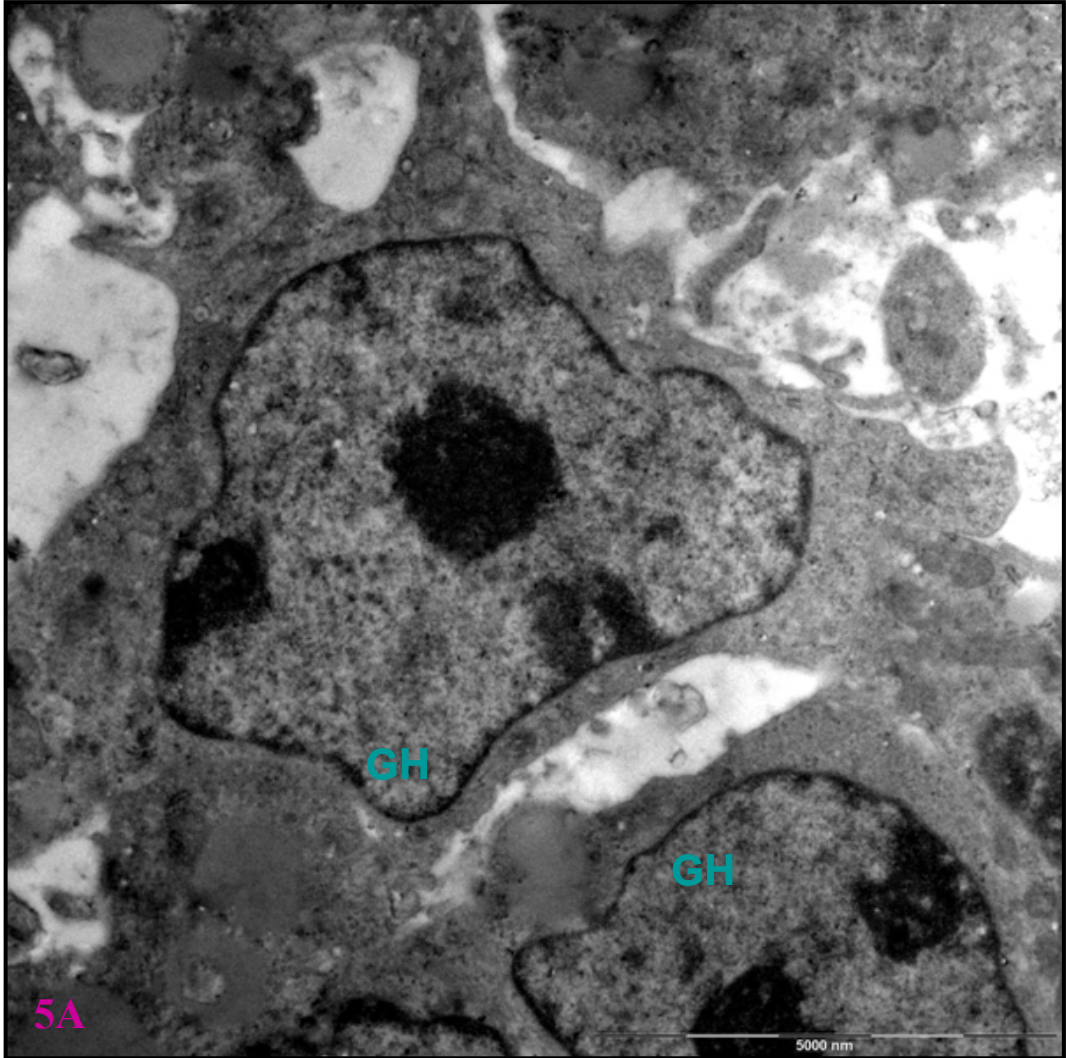




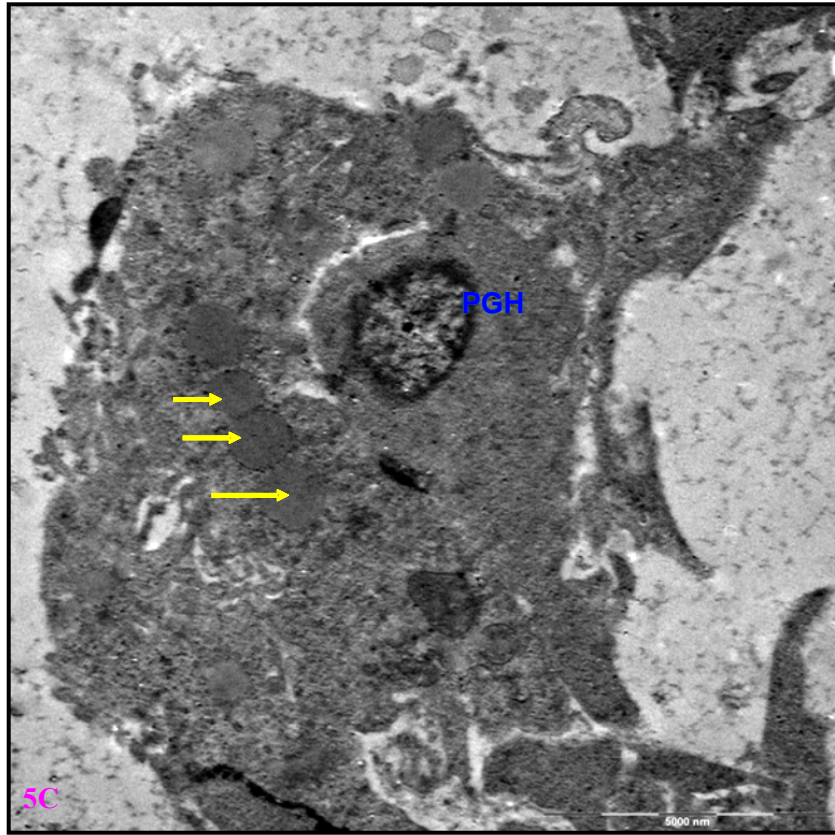
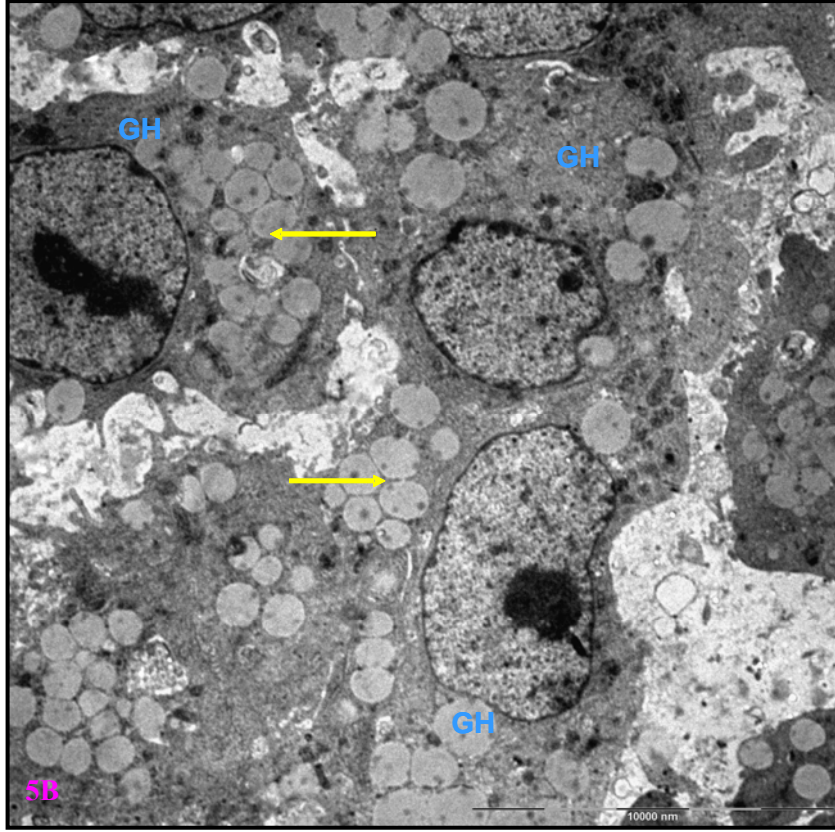
**Resim 7 PCOS Grubu TEM Değerlendirmeleri (4A-4B)**  
Sitoplazmada düzenli organizasyon gösteren organeller , periferal yerleşimli az sayıda lipid vakuolleri (oklar),düzenli nükleer membran (pembe ok)

