

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**İN VİTRO FERTİLİZASYON (IVF) HASTALARININ FOLİKÜL
SIVILARINDA ADENOSİN DEAMİNAZ, 5'NÜKLEOTİDAZ VE
GUANAZ ENZİM AKTİVİTELERİ İLE OKSİDASYONA DUYARLIK
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kim. Müh. Z. Esra DURAK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

ANKARA
Temmuz 2010

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Grafikler	IV
Tablolar	V
Semboller, Kısaltmalar	VI

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1. Adenozin deaminaz (ADA) hakkında genel bilgiler	1
2.1.1 Adenozin Deaminaz Adenozin Deaminaz enzimin adlandırılması	1
2.1.2 ADA'nın Yapısı	2
2.1.3 Adenozin Deaminazın görev aldığı reaksiyonlar	3
2.1.4 Adenozin deaminaz İzoenzimleri	4
2.1.5 Adenozin Deaminazın lokalizasyonu	5
2.2 Adenozin Deaminazın substratları hakkında bilgi (Adenozin ve 2'-deoksiadenozin)	5
2.2.1 dATP Birikmesinin Metabolik Sonucu	7
2.3 Pürin Nükleotidlerin Metabolizması	7
2.3.1 Sentezi	8
2.3.2 IMP'nin AMP ve GMP' ye çevrimi	10
2.3.3 Kurtarma yolları (Salvage Pathways)	11
2.3.4 Pürin nükleotidlerin yıkımı (katabolizma)	13
2.4 Guanaz (guaninaminohidrolaz EC 3.5.4.3)	15
2.5 5' Nükleotidaz (5'-ribonükleotidfosfohidrolaz EC 3.1.3.5)	15
2.6 Folikül Sıvısı	16
2.7 İnfertilite (Kısırlık)	17
2.7.1 Kadın ve Erkek İnfertilitesi	18
2.7.1.1. Kadın İnfertilitesi	19
a- Tubal Faktör infertilitesi	19
b- Endometriozis	19

2.7.1.2. Erkek İnfertilitesi	20
2.8 Yardımlı Üreme Yolları	21
2.8.1 Fertilizasyon	22
2.8.2 İmplantasyon	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1 Deney Grupları	27
3.2 Etik Kurul Onayı	27
3.3 Kullanılan Aletler	28
3.4 Kullanılan Kimyasallar	28
3.5 Kullanılan Metotlar	28
3.5.1 Adenozin Deaminaz [Adenozin amino hidrolaz EC 3.5.4.4] Aktivitesinin Tayini	29
3.5.2 Guanaz - Gua (Guanin Aminohidrolaz; Guanin Deaminaz-GD)	31
3.5.3 5'-Nükleotidaz { 5'-Ribonükleotid fosfohidrolaz, EC 3.1.3.5} tayin metodu	33
3.5.4 Oksidasyona Duyarlılık (OD)	35
3.6. İstatistik	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA	43
6. ÖZET	49
7. SUMMARY	50
8. KAYNAKLAR	51
9. ÖZGEÇMİŞ	61
10.TEŞEKKÜR	62

Şekiller, Grafikler

Şekil 1. ADA'nın katalizlediği tepkimeler	4
Şekil 2. Riboz-fosfat ve ATP'den de novo pürin biyosentezi yolu	9
Şekil 3 . IMP'nin AMP ve GMP'ye çevrilmesi	10
Şekil 4 .Nükleozid monofosfatların nükleozid difosfatlar ve nükleozid trifosfatlara çevrilmesi	11
Şekil 5. Adenin adenin fosforiboziltransferaz katalizlenen fosforibozilasyonu	12
Şekil 6.Hipokasantin ve guaninin sırasıyla IMP ve GMP vermek üzere fosforibozilasyonu	12
Şekil 7. Pürin yıkım yoluyla ürik asit'in oluşması	14
Şekil 8. Fertilizasyon için sperm ve yumurta reaksiyonları	24
Şekil 9. Embriyo gelişiminin birinci haftası boyunca gerçekleşen olayların şematik görünümü	26
Grafik 1. Folikül sıvılarına ait ADA, 5'NT ve GUA Enzim Aktiviteleri ve Oksidasyona Duyarlık Seviyeleri	40
Grafik 2: Folikül sıvısı ADA (IU/L) aktivitesi	40
Grafik 3: Folikül sıvısı 5'NT (IU/L) aktivitesi	41
Grafik 4: Gruplara ait folikül sıvısı GUA Aktivitesi	41
Grafik 5: Gruplara ait folikül sıvısı OD Seviyeleri	42
Şekil 10. Glukoz, pürin metabolizması ve reaktif oksijen türleri üretimi arasındaki etkileşimler	44

Tablolar

Tablo 1: ADA aktivitesinin tayini	30
Tablo 2: Guanaz aktivitesinin tayini	31
Tablo 3 : 5'-Nükleotidaz aktivitesinin tayini	33
Tablo 4 : Oksidasyona duyarlılık tayini	35
Tablo 5 : IVF hastalarına ait grupların demografik verileri	38
Tablo 6: İn vitro Fertilizasyon (IVF) Hastalarının Folikül Sıvılarında Adenozin Deaminaz, 5'Nükleotidaz ve Guanaz Enzim Aktiviteleri ile Oksidasyona Duyarlılık Seviyeleri ($X \pm SS$)	39

Semboller, Kısaltmalar

ABP: ADA bağlayıcı protein
ADA: Adenozin Deaminaz
GUA: Guanaz
5'NT: 5'-Nülkeotidaz
ADP :Adenozin difosfat
OD: Oksidasyona duyarlık
AMP: Adenozin monofosfat
ATP: Adenozin trifosfat
dATP:Deoksiadenozin trifosfat
Ade: Adenozin
DNA: Deoksiribonükleik asit
DMSO : Dimetil sulfooksit
FAD: Flavin – adenin dinükleotid
GMP: Guanozin monofosfat
IMP: İnozin monofosfat
NDP: Nükleozid difosfat
PRPP: Fosforibozil pirofosfat
PNP: Purin nükleozit fosforilaz
RNA: Ribonükleik asit
SAH: S-adenozil homosistein
SAM: S-adenozil metiyonin
HDRP: Hidroksipurin ribonükleozid
mM: Milimolar
nm: Nanometre
µmol: Mikromol
IU: İnternasyonel Ünite
(A)_N: Numunenin absorbansı
(A)_K : Körün absorbansı
(A)_S : Standartın absorbansı
(A)_{SK} :Standart körünün absorbansı