Açıklanamayan infertilite olgusunda ise,

- Öncelikle hücre ve nükleer membran düzensizliği belirgindi(Resim 8).
- Hücreler tipik görünümünü kaybetmiş ve hücreler arası bağlantılarda dejenerasyonlar gözlenmekteydi(Resim 9-10).
- Bazı olgularda Granüloza hücrelerinde lipid vakuolleri periferal ve perinükleer yerleşimli ve çok sayıdaydı. Hatta bu olgularda lipidlerin internal nükleer membran yerleşimli olduğu dikkati çekti(Resim 9-10).
- Bazı granüloza hücrelerinde lameller cisimcikler içeren dev vakuoller (Resim9) ve İntersellüler alanda çok sayıda sitoplazmik fragmentasyonlar gözlendi (Resim10)



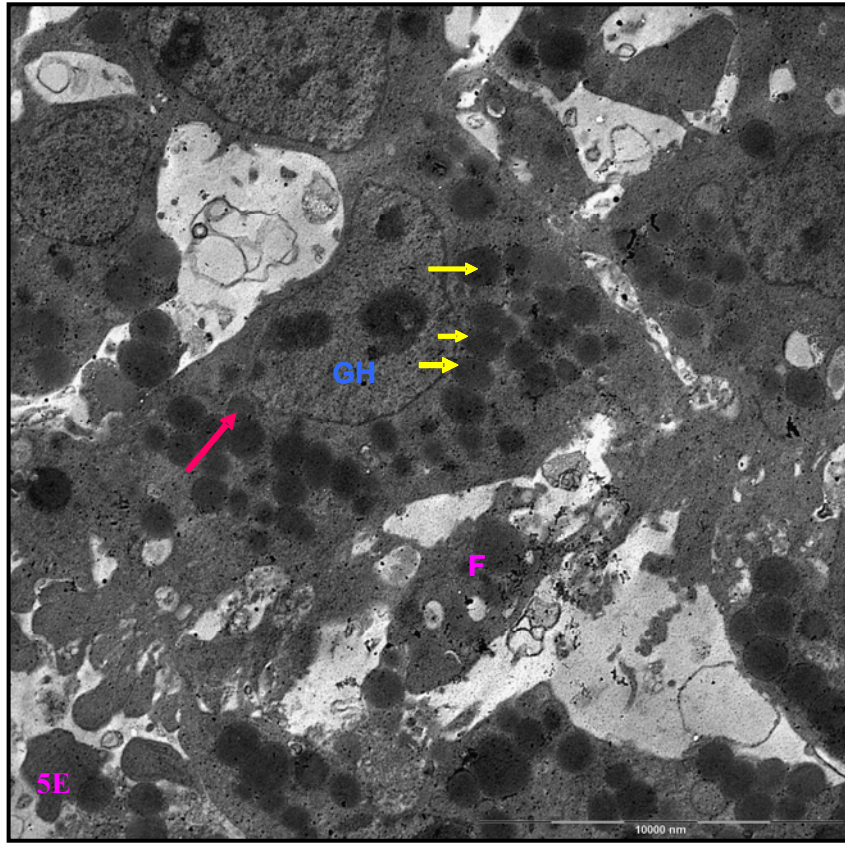
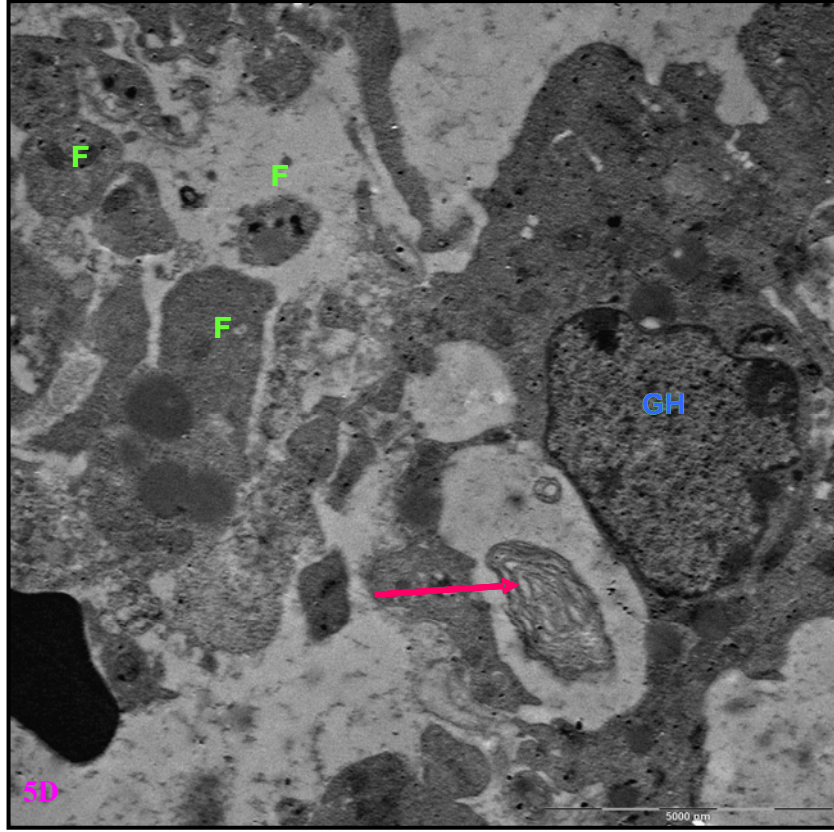
**Resim 8 Açıklanamayan İnfertil Grubu TEM Değerlendirmeleri (5A)  
Hücre ve nükleer membran düzensizliği gözlenen granüloza hücreleri (GH)**



**Resim 9 Açıklanamayan İnfertil Grubu TEM Değerlendirmeleri (5B-5C)**

**(5B) Çok sayıda periferel ve perinükleer lipid vakuolleri içeren düzensiz hücre ve nükleer membranlı granüloza hücreleri (GH)**

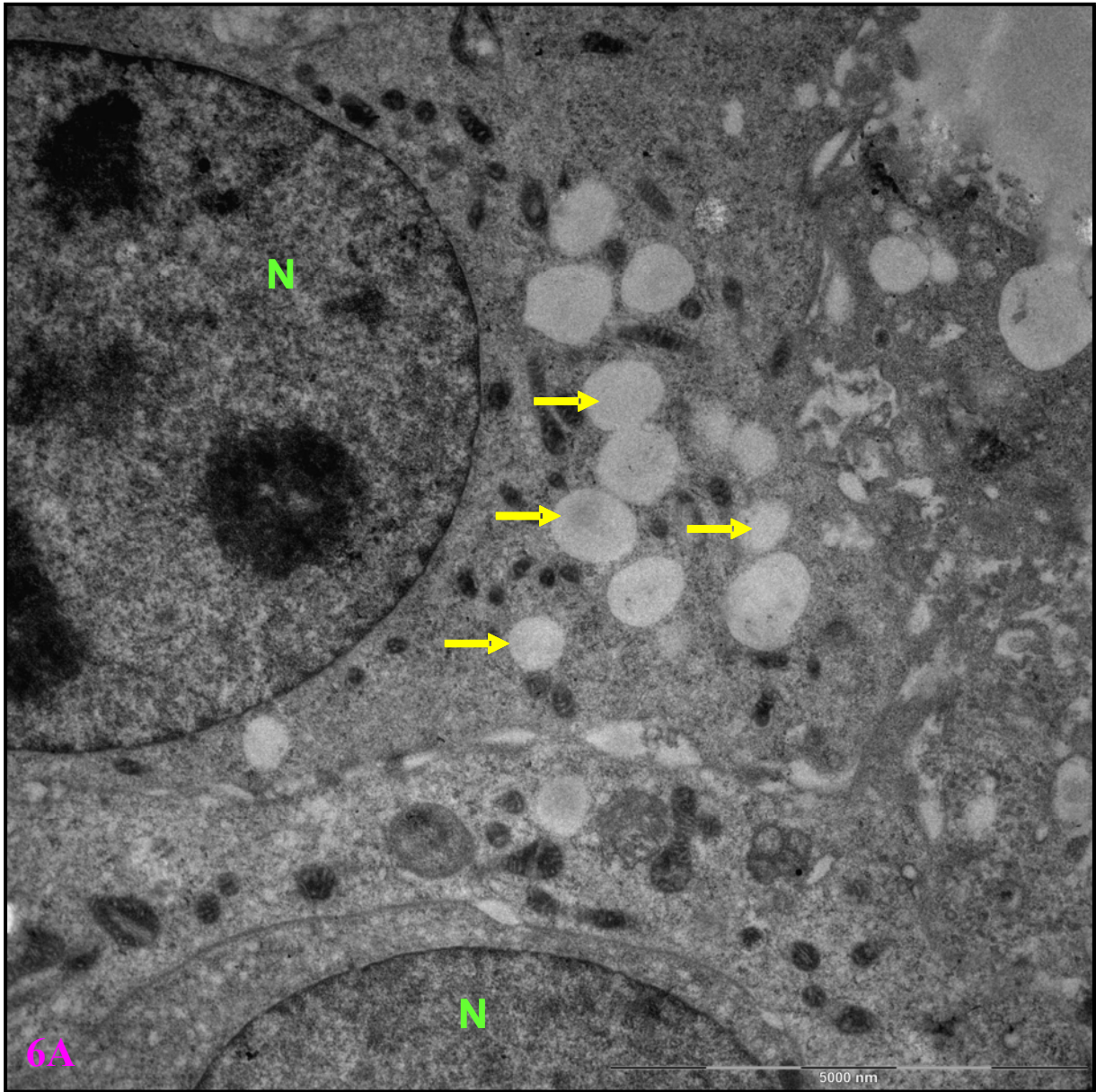
**(5C) Az sayıda perinükleer lipid vakuolleri içeren ve sitoplazmik fragmentasyonun başladığı apoptotik granüloza hücresi (PGH)**



**Resim 10 Açıklanamayan İnfertil Grubu TEM Değerlendirmeleri (5D-5E)**  
(5D)intersellüler sitoplazmik fragmantasyonlar (F),granuloza hücrelerinde lameller cisimcikler içeren dev vakuoller (pembe ok)(5E)İntrasellüler hüresel fragmantasyonlar (F),granuloza hücrelerinde hücre ve nükleer membran düzensizliği (GH), periferel ve perinükleer lipid vakuolleri (sarı ok), internal nükleer membran lipidleri (pembe ok)