1.GİRİŞ

Foliküler sıvıdaki nükleotid metabolizması ve oksidan/antioksidan dengenin belirlenmesi, in vitro fertilizasyonun sağlıklı yürütülebilmesi için önem arz etmektedir. Bunlardan adenoazin deaminaz, guanaz ve 5'- nükleotidaz enzimlerinin aktiviteleri nükleotid metabolizmasının anahtar enzimleri olmaları açısından anlamlıdır. Oksidasyon hassasiyeti parametresinin tayini de oksidan/antioksidan denge hakkında bilgi sahibi olmak açısından önemli bir göstergedir. Bu çalışmada, adı geçen parametreler tayin edilerek foliküler sıvıdaki nükleotid metabolizması ve oksidan dengenin durumu hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adenozindeaminaz [ADA] (adenozin amino hidrolaz EC 3.5.3.3) Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1 Adenozin Deaminaz enziminin adlandırılması

Adenozin deaminaz (ADA; EC 3.5.4.4, Adenozin aminohidrolaz) adenozin ve deoksiadenozinden amonyağın ayrılması ile inozin ve deoksiinozin oluşumunu katalizler ^{1,2,3,4,5,6}. Pürin yıkım yolunda, inozin ve deoksiinozinin oluşumundan sonra hipoksantin oluşur. Hipoksantin salvage yolun en önemli substratlarındadır. Buyüzden ADA aynı zamanda salvage yolun da enzimi olarak da kabul edilmektedir ^{7,8,9,10,11,12}.

Adenozin deaminaz hidrolazlar sınıfında bulunan bir enzimdir olup, hidrolazlar C-O, C-N, C-C ve fosfo anhidrit bağına da içeren diğer bazı bağların hidrolitik olarak yıkılmasını katalizleyen enzimlerdir ^{13,14}.

2.1.2 ADA'nın Yapısı

Adenozin deaminaz, sekiz β zinciri ve periferde sekiz α heliks içeren paralel bir $\alpha\beta$ kompleksi içerir. Bu protein 1088 nükleotid tarafından şifrelendirilmektedir. Protein zinciri başlangıçtaki metiyonin hariç 362 aminosit içerir. N- terminal uçtaki aminoasit alanin, C- terminal uçtaki aminoasit ise lösin ¹⁵.

ADA'nın atomik absorpsiyon spektroskopisine göre her enzim molekülü başına 0.9 ± 0.1 Zn atomu bağlar. Aktif merkezdeki Zn iyonu, His¹⁵, His¹⁷ ve His²¹⁴ 'ün N atomlarına, Asp²⁹⁵ 'in O atomuna ve hidrokisipurin ribonükleozid 'in (HGRP) O atomuna koordine bağlarla bağlanmıştır ¹⁶.

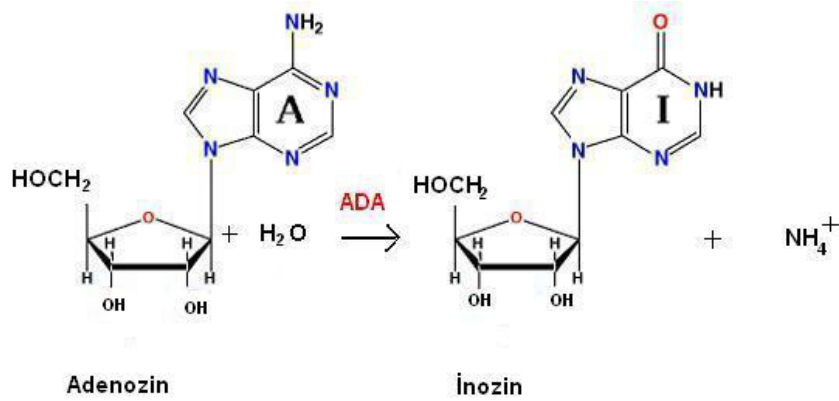
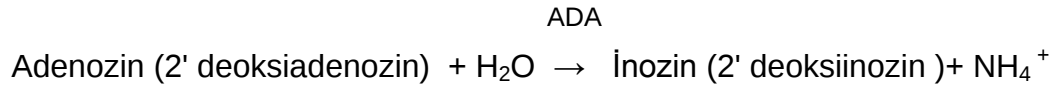
Spesifik olarak adenozin ve bazı diğer nükleozit analoglarını substrat olarak kullanır ^{17,19}. Hayvan dokularında yaygın olarak bulunur. Enyükssek aktivite çekumintestinal mukoza ve dalakta bulunur. Buna karşılık iskelet kasında, deride ve kemikte de çok az aktivite vardır. Enzim büyük ölçüde hücrenin stoplazmik fraksiyonunda bulunmasına karşılık, kısmen nükleusta da mevcuttur ^{20,21}.

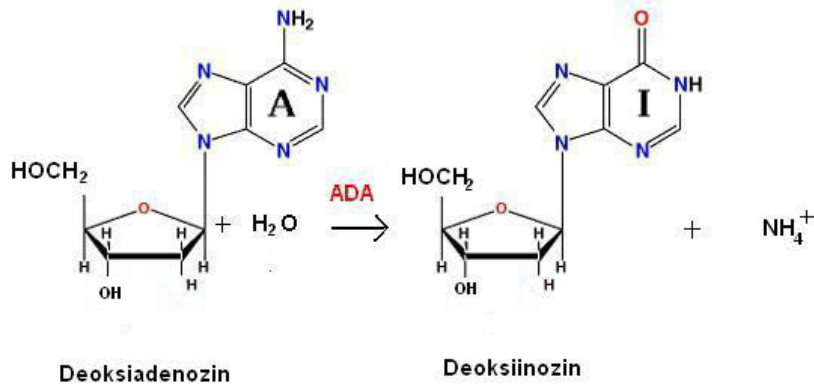
Substrat spesifikliğı, elde edildiğı kaynaklara göre değışiklik gösterir. Aynı şekilde farklı organ ve dokulardan elde edilen enzim farklı optimal pH, elektroforotik mobilite ve substrat spesifikliğı gösterir. Buna karşılık aynı organizmanın farklı dokularında aynı enzim mevcuttur ^{18,22}. Serumdaki ADA aktivitesi malin tümörlerde viral hepatitte ve sirozda enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür. Özellikle günümüzde serum ADA aktivitesi, akciğer kanseriyle akciğer tüberkülozunun ayırıcı teşhisinde de kullanılmaktadır ^{23,24}. Akciğer kanserinde serumdaki ADA aktivitesi anlamlı

derecede değişiklik göstermemesine rağmen, tüberkülozda anlamlı derecede yükselme görölmektedir.