Granüloza hücreleri erkek infertilitesi grubunda ise PCOS grubu benzeri özellikler göstermekte idi. Bunlar;

- İntersellüler alanda sitoplazmik fragmantasyonlar, apoptotik hücre, çekirdek ve hücre zarı düzensizliği gözlenmedi.
- Hücre ilişkileri düzgündü.
- Granüloza hücrelerinde lipid vakuolleri genellikle periferal dağılımlı, organeller ise normal görünümde ve genel dağılım göstermekteydi (Resim11)



**Resim 11 Erkek Faktör Grubu TEM Değerlendirmesi (6A)**

**(6A) Düzenli nükleer membrana sahip merkezi yerleşimli çekirdek (N), periferal yerleşimli lipid damlaları (→) ve sitoplazmada düzenli organizasyon gösteren organeller**

## 5. TARTIŞMA

İnfertilite kliniklerine çocuk sahibi olamama şikayetiyle başvuran kadınların %40'ında infertilitenin başlıca nedeni ovulasyon bozukluğudur (37). Anovulatuvar infertilitenin en sık nedeni (%80) ise, Polikistik Over Sendromu (PCOS)'dur (60). Aynı zamanda PCOS doğurganlık çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluktur.

İlk kez 1935 yılında Irving F. Stein ve Michael L. Leventhal tarafından adet görememe, vücutta tüylenme ve obeziteden oluşan bir hastalık olarak tanımlanan Polikistik Over Sendromunun toplumda görülme sıklığı %6-8 arasındadır. Düzenli adet gören kadınların %25'inde ultrasonografik incelemelerinde polikistik over (PCO) saptanmaktadır (61- 63).

PCOS olan hastalarda ultrasonografi ve bütün laboratuvar tetkikleri normal olabilmektedir ancak hastalığın tanısı daha çok klinik bulgulara dayanmaktadır. Hastaların %30'unda ciltte *akantozis nigrikans* adı verilen değişiklikler gözlenir. Özellikle obez ve kanda erkeklik hormonu (testosteron) yüksek olan hastalarda bu cilt değişikliklerine daha sık rastlanmaktadır. PCOS'lu olguların %40-70'inde infertilite problemi mevcuttur. Buradaki primer defekt anovülasyondur. Ayrıca artmış LH seviyelerinin oosit üzerine olumsuz etkilerinden dolayı, artmış spontan abortus oranı da mevcuttur (37, 64).

Granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin gelişimi FSH stimülasyonu sonrasında folliküler fazın orta ve geç safhalarında gerçekleşmektedir. Bu dönemdeki FSH ve LH folliküler gelişimi desteklemekte, granüloza hücrelerindeki aromataz aktivitesini ve inhibin üretimini arttırmaktadır. Yapılan bir çalışmada yüksek konsantrasyonlardaki LH seviyesinin hücre proliferasyonu üzerine negatif etkisi olduğu sonucu elde edilmiştir (65).

Yüksek LH düzeylerine sahip olgularda yapılan araştırmalarda artan oranda infertilite ve ilk trimesterde gebelik kayıpları gözlenmektedir. LH seviyesinin yüksekliğine bağlı olarak gelişen yüksek androjen miktarının atreziyi tetikleme, oositte mayozun erken başlaması, kumulus ooforusta granüloza hücrelerinin birbiriyle olan ilişkisinin bozulması gibi mekanizmalarla PCOS'lu kadınlarda gözlenen düşük oosit ve embriyo kalitesi ve bu duruma bağlı olarak düşen fertilizasyon oranı açıklanmaya çalışılmaktadır (66).

Biz yaptığımız bu çalışma ile kadın infertilitesinde başta PCOS olmak üzere çeşitli infertilite sebeplerinde folliküler sıvı ROS düzeylerini, granüloza hücrelerindeki DNA hasarını ve bu hücrelerin ince yapı özelliklerini ortaya koymayı ve infertiliteye olan etkisini değerlendirdik.

Yapılan bir çalışmada, PCOS'lu kadınlarda gözlenen hiperinsülinemi nedeniyle LH etkisinin arttığı bundan dolayı da normalde follikül çapının 9-10mm'ye ulaştığı dönemde granüloza hücrelerinin LH'ye cevap vermesi gözlenirken PCOS lu kadınlarda bu cevabın follikül 4mm'ye ulaştığında gözlendiği gösterilmiştir. Yani, bu hastalarda granüloza hücreleri üzerine LH'nin negatif etkisi hiperinsülinemi gözlenen durumlarda gerçekleşmektedir (67).

Normal ve PCO'lu kadınların granüloza hücre aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, PCO folliküllerinin atretik yapısından dolayı FSH aktivitesinin algılanabilir seviyede olmaması beklenirken, PCO'lu hastalarda folliküler mikroçevredeki FSH biyoaktivitesi yüksek seviyede bulunmuştur. PCO'lu hastaların granüloza hücrelerindeki bu anormal FSH yanıtının follikül seçimini bloke ettiği düşünülmektedir (68).

FSH stimülasyonu ile granüloza hücrelerinin şekillerinde meydana gelen değişiklikler yapılan farklı çalışmalarda hem in vivo hem in vitro olarak gösterilmiştir. FSH kültürlerine alınan granüloza hücrelerindeki küresel yüzeylerinin düzleştiği ve bunun da hücre iskeletindeki değişiklikleri de içine alan hücresel değişikliklerden biri olduğu tanımlanmıştır (69-72).

Apoptoz kontrollü hücre ölümü olarak tanımlanan bir süreçtir. Granüloza hücrelerindeki apoptoz ise folliküler atrezinin bir göstergesidir (1-2).

Apoptotik hücre insidansının yüksek olması tümörlerde prognozu etkileyen faktörlerdendir (73-74). Yine granüloza hücrelerindeki yüksek apoptotik insidansın IVF sikluslarında da kötü prognozu belirleyebileceğini ileri süren çalışmalar da mevcuttur (3, 5). Ancak granüloza hücre apoptozunun gonadotropin hiperstimülasyonu yapılan sikluslarda gebelik üzerine olabilecek etkisi tam olarak açıklanamamaktadır (4).

Nakahara ve ark. granüloza hücrelerindeki apoptotik cisimlerin gebe kadınlarda, gebe olmayanlara göre anlamlı olarak daha az bulunduğunu göstermişlerdir(4).

Buna karşılık Pquette ve ark. ise yaptıkları çalışmada IVF işlemlerinin güvenilirliği için granüloza hücre apoptozunun kullanılmayacağı sonucuna varmışlardır (75).

Çalışmamızda açıklanamayan infertilite tanısı konan olgularda hem PCOS'lu olgulara hemde erkek infertil olgularına göre TUNEL pozitif hücre insidansı belirgin olarak fazlaydı ve bu farklılık her üç grup için de istatistiksel olarak anlamlıydı. Buna göre gonadotropin ile ovulasyon indüksiyonu yapılan olgularda granüloza hücre apoptozunun yüksek olması IVF tedavisi başarısını belirlemede yardımcı olabilir.

Diğer bir çalışmada (Nakahara 1997) belirtildiği gibi apopitoz ile birlikte olan folliküler atrezi gonadotropin hiperstimülasyonu ile bazı folliküllerde olabilir ve bu yüzden boş folliküller oluşur.

IVF işlemi sırasında gelişen folliküllerde boş follikül sayısında artış olduğu zaman her ne kadar birden çok follikül gelişmiş olsa da az sayıda oosit elde edilmektedir ve apopitotik hücre insidansı da arttığı için oosit kaliteleri kötü olabilmektedir. Granüloza hücre apopitozunun fertilizasyonu etkilemediği söylenebilse de fertilizasyonda sperm gibi diğer faktörlerin de etkisi unutulmamalıdır (3).

PCOS sadece reproduktif endokrinolojik bir hastalık değil, aynı zamanda diyabet, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi, uzun dönemde riskler oluşturabilecek durumlarla da ilişkili, metabolik bir bozukluktur (85).

Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apopitoz, farklı intraselüler ve ekstraselüler mekanizmalarca tetiklenen bir süreçtir. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türevleri, ROS, ise hücreleri apopitoza yönelten reaksiyon zincirini tetikleyen etmenlerdir.

Serbest radikal terimi ilk olarak Warren ve arkadaşları tarafından 1987 de bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektronu bulunan atom yada molekül olarak tanımlanmıştır. ROS Aitken'e göre (1994) yüksek derecede reaktif oksijenlenmiş ajanlara sahip serbest radikaller sınıfıdır (94). Jinekolojik rahatsızlıklarda ve YÜT sikluslarında ROS'un etkisi son yıllarda yaygın olarak araştırılmaktadır (77, 81). Folliküler sıvıdaki düşük ROS konsantrasyonunun başarılı IVF sikluslarında önemli olduğu yapılan birçok çalışmada ortaya konmaktadır (82, 86).

2007 yılında Jançar ve arkadaşları granüloza hücrelerindeki apopitozun granüloza hücrelerinde intrensek olarak üretilen ROS tarafından tetiklenip tetiklenmediğini araştırmışlar ve granüloza hücrelerinde üretilen ROS miktarı ile apopitotik granüloza hücreleri arasında pozitif bir ilişki bulmuşlardır (87).

Granüloza hücrelerindeki oksidatif stres, IVF sikluslarında düşük fertilizasyon oranlarına ve kötü embriyo gelişimine sebep olmaktadır. Granüloza hücrelerinde fazla miktardaki ROS üretiminin oosit embriyo kalitesi ve implantasyon oranlarına ters etki ettiği gösterilmektedir. Granüloza hücrelerindeki yüksek ROS üretimi folliküler sıvıda oksidatif stresle sonuçlanmakta; follikülde aşırı miktardaki oksidatif stres ise IVF sonuçlarını negatif etkilemektedir (88).



Oksidatif stres oksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması şeklinde tanımlanır. PCOS'ta yapımı artan ROS'un doku hasarına neden olduğu bilinmektedir (83).

Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresin, doku hasarına yol açma mekanizmalarından biridir ve doymamış yağ asitlerinin serbest radikallere ve oksijene bağımlı hasarı olarak bilinir (89).

Oksidatif stresin, doku hasarına yol açma mekanizmalarından biri de lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunu yansıtan malondialdehid (MDA), hücrenin yapı ve fonksiyonlarını bozabilir. MDA, biyokimyasal olarak tayinin kolay ve doğru olarak yapılabilmesinden dolayı, vücutta lipid peroksidasyon düzeyinin tespitine yönelik çalışmalarda en çok tercih edilen parametre olmuştur (83, 84).

PCOS'ta görülen hiperandrojeneminin, oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkileri netlik kazanmamıştır (89, 90). Literatürde, MDA konsantrasyonunun, erkeklerde, kadınlardan daha yüksek olduğu bildirilmektedir (92). Bununla birlikte, PCOS hastalarında, lipid peroksidasyonunun serum androjen seviyeleri ile ilişkisini değerlendiren çalışmalar, birbiriyle uyumlu olmayan sonuçlar vermektedir (89-90).

Yıldırım ve ark yaptıkları çalışmada IVF-ET uygulanan PCOS'lu hastaların preovulatar follikül sıvılarında lipid peroksidasyonunu araştırmışlar ve PCOS'lu hastalarda preovulatar follikül sıvılarında MDA düzeyinin erkek faktör nedeniyle IVF-ET uygulanan kontrol grubu hastalarinkine göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Çalışmada plazma LH/FSH ve progesteron düzeylerinin folliküler sıvı MDA seviyesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak PCOS'lu hastaların overlerindeki lipid peroksidasyonun muhtemelen yetersiz progesteron sentezi ve yüksek plazma LH/FSH seviyeleri ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir(93). Başka bir çalışmada Sabuncu ve ark PCOS'lu hastaların eritrositlerinde oksidatif stres belirteçlerini araştırmışlar ve MDA seviyesinin PCOS'lu hastalarda anlamlı olarak yüksek, önemli antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin anlamlı olarak yüksek, glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin anlamlı olarak düşük olduğunu bulmuşlardır. Bu hastalarda aynı zamanda MDA seviyesi ile insülin sensitivitesi arasında da anlamlı bir negatif korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir (89).

Paszkowski ve ark açıklanamayan infertil kadınların follikül sıvılarında selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (SeGPx) enzim seviyelerinin azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada SeGPx seviyesinin yüksek olduğu folliküllerden elde edilen oositlerin fertilizasyon hızlarının, enzim seviyesi düşük olanlardan elde edilenlere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir(72-76).