2.1.3 Adenozin Deaminazın görev aldığı reaksiyonlar

ADA, adenozin ve 2'- deoksiadenozini sırası ile inozin ve 2'- deoksiinozine yıkım yolunu katalize etmektedir. Bu reaksiyon geriye dönüşümsüz olduğu için, bu enzim reaksiyonu adenozinin yıkılmasında kontrol basamağını oluşturur. Adenozin ve deoksiadenozin moleküllerinin yüksek konsantrasyonları hücre için toksik olduğundan bu nükleozidlerin hücre içi seviyelerinin düzenlenmesi açısından önemlidir ^{25,26}.





Şekil 1: ADA'nın katalizlediği tepkimeler

2.1.4 Adenozin deaminaz İzoenzimleri

ADA' nın iki izoformu vardır. Düşük molekül ağırlıklı olan ADA1 timus, eritrosit ve kalpte bulunurken, yüksek molekül ağırlıklı ADA2 karaciğer, böbrek ve bağırsaklarda bulunur²⁷. İki molekül ADA1, glikoprotein yapısındaki bir proteinle birleşerek ADA2 formunu meydana getirdiği gösterilmiştir ^{28,29}.

ADA bağlayıcı protein (ABP), insan serumunda serbest moleküler formda dimerik olarak bulunmaktadır. Enzimin küçük formunun büyük forma dönüşmesinin konversiyon faktörü veya dönüşüm faktörü adı verilen ADA bağlayıcı bir proteinle gerçekleşir. En fazla miktarda böbrekte en az miktarda ise eritrosit ve trombosit'te bulunur. ABP, bir integral membran protein olup membranın iç ve dış yüzüyle bağlantılıdır ³⁰.

2.1.5 Adenozin Deaminazın lokalizasyonu

ADA, insan ve hayvan dokularının hemen hemen hepsinde bulunmaktadır. ADA'nın aktivitesinin ölçümlerinde lenfoid dokularda diğer dokulara göre daha fazla aktivite olduğu tespit edilmiştir. ADA'nın esas fizyolojik aktivitesi lenfoid çoğalma ve farklılaşma ile ilgilidir ³¹. ADA düzeyi lenfositlerde eritrositlere göre 10 kat daha yüksektir. T lenfositlerinde B lenfositlerine göre daha yüksek oranlarda bulunurken, daha az farklılaşmış T hücrelerinde daha fazla bulunmaktadır. Bu nedenle, ADA hücresel immüitenin bir göstergesi olarak da kabul edilmektedir ^{32,33,34,35,36,37,38,39}.

ADA aktivitesi; insanda lenfoid olmayan dokular arasında özellikle duodenal epitelyal hücre villuslarında, daha az olarakta gastrointestinal sistemin diğer bölümlerinde, santral sinir sisteminin tüm hücre tiplerinde, kas, akciğer, pankreas, ve böbrek gibi organlarda çeşitli miktarlarda bulunur ⁴⁰.

2.2 Adenozin Deaminazın Substratları Hakkında Genel Bilgi (Adenozin ve 2'-deoksiadenozin)

Adenozin, ADA için doğal bir substrattır. Aynı zamanda hücrenin normal fonksiyonunu görmesi için gerekli olan metilasyon reaksiyonu sonucunda elde edilmektedir. Bu reaksiyonda, S-adenozil metiyonin (SAM), S-adenozil metiyonin metil transferaz enzimi ile S-adenozil homosisteine (SAH) ve SAH hidrolaz ile homosistein ve adenozine dönüşmektedir ^{41,42,43}.

ADA eksikliği ile ortamda artan adenozin SAH'ın yığılmasına neden olmaktadır. SAH'ın yığılması SAM ile SAH'ın yarışmaya girmesine ve buna bağlı olarak metilasyon reaksiyonunun durmasına neden olmaktadır. ADA eksikliği ile ortamda artan diğer bir substrat olan 2'-deoksiadenozin ise SAH hidrolazın inaktivatörü olup SAH hidrolazı doğrudan inhibe etmektedir. Homosistein, homosistein metil transferaz ile metil grubunu transfer ederek metiyonini oluşturmaktadır. Kobalamin (B₁₂), homosisteinin metiyonine dönüşümü için bir faktör olmaktadır. Kobalamin eksikliği ile ortamda SAH konsantrasyonu artmakta ve böylece metilasyon reaksiyonu durmaktadır.

Adenozin hücre içine girdiği zaman üç alternatif metabolizma ile karşı karşıya gelmektedir. Birincisi SAH hidrolaz ile S-adenozil homosistein oluşumu, ikincisi adenozin kinaz ile adenilik asite (AMP→ATP) fosforilasyonu ve üçüncüsü de ADA ile inozine deaminasyonudur. Bu üç alternatif yollardan enzim substrat ilgisi en fazla olan birinci reaksiyon olup bunu ikinci ve üçüncü reaksiyonlar izlemektedir. Bunun için adenozin konsantrasyonu düşük olduğunda adenozinin büyük kısmı ATP'ye fosforillenirken, adenozinin yüksek konsantrasyonunda inozine deaminasyonu görülmektedir. Substrat olarak 2'-deoksiadenozin kullanıldığında iki alternatif metabolizma bulunmaktadır. Bunlardan birincisi ADA ile deoksiinozin oluşturmak üzere deaminasyonu, ikincisi deoksiadenozin kinaz ile deoksiadenilik asite fosforilasyonudur. 2'-deoksiinozin oluşurken yüksek konsantrasyonunda dAMP meydana gelmektedir ^{41,44,45}.

2.2.1 dATP Birikmesinin Metabolik Sonucu

Deoksiadenozin trifosfat (dATP) adenozin metabolizmasının bir ürünüdür. dATP, DNA sentezi için gerekli olan normal bir ön maddedir. Bununla beraber yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkiler göstermektedir. ADA eksikliğinin bir sonucu olarak ortamda dATP konsantrasyonu artmaktadır. dATP hücrenin büyümesi için gerekli olan bir enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe etmektedir. Bunun sonucu olarak DNA yapımı inhibe olmakta ve DNA iplik kırılmaları artmaktadır. Bu iplik kırılmaları hücrenin normal görevini yapmasına engel olmakta ve sonuçta ölüm olayı gerçeklemektedir^{46,47}.