Agarwal ve ark. oksidatif stresin oosit ve embriyo kalitesini ve de fertilizasyon hızlarını etkilediğini öne sürmüşlerdir (77, 95, 96). Bir diğer çalışmada Oyawoye ve ark.

IVF uygulanan kadınların follikül sıvılarındaki yüksek total antioksidan kapasitenin fertilizasyon potansiyelini artırdığını göstermişlerdir (7).

İnsan oositin çevresini oluşturan folliküler sıvının oksidan–antioksidan dengesi ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Endo ve ark. hidrojen peroksidin kültüre edilmiş insan granüloza hücrelerinde progesteron sentezinin plüripotent inhibitörü olduğunu göstermişlerdir (79). Shimamura ve ark ise sıçanlarda prostoglandin F-2-alfa'nın luteolitik aktivitesinin hidrojen peroksit ve lipit peroksitlerin üretimi ile ilişkili olduğu rapor etmiştir (80).

Oksidatif stres artışının kadın üreme fonksiyonları üzerine olumsuz etkilerinin gösterildiği çalışmaların yanı sıra aksini savunan çalışmalar da vardır. Bir çalışmada Jozwik ve ark. folliküler sıvıdaki oksidatif stres belirteçlerinin oositin reproduktif kapasitesini yansıtmadığını savunmaktadırlar (81). Attaran ve ark. IVF konsepsiyon sikluslarında konsepsiyon olmayan sikluslarına oranla folliküler sıvı ROS seviyelerini yüksek bulmuşlar ve bunu da ROS'ların yararlı etkilerinin olabileceği sonucuna bağlamışlardır (82).

Biz de çalışmamızda folliküler sıvı GPx seviyelerini PCOS lu hastalarda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek bulduk. Buna karşı folliküler sıvı MDA seviyeleri ise yine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da PCOS grubunda diğer gruplara göre düşük bulduk.

Son zamanlarda yapılan in vitro kültür, in vitro fertilizasyon ve in vitro maturasyon çalışmaları ile embriyoyu meydana getirecek olan en iyi oositin seçilmesinde oositin kalitesi kadar ona desteklik sağlayan granüloza hücrelerinin de sağlıklı olmaları önem kazanmıştır. Literatür incelemesi yapıldığında IVF sikluslarında kültüre edilmemiş insan granüloza hücrelerinin ince yapısına dair yapılan çalışmalar yok denecek kadar azdır. Hiç kuşkusuz granüloza hücrelerinin ileri değerlendirimi, morfolojik analizi ve ultrastrüktürel yapısının incelenmesi de bu konuda katkı sağlayacaktır.

Spanel ve ark. granüloza hücrelerinin in vitro maturasyonu siklus sırasında endokrin hücrelerinde diferansiyasyon çalışmaları için model oluşturmaktadır. Hem granüloza hücrelerinin ultrastrüktürel ve biyokimyasal heterojenitesi hem de folliküllerdeki diferansiyasyon derecesinin varlığı aynı follikül içinde gösterilmiştir.(97)

Yapılan bir başka çalışmada granüloza hücrelerinde ultrastrüktür-fonksiyon ilişkisinin birbirinden ayrı düşünülemediği üzerinde durulmaktadır(98).

Çalışmamızda özellikle açıklanamayan infertilite olgularında granüloza hücrelerinde gözlemlendiğimiz morfolojik dejenerasyonlar dikkat çekiciydi. İntersellüler alanda çok sayıda sitoplazmik fragmentasyonlar gözlenmesi ile hücre ve nükleer membran düzensizliği belirgindi. Hücreler tipik görünümünü kaybetmiş ve hücreler arası bağlantılarda dejenerasyonlar gözlenmekteydi. Bazı olgularda granüloza hücrelerinde lipid vakuolleri periferik ve perinükleer yerleşimli ve çok sayıda idi. Hatta bu olgularda lipidlerin internal nükleer membran yerleşimli olduğu dikkati çekti.

Bazı granüloza hücrelerinde lameller cisimcikler içeren dev vakuoller ve intersellüler alanda çok sayıda sitoplazmik fragmentasyonlar gözlemlendi.

PCOS'lu ve erkek faktör infertilite olgularında granüloza hücrelerinde organeller normal görünümde ve genel dağılım göstermekte, intersellüler alanda sitoplazmik fragmentasyonlar, apoptotik hücre, çekirdek ve hücre zarı düzensizliği gözlenmemektedir. Granüloza hücrelerinde lipid vakuolleri genellikle periferik dağılım göstermekteydi.

Özet olarak; çalışmamızda TUNEL tekniği, oositi destekleyen granüloza hücrelerindeki DNA kırıklarının belirlenmesi ve böylece hücrelerin apoptotik yola girdiğinin gösterilmesi için kullanılmıştır. Buna ek olarak ultrastrüktürel olarak süreçteki dejenerasyon değerlendirilmiş ayrıca bu duruma follikül sıvısındaki oksidatif stresin etkisi de araştırılmıştır. Böylece çalışmamızda PCOS'lu olgularla açıklanamayan infertilite olgularının karşılaştırılması, bu 3 farklı teknik kullanılarak ilk kez değerlendirilmiştir.

## 6. SONUC

İnfertilite sebebi açıklanamayan grupta, granüloza hücre TUNEL pozitif yüzdesi PCOS infertiliteli olguların bulunduğu gruptan daha yüksektir ( $p<0,005$ ). Bu şekilde, açıklanamayan infertilite etyolojisinde apoptozun rolü olabileceği söylenebilir.

IVF’te elde edilen oosit sayısı ile matür oosit sayısı birbiriyle korelasyon göstermektedir.

Granüloza hücre apoptozunun artması oosit sayısı ve kalitesini olumsuz yönde etkilediği düşünülebilir.

Foliküler sıvı antioksidan seviyelerindeki farkın özellikle polikistik over sendromuna özgü patofizyolojisinden kaynaklanan nedenlerle olduğu düşünülebilir.

Bunlara ek olarak elektron mikroskopunda granüloza hücrelerinin ince yapısı incelemelerinde elde edilen bulgular hem immunohistokimyasal hem de biyokimyasal sonuçları destekler şekildedir. Çalışmamızın literatürdeki çok az sayıda var olan insan granüloza hücreleri ince yapı değerlendirmelerine katkıda bulunup daha sonraki çalışmalar için kaynak olacağını düşünmekteyiz.