Sonuç olarak dNDP ya hızla DNA' ya dönüşmekte ya da deoksinükleozidlere yıkılmaktadır. Lenfositlerde ve diğer memeli hücrelerinde deoksinükleotid havuz büyüklüğü az olup, DNA sentezi için çok kısa bir süre yeterli olmaktadır. dATP, ribonükleotid redüktazı inhibe ettiği için dNDP yeterli sentezlenememektedir⁴⁸.

2.3 Pürin Nükleotidlerin Metabolizması

Pürinler, heterosiklik bileşikler olup hem karbon hem de karbon dışı (hetero) atomlar içeren halkalı yapılardır. Pürinlerin başlıca türevleri nükleozidler ve nükleotidler olup bunların her ikisi de, azot hetero atomuna bir β -N- glikozid bağı ile bağlanmış siklik şeker (çoğunlukla bir pentoz) içerir. Nükleozidler buna ek olarak, şekerin hidroksil grupları ile esterlenmiş bir veya daha fazla sayıda fosfat grubu içerirler.

2.3.1 Sentezi

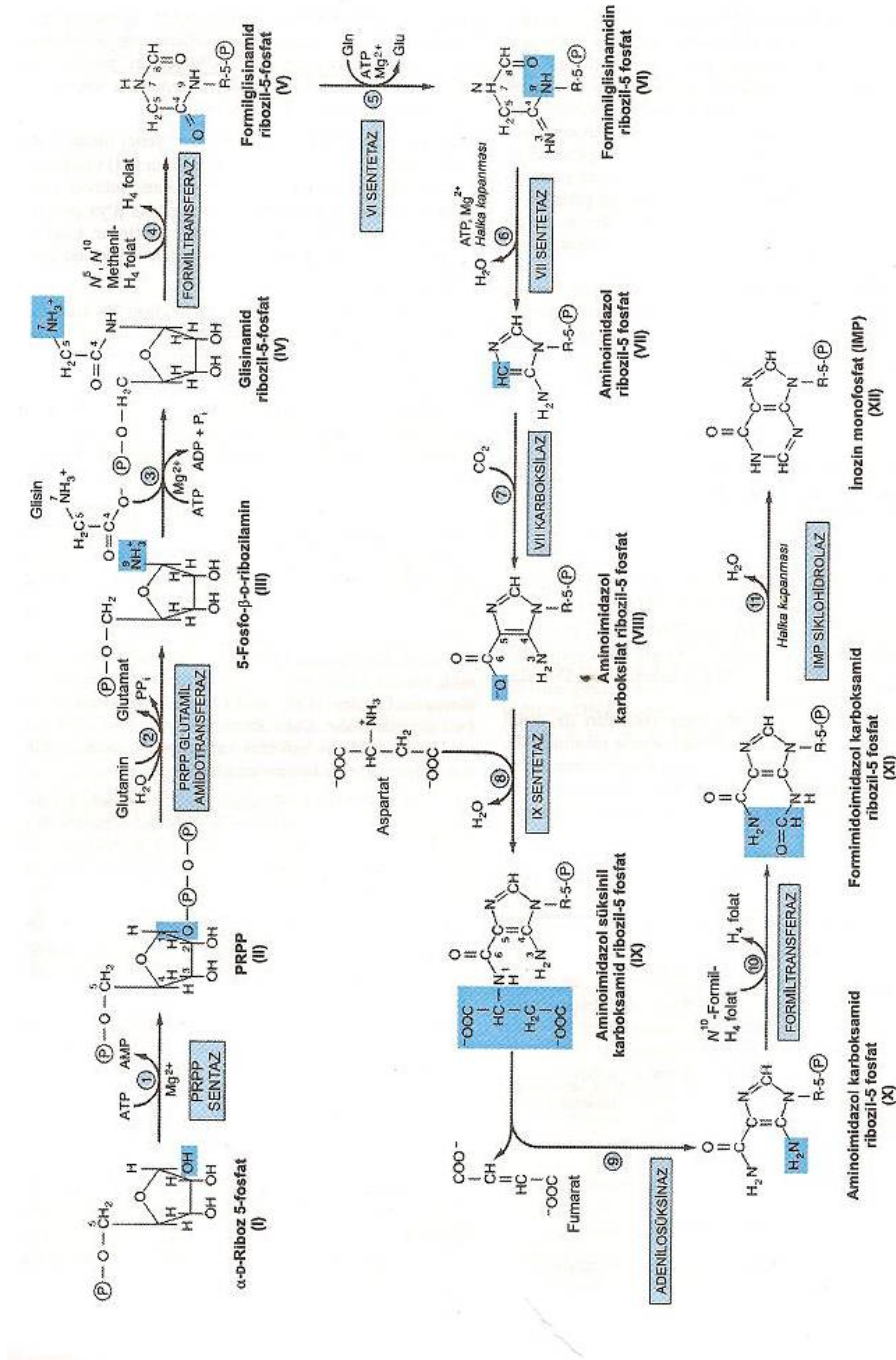
Sırasıyla;

1. Amfibolik ara maddelerden sentez (de novo sentez),
2. Pürinlerin fosforibozilasyonu ve
3. Pürin nükleozidlerinin fosforilasyonudur.

Pürinlerin de-novo sentezi (Şekil 2), Riboz-5 Fosfat'la başlar. Sentez yolunun 1. basamağında, ATP girişi ile 5- fosforibozil-1 –pirofosfat (PRPP) meydana gelir. Bu madde de novo pürin biyosentez yolunda ilk oluşan ara madde olmasının yanı sıra, pürin kurtarma yolunda, NAD^+ ve NADP^+ biyosentezinde yer alan bir ara maddedir. Bu reaksiyon PRPP sentetaz enzimi tarafından katalize edilir.

Sentezin 2. basamağında 1. karbona bağlı pirofosfat grubu glutaminin amid grubuyla yer değiştirir. Böylece 5'-Fosfo- β -D-ribozilamin (Fosforibozilamin) oluşur. Bu reaksiyonu PRPP glutamil amidotransferaz katalizler. Bu ilk iki reaksiyon de novo sentez yolunda hız kısıtlayıcı basamaklardır.

Diğer reaksiyonlar, 3. - 11. basamağa kadar ardışık reaksiyonlar şeklinde devam ederek, son basamak olan 11. basamakta IMP siklohidrolaz tarafından katalizlenen formimidoimidazol karboksamid ribozil-5-fosfatın halkasının kapanması ile, ilk pürin nükleotidi olan inozin monofosfat (IMP) oluşur ⁴⁹.

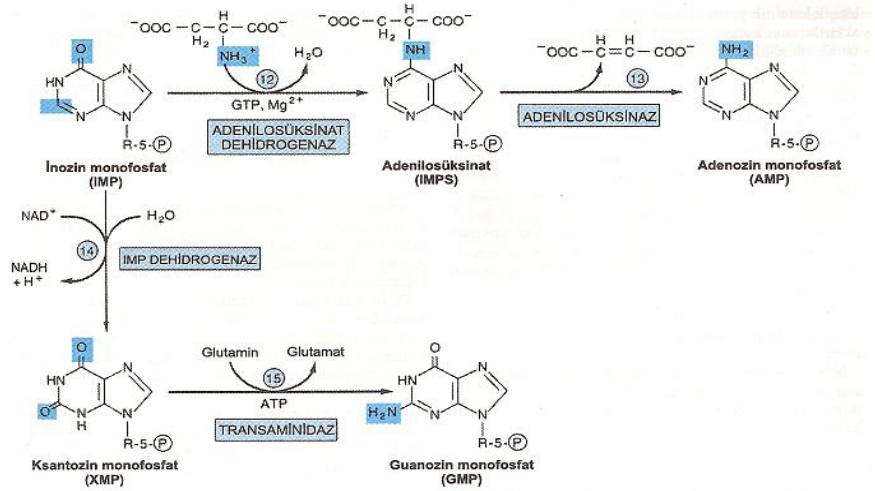


Şekil 2: Riboz-fosfat ve ATP'den de novo pürin biyosentezi yolu ⁴⁹

2.3.2 IMP'nin AMP ve GMP' ye çevrimi

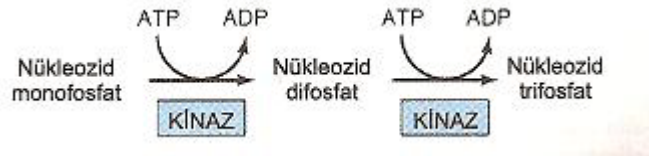
IMP sentezinden sonra yol dallanır ve iki kısa tepkime dizisi, AMP ve GMP oluşumuna yol açar. IMP'ye aspartat eklenmesi adenilosüksinat oluşturur. Bu tepkime GTP'ye ihtiyaç vardır. Adenozin 5'-monofosfat (AMP) oluşturmak üzere fumaratın serbest bırakılması adenilosüksinaz tarafından katalizlenir.

IMP'nin, IMP dehidrojenaz tarafından katalizlenen bir tepkime NAD⁺ tarafından oksidasyonu ksantozin monofosfat (XMP) oluşturur. XMP'nin 6-okso grubunun glutaminin amid azotu tarafından transamidasyonu, 5.tepkimeye benzer⁴⁹.



Şekil 3 : IMP'nin AMP ve GMP'ye çevrilmesi⁴⁹

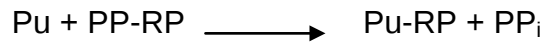
AMP ve GMP mononükleotidleri, nükleozid monofosfat kinaz tarafından katalizlenen ATP'den fosforil aktarılması yoluyla nükleozid difosfatlarına (ADP ve GDP) çevrilir. GDP, daha sonra, bir diğer ATP tüketilerek nükleozid difosfat kinaz tarafından GTP'ye çevrilir. (Şekil 4) ADP'nin ATP'ye çevrimi, birincil olarak oksidatif fosforilasyon ikincil olarak glikoliz ve sitrik asit döngüsü tepkimeleri ile başlar.



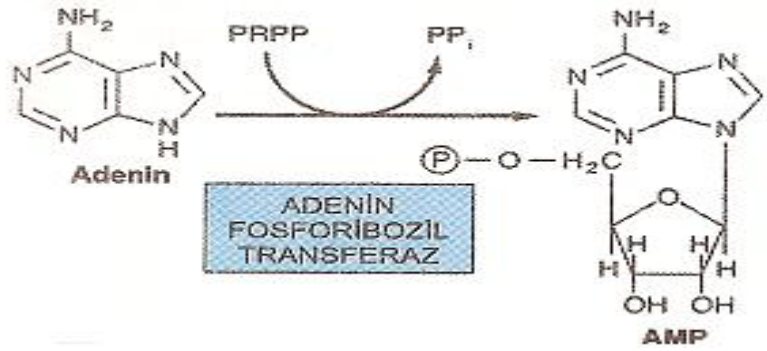
Şekil 4 : Nükleozid monofosfatların nükleozid difosfatlar ve nükleozid trifosfatlara çevrilmesi ⁴⁹

2.3.3 Kurtarma yolları (Salvage Pathways)

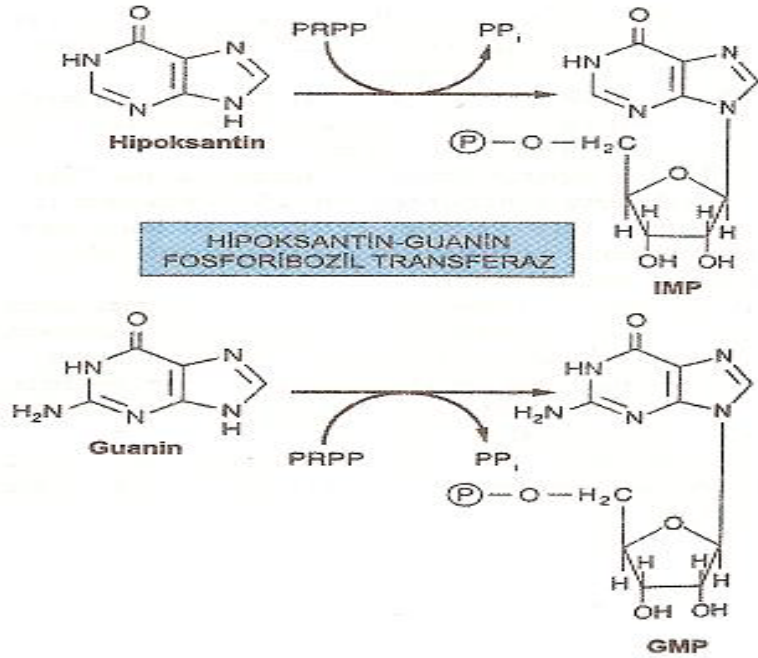
Pürin, pürin ribonükleozidleri ve pürin deoksiribonükleozidlerinin mononükleotidlere çevrimi, de novo senteze oranla daha az enerji gerektiren ve kurtarma tepkimeleri olarak bilinen olayları kapsar. Miktar olarak daha önemli olan bir mekanizma, serbest bir pürinin (Pu), PRPP tarafından, pürin 5'-mononükleotid (Pu-RP) oluşturmak üzere fosforibozilasyonunu kapsar:



Pürinlerin, PRPP'ye bağımlı fosforibozilasyonu, adenin fosforiboziltransferaz (adenini AMP'ye çevirir Şekil 5) ve hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (hipokasntin veya guanini IMP veya GMP'ye çevirir (Şekil 6) tarafından katalizlenir.