IVF sikluslarında oosit kalitesi ne tek başına oksidatif stresle ne de tek başına granüloza hücrelerindeki apoptoz oranıyla korelasyon göstermektedir. Daha büyük ve gonadotropin ile indüklenmemiş olguların da olduğu bir hasta popülasyonunda karşılaştırmaların yapılması gerekmektedir.

IVF kliniklerinde sonuç parametrelerini tahmin etmek için birer belirteç olarak kullanılabilir. Bu kriterlerin ilişkisini değerlendirmek için homojen ve geniş hasta gruplarında güvenilirliği kanıtlanmış aynı zamanda standart yöntemlerle yapılacak başka çalışmalara ihtiyaç vardır

## 7. **KAYNAKLAR**

1. Spencer SJ, Cataldo NA, Jaffe RB. Apoptosis in human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Survey* 1996; 5: 314-23
2. Yuan W, Giudice LC. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3148-3155
3. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M ve ark. Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1997; 67: 302-8
4. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M ve ark. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs *Fertil Steril* 1997; 68: 312-7
5. Oosterhuis GJE, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J ve ark. Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1998; 4: 747-749
6. Molskness TA, Greenberg LH, Stouffer RL. Are human luteinizing granulosa cells a site of action for progesterone and relaxin?. *Fertil Steril* 1990; 53: 446-53
7. Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N ve ark; Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 2003;18;2270–2274.
8. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S ve ark; Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;82,1171–1176.
9. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction:from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:1375-403.
10. Dişi Üreme Sistemi Atlası, 2007 Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. Prof. Dr. Erdoğan Gürsoy – Yrd. Doç. Dr. Kemal Ergin ISBN: 978-975-420-554-1
11. Clement PB. Histology of the Ovary. *Histology for Pathologists*. Ed Stephen S. Stenberg. 2th ed., p929-59 Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997
12. Clement PB, *Anatomi and Histology of the ovary*,chapter 15, Blaustein’s *Pathology of the Female Genital Tract*. Ed Kurman RJ. 5th ed., p649-673 Springer,New York, 2002

13. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*, 7th edn. Baltimore:Williams & Wilkins, 1995:
14. Ross M.H., Pawlina W., *Histology A Text and Atlas, Fourth Edition*, Lippincott Williams & Wilkins Company, Baltimore , 2003
15. Erickson, Gregory F. Normal ovarian function. *Clin Obstet Gynecol* 21:31, 1978
16. Bükülmez O, Arici A. Over fizyolojisi. Kısınışçi HA. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ankara: Günes Kitabevi. 1129-1145, 1996.
17. Abraham L, Kierszenbaum *Histology and Cell Biology*, 2<sup>th</sup> edition, Mosby, 2002; 529-550
18. Revel A, Laufer N. Protecting female fertility from cancer therapy. *Mol. And Cell. Endocr.* 187:83-91, 2002
19. Suomalainen L. Regulation of male germ cell apoptosis by sphingosine-1- phosphate. Program for developmental and reproductive biology Biomedicum. Helsinki. November, 2004
20. Tilly JL. The molecular basis of ovarian cell death during germ cell attrition, follicular atresia and luteolysis. *Front Biosci.* 1: d1-d11, 1996
21. Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev. Reprod.* 1:162-172, 1996
22. Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol.* 1999 Sep 1; 213(1):1-17
23. Markstrom E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. *Reprod.* 123:23-30, 2002
24. Johnson AL. . Caspase mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reprod.* 124:19 27, 2002
25. *Molecular biology in reproductive medicine*: Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF, Van A; Parthenon Publishing Group Inc. New York – 1999
26. Kerr J.F.R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.* 2002; 181-182: 471-74.
27. Majno G. & Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology.* 1995; 146: 3-15
28. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
29. Hengartner M.O. The Biochemistry Of Apoptosis. *Nature .* 2000; 407.

30. Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005;21: 35-56
31. Fengzhi Li; Apoptosis. *Oncology for Scientists*. Hilleboe Auditorium: 2006  
<http://hosted2.roswellpark.org/o4s/slideshows/fall2006/Apoptosis%20oncology%20class%20talk%20V2.pdf>
32. Igney, F.H., and Krammer, P.H. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. In: *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 277-288.
33. 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. Ankara: Güneş, 1996.s 1287.
34. 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; 56:836-41.
35. Sushanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril* 1994; 62:347-52.
36. Tomlinson MJ, Amisah-Arythur JB, Thompson KA, Kasraire JL, Bentick B. Prognostic indicators for intruterine insemination (iui) statistical model for IUI success. *Hum Reprod* 1996; 11:1892-6.
37. Speroff L, Glass RH, Kase NG; *Clinical Gyneacologic Endocrinology and Infertility*. Williams &Wilkins, Baltimore. First Edition, 1973; 256-257
38. Imani B, Eijkemans MJC, Velde ER, et ali. Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrheic infertility. *Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2361-2365.
39. *Novak's Gynecology*; Berek J, Adashi EY, Hillard P. Chapter: 25, 1996; 837
40. Hugheston PE. Morphology and morphogenesis of Stein-Leventhal ovary. *Obstet Gynec Survey* 1982; 37: 59-62
41. Rebor RW. Gonadotropin secretion in PCOS. *Seminars Reprod Endoc* 1984;2:223
42. Waldstreicher J, Santoro NF, Hail JE, Filicori M. Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with PCOS; indirect evidence of partialgonadotropin desensitization. *J Clin Endoc Metab* 1988; 66: 165-169

43. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Stenkampf MP, Efficacy of treatment of unexplained infertility, *Fertil Steril* 70:207,1998
44. Halliwell B., Gutteridge JM. Free Radicals in Biologo and Medicine. Third edition. Oxford University Pres, New York 1999; 27-34, 73-122.
45. Mc Cord JM. Human disease, free radicals and the oxidant/ antioxidant balance. Clin Biochem 1993; 26 (5) : 351-357
46. Davies K.J.A.: Oxidative stres: the paradox of aerobic life. Biochem. Soc. Symp. 1995; 61:1-31.
47. Halliwell B., Gutteridge JMC, Free radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Pres 1989; pp.177-178.
48. Halliwell B.. Reactive Oxigen Species in Living System: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. The Am. J. Med. 1991; 91: 145-215
49. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Konya:Mimoza Yayınları;1995:3-95.
50. Uysal M. Serbest radikaller; lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998; 11: 336-341.
51. Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest radikaller. Türkderm, 1996; 30: 116-22
52. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, et al. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. Br Med Bulletin 1993; 49(3): 506-522.
53. Islekel H, Islekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerabral ischemia and reperfusion. J Neurol Sci 2000; 7:2:1984-2000.
54. Kose, K. and Dogan, P. Lipid Peroksidasyonu. Erciyes Tıp Dergisi. 1992; 340-350
55. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. Free Radic Res 1996; 25 : 57-74
56. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B ve Atik U: Serbest Radikaller. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2000;1:52-58.
57. Salim AS. The permissive role of oxygen-derived free radicals in the development of colonic cancer in the rat: a new theory for carcinogenesis. International Journal of Cancer 1993;53:1031-1035.
58. Erden M: Serbest Radikaller. T Klin Tıp Bilimleri 12:201- 207,1992
59. Blake DR, Allen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems – a review orientated to inflammatory process. British Medical Bullet 1987; 43(2): 371 – 385



60. Hamilton-Fairley D, Kiddy. D, Watson H, Sagle M, Franks S. Low dose gonadotropin therapy for induction of ovulation in 100 women with PCOS. *Hum Reprod* 1991;6: 1095-1099
61. Acien P, Ouereda F, Matallin P. ve ark.. Insulin, androgens, and obesity in women with and without polycystic ovary syndrome: a heterogeneous group of disorders. *Fertil Steril* 1999; 72: 32-40.
62. Taylor Ann E. Polycystic Ovary Syndrome *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27: 877-903
63. Chang RJ, Katz SE. Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28: 397-407
64. Kousta E, White DM, Cela E, et ali. The prevalence of polycystic ovaries in women with infertility. *Hum Reprod* 1999;14: 2720-2723.
65. Yong EL, Baird DT, Yates R, Reichert LE Jr ve ark. Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 10: 1678-83
66. Stanger JD, Yovich JL. Reduced in vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92: 385-93
67. Willis DS, Watson H, Mason HD, et al. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol. Metab* 1998; 83: 3984-91
68. Erickson GF, Magoffin DA, Garzo VG, Cheung AP ve ark. Granulosa cells of polycystic ovaries: are they normal or abnormal? *Hum Repro* 1992; 7:293-299
69. Ben Ze'ev A, Amsterdam A. Down regulation in expression of cytoskeletal proteins involved in cells on ECM coated surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2894
70. Ben Ze'ev A, Amsterdam A. In vitro regulation of granulosa cell differentiation: Involvement of cytoskeletal protein expression. *J Biol Chem* 1987; 262: 5366
71. Balboni GC. Histology of ovary, In: James VHT, Serio M, Guisti G eds. *Endocrine Function of the human ovary*. Academic Press London p:1
72. Paszkowski, T., Traub, A.I., Robinson, S.Y., McMaster, D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin. Chim. Acta*, 1995;236;173-180.

73. Leocini L., Del Vecchio M.T. Correlation between apoptotic and proliferative indices in malignant non Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol.* 1993;142:755-763
74. Wheeler T.M., Rogers E. Apoptotic index as a biomarker in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic cancer. *J Cell Biol* 1994;19:202-207
75. Piquette G.N., Tilly J.L. Detection of apoptosis in human rat ovarian follicles *J Soc Gynecol Invest* 1994;1:297-301
76. Paszkowski, T. and Clarke, R.N. Antioxidant capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Hum. Reprod.*, 1996;11;2493-2495.
77. Agarwal A, Gupta S and Sharma RK; Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online* 2005;11;641–650.
78. Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos *Hum. Reprod.*, 1998;13;998-1002.
79. Endo, T., Aten, R.F., Leykin, L. ve ark. Hydrogen peroxide evokes antisteroidogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993;76;337–342.
80. Shimamura, K., Sugino, N., Yoshida, Y. ve ark; Changes in lipid peroxide and antioxidant enzyme activities in corpora lutea during pseudopregnancy in rats. *J. Reprod. Fertil.* 1995;105;253–257
81. Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M and Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod* 1999;5;409–413.
82. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM ve ark; The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 2000;45;314–320.
83. Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive Oxygen Species-Induced Oxidative Stress in the Development of Insulin Resistance and Hyperandrogenism in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 336–340.
84. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998; 39:1529-1542.
85. Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, et al. Early impairment of endothelial structure and function in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4588-4593

86. 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;77:1184–90
87. Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, Klun IV ve ark. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 91–97
88. 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;82:1171–6
89. Sabuncu T, Vural H, Harma M, Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease *Clin Biochem* 2001; 34: 407-413
90. Yilmaz M, Biri A, Karakoc A, et al. The effects of rosiglitazone and metformin on insulin resistance and serum androgen levels in obese and lean patients with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2005;28: 1003-1008.
91. Dursun P, Demirtas E, Bayrak A, Yarali H. Decreased serum paraoxonase 1 (PON1) activity: an additional risk factor for atherosclerotic heart disease in patients with PCOS? *Hum Reprod* 2006;21:104-108.
92. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of lifestyle factors. *Clin Chem* 1997; 43: 1209–1214.
93. Yildirim B, Demir S, Temur I, Erdemir R ve ark. Lipid peroxidation in follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome during assisted reproduction cycles. *J Reprod Med.* 2007;52:722-6
94. Aitken R.J.,Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 2001;122:497–506.
95. Agarwal A, Said TM.. Role of sperm chromatin abnormalities and dna damage in male infertility. *Hum Reprod Upd.* 2003;9:331-34.

96. Agarwal A:Significance of oxidative stres and sperm chromatin damage in male infertility: Chapter13:157-77.  
<http://www.Clevelandclinic.Org/Reproductiveresearchcenter/Docs/Agrach014.Pdf>
97. Spanel K, Sterzik BK. Ultrastructure of human preovulatory granulosa cells in follicular fluid aspirates gynecology. 1987,240:137-146
98. Stein LS, Stoica G, Tillery R. Rat ovarian granulosa cell culture a model fort he study of cell-cell communication during miltistep transformation. Cancer Res 1991,01:15.51(2) 696-706