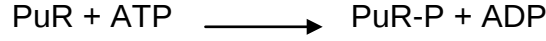


Şekil 5: Adenin adenin fosforiboziltransferaz katalizlenen fosforibozilasyonu ⁴⁹



Şekil 6: Hipokasantin ve guaninin sırasıyla IMP ve GMP vermek üzere fosforibozilasyonu ⁴⁹

İkinci bir kurtarma mekanizması, bir pürin ribonükleozidin (PuR) ATP tarafından direkt fosforilasyonunu kapsar:



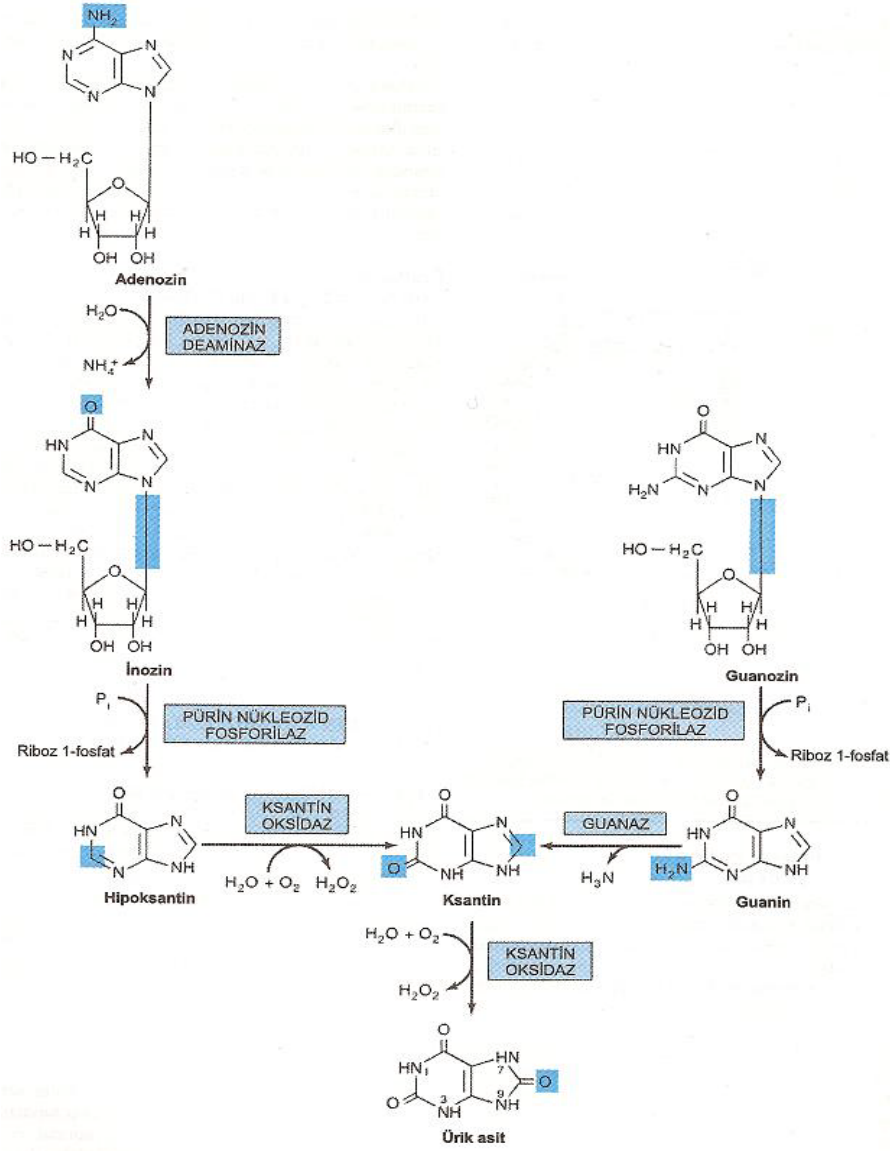
Adenozin kinaz, adenozinin AMP'ye veya deoksiadenozinin dAMP'ye fosforilasyonunu katalizler. Deoksisitidin kinaz, deoksitidin, deoksiadenozin ve 2'-deoksiguanozinin sırasıyla, dCMP, dAMP ve dGMP'ye fosforilasyonunu katalizler.

Pürin nükleotid biyosentezinin ana yeri olan memeli karaciğeri, kendi biyosentezlerini yapamayan dokular tarafından kurtarılmak ve kullanılmak üzere pürin ve bunların nükleozidlerini sağlar ⁴⁹.

2.3.4 Pürin nükleotidlerin yıkımı (katabolizma)

Adenozin deaminaz enzimi, adenozin ve 2'-adenozini sırasıyla inozin ve 2'-deoksiinozine dönüştürmektedir (Şekil 7). Pürin yıkım yolunda pürin nükleotidleri, 5'-nükleotidaz enziminin etkisiyle fosfat gruplarını kaybederek adenozin monofosfata (AMP) dönüşmektedirler. Elde edilen AMP ya 5'-nükleotidaz ile adenozine ya da AMP deaminaz ile deamine edilerek inozin monofosfata (IMP) dönüşmektedirler. Daha sonra adenozin, adenozin deaminaz ile inozine, IMP ise 5'-nükleotidaz tarafından inozine çevrilmektedir.

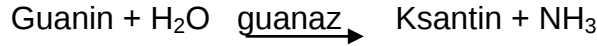
Bundan sonraki basamak diğer pürin bazı olan guanozinle ortak yürür ve bu reaksiyonları purin nukleozit fosforilaz (PNP) enzimi katalizler.



Şekil 7 : Pürin yıkım yoluyla ürik asit'in oluşması ⁴⁹

2.4. Guanaz {GUA(guanin aminohidrolaz EC 3.5.4.3)}

Birçok hayvansal dokuda bulunmaktadır. İnsanlarda esas olarak karaciğer, böbrek, beyin ve ince bağırsakta vardır. Kalp, akciğer, dalak, pankreas, iskelet kası, eritrositler ve lökositlerde ise çok düşük aktivite vardır veya bir kısmında hiç yoktur ^{50,51}. Karaciğer hücrelerinin nükleus, mitokondri ve ençok da stoplazmasında bulunmaktadır. Serumdaki aktivitesi son derece düşüktür. Serumdaki aktivite akut viral hepatitte çok yükselir, buna karşılık tıkanma sarılığında, sirozda, enfaktüste, akut pankreatitte ve malin tümörlerde serumda çok az bir artış görülür ^{52,53}. Guanaz enziminin katalizlediği pürin yıkım yoluna ait reaksiyon;



2.5. 5' Nükleotidaz {5'-NT (5'-ribonükleotid fosfohidrolaz EC 3.1.3.5)}

Nükleotidazlar genel olarak adenozin veya inozinin monofosfatlarından fosfat'ın hidrolizini katalizlemektedir.



Riboz halkasının 5 numaralı karbon atomuna bağlı durumda bulunan fosfat gruplarına sahip nükleozit fosfatların D fosforilasyonunu katalizler. 200000'in üzerinde bir molekül kütlesi vardır. Enzimin optimal pH sı Michale-Menten sabitleri enzimin saflaştırıldığı kaynağa göre değişiklik gösterir ⁵⁴. Adenozin monofosfata karşı serum 5' nükleotidazın K_m değeri 0.2 mM dır. Seminal sıvı için bulunan optimal değerler pH 8.5-9.5 arasında değişiklik gösterirken, insan serum 5'nükleotidazın optimal

pH sı 7.5 tir. 5'nükleotidaz florür, borat ve arsenat gibi anyonlar ve çinko kobalt bakır nikel gibi metal iyonları tarafından inhibe edilir. Son ürün inhibisyonu ise D fosforillenmiş nükleozitler tarafından oluşturulur. Orto fosfatlar ise ancak çok yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon oluştururlar. Buna karşılık magnezyum, kalsiyum, demir, baryum ve kobalt iyonları ise enzimi aktive eder ⁵⁵.

2.6. Folikül Sıvısı

Folikül sıvısı, tüp bebek merkezlerinde infertilite tedavisine alınan kadınların hiperstimüle edilmiş preovulatuvar foliküllerinden yumurta aspirasyonu sırasında rutin olarak elde edilir. Ovaryum folikül sıvısı analizleri son yıllarda yumurta mikro çevresinin belirlenmesi için yapılmaktadır.

Foliküler sıvı ekstrasellüler sıvının ovarian foliküllerin antrumu içinde biriken bir yerdir ⁵⁶. Folliküler sıvı steroidleri hipofizer gonadotropinlerin kontrolü ile granüloza ve teka hücrelerinden salgılanmaktadırlar. Bütün antral folikül gelişim devrelerinde folliküler sıvı kumulus yumurta kompleksi ile tamamıyla kaplanır ve bazı steroidler folliküler sıvıda plazmadan bin (1000) kat yüksek olabilir ⁵⁷. Ovarian steroidlerin folliküler sıvıdaki konsantrasyonu folliküler sıvıdan kana sınırlanmış difüzyon ile kandan oldukça yüksek olduğu söylenmektedir ⁵⁸.

Foliküler sıvı steroidleri, yumurta kalitesinin tahmin etmek için güçlü bir marker olarak bilinmektedir. Bunların konsantrasyonları yumurta fertilizasyonu, embriyo gelişimi ve implantasyonla ilişkilendirmek için önemlidir ⁵⁹.

Özellikle, klasik İn Vitro Fertilizasyonda yumurta maturasyonu sadece kumulus korona kompleksine bakılarak değerlendirildiği için yumurta yeterliliği konusunda daha sağlıklı bilgi verebileceği düşüncesiyle folikül sıvısının içeriği yoğun olarak araştırılmış ve yapılan analizler sonunda çok çeşitli sayı ve miktarlarda hormon içerdiği tespit edilmiştir^{59,60,61,62,63}.

Folikül maturasyonu olurken foliküller sıvı hacmi gibi foliküller sıvısındaki steroid ve steroid olmayan maddelerin konsantrasyonu artış göstermektedir. Yumurta kumulus korona kompleks morfolojisi maturasyonu boyunca foliküller sıvı içerisinde yıkandığından foliküller sıvısının biyokimyasal özellikleri ile yumurta maturitesi arasında direk bir ilişki olduğu vurgulanmaktadır^{56,57}.

Yumurta mikroçevresi olan folikül sıvısının işlevlerini aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür.

1. Yumurtayı negatif etkilerden korumak.
2. Yumurtayı gerekli zaman diliminde olgunlaştırmak.
3. Menstrual siklus süresi boyunca, proliferatif özellikli endometriyum geliştirmek için uygun hormonal ortamı oluşturmak
4. Matürasyonu tamamlamış yumurtanın gerekli zamanda dışarıya çıkarmak
5. İmplantasyon için uygun şartları oluşturmak ve gebeliğin devamını sürdürmek için korpus luteum gelişimini temin etmek.

2.7 İNFERTİLİTE (KISIRLIK)

Kısırlık, bir yıl boyunca korunmaksızın düzenli cinsel ilişki olmasına rağmen gebeliğin oluşmamasıdır⁶¹. Fekundabilite, aylık dönem içerisinde gebe kalabilme potansiyelidir. Tüm populasyonda fekundabilite

oranı % 25 tir. Fekundite ise bir menstruel siklusta canlı doğum ile sonuçlanan gebeliği yakalayabilme potansiyelidir. Korunma yöntemi kullanmayan kısır çiftlerin %57'si ilk 3 ayda, %72'si 6 ay içinde, %85'i 1 yılda, %93'ü ise 2 yılın sonunda gebe kalmaktadır ⁶¹.

Kısırlık sebeplerini; %35 erkek kısırlığı, %35 tubal ve pelvik patolojiler, %15 ovulatuvar disfonksiyon, %10 nedeni açıklamayan kısırlık, %5 yaygın olmayan nedenlerdir (anatomik, enfeksiyöz ve diğer endokrin patolojiler) ⁶¹.

Kadınlarda kısırlığa neden olan şartlar arasında %40 ovulatuvar disfonksiyon, %40 tubal ve pelvik patolojiler, %10 açıklanamayan nedenler ve %10 yaygın olmayan nedenler sayılabilir ⁶¹.

2.7.1. Kadın ve Erkek İnfertilitesi

Overi normal olan ama fonksiyonel uterusu olmayanlarda (müllerian anomali, şiddetli intrauterin yapışıklık, geçirilmiş histerektomi), gebeliğin önemli riskler getirebileceği medikal hastalığa sahip kadınlarda yapılacak taşıyıcı annelik uygulamaları amacıyla da IVF uygulanabilir. Otozomal resessif veya seks geçişli genetik hastalıklarda IVF eşliğinde yapılacak Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) işlemi ile bu riskleri taşıyacak çocuğun doğması engellenebilir.

Kötü sperm kalitesi kısır çiftlerin yaklaşık %20'nde infertilitenin tek nedeni iken, diğerlerinde hafif ama önemli semen anormallikleri intra uterin inseminasyonla(IUI) ile ekarte edilebilir⁶². Tedavi mümkün değil veya başarısız, inseminasyon da tercih edilmiyor ise, ejakülatdan, epididimden veya testisten elde edilen spermiler ile IVF veya ICSI seçenek tercih edilebilir ⁶³.

Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) standart tanısıal protokolleri kullanarak oluşturduğu verilere göre infertil çiftlerin %37'sinde kadın faktörü; %8'inde erkek faktörü, %35'inde her iki faktör birden bulunmuş, %5'inde sebebi açıklanamamıştır. %15'i gözlem esnasında gebe kalmıştır ⁶⁴.

2.7.1.1. Kadın İnfertilitesi

Kadın infertilitesi bir çok nedene bağlı olarak tartışılabilir. En çok başvuru alan başlıklar tubal faktör infertilitesi ve endometriozisdir.

a- Tubal Faktör infertilitesi

İn vitro fertilizasyon tekniği ortaya çıkmadan önce düzeltilemez derecede tubal hasarı olan kadınlar steril kabul edilirdi. Daha az derecede hasarı olanların gebe kalma ihtimalleri ise orta derecede kabul edilir. Yardımcı Üreme Tekniklerinin modern çerçevesinde, cerrahi tedavi seçenekleri giderek önemini kaybetmekte ve tubal faktörü olan infertil kadınlardaki gebelik oranları dramatik olarak artmaktadır.

Hafif derecede distal tubal hastalığı olanlarda postoperatif gebelik oranları %50'leri geçtiğinden, rekonstruktif tubal cerrahi uygulanması uygundur ^{65,66,67}. Bu nedenle, şiddetli distal tubal hastalığı olanlarda IVF tedavisi tercih edilmelidir. IVF ile elde edilen gebelik oranları cerrahiden yüksektir. Bununla birlikte cerrahi ile oluşan gebelik oranları %10-35 arasında ve ektopik gebelik riski (%5-20) daha fazladır ^{68,69,70,71}.

b- Endometriozis

Endometriozisi hem klinik hem de patofizyolojik olarak tanımlamak mümkündür. Klinik olarak, endometrial dokunun uterus

kavitesi ve muskuler tabakası dışında olması, patofizyolojik olarak ise endometrial bez ve stromanın her ikisinin de bulunması ve dokuların metabolik aktivitesinin varlığı olarak tanımlanır.

Endometriozisin infertiliteye yol açabileceği muhtemel mekanizmalar etkin yumurta tutulumunu, uygun yumurta gelişimini veya erken embriyogenezi önleyerek kendini gösteren bozulmuş adneksial anatomi ve azalmış endometrial reseptivitedir olarak sıralanabilir ^{72,73}.

Endometriomalar tedavi edilmeyebilirler veya yumurta toplanmasından hemen önce aspire edilebilirler. Her iki durumda, yumurta toplanmasından sonra ovarian abse gelişimi riski artmıştır ^{74,75}. Özellikle 3 cm altında olan endometriomaların IVF sonuçları üzerine olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir.

2.7.1.2. Erkek İnfertilitesi

Bir yıl içerisinde korunma olmaksızın yapılan normal cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamayan çiftlerin oranı yaklaşık %15 kadardır. Erkeğin bu durumdaki oranı yaklaşık %20 iken, kadın eşile birlikte ve açıklanamayan bu grup da içine alındığında bu oran %50'lere varmaktadır. Üreme çağındaki erkeklerin %6'sında infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Bu olguların yaklaşık %90'ında da bozulmuş bir spermatogenez vardır. Normalde fertil bir erkekte günde 120 milyon sperm yapımı olmaktadır ⁷⁶.

İnfertil çiftlerin yaklaşık olarak yarısında erkeklerde sperm sayıları Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) normal fertil erkeklerde bulunan değerlerin altında çıkar. Bunun yanında çocuk sahibi olabilen erkeklerde de bu değerlerin altında sperm sayılarına rastlanmaktadır. Dolayısı ile

sperm sayısı ile beraber hareketli ve normal yapılı sperm sayıları önemlidir. Ayrıca bu değerlerin biraz altında olan erkeklerde de doğal yolla gebelikler oluşabilmektedir. Eğer kadında üreme ile bir sorun yok ise, erkek eşini DSÖ sperm analizi kriterlerine göre de düşük sperm parametreleri ile de hamile bırakabilir.

Sperm sayısı 13.5 milyon sperm/mL, ileri hareketli %32 veya morfolojisi %9 olanlarda erkek faktörüne bağlı infertilite olasılığı artmıştır⁷⁷.

Tıbbi veya cerrahi olarak kötü semen kalitesini normale getirmek, mümkün ise, genellikle ilk ve en çok en sık başvurulacak yoldur. Tedavi mümkün değil veya başarılı olmaz ise bazı hastalarda intra uterin inseminasyon ek fayda sağlayabilir. En iyi sonuçlar total motil sperm sayısı 10 milyondan normal morfoloji oranı da %14'den büyük olduğunda alınır. Total motil sperm sayısı bir milyondan veya morfoloji %4'den az durumlarda çok düşük gebelik beklenir^{78,79,80,81}.

Sonuç olarak, üreme çağındaki erkeklerin %6'sında infertilite problemi ortaya çıkar. Bunların yaklaşık %90'ında da bozulmuş bir spermatogenez vardır. Erkek infertilitesi infertil çiftin yaklaşık yarısını oluşturmakta olup, bunların %30-50'sinde de etyoloji saptanamamaktadır. Değerlendirmede semen analizi dikkatli ve düzgün yapıldığında, çok kıymetli bilgi sağlayabilmekte ve tedaviyi yönlendirmektedir. Özel klinik testler, prensip olarak, erkek infertilitesinin nedeninin tanımlanmasında tedaviyi yönlendirebilecekse yapılmalıdır.

2.8. Yardımlı Üreme Yolları

Dünyada ilk olarak 1944 yılında Boston'lu iki bilim insanı; John Rock ve Miriam Menkin yıllarca devam eden çalışmalarının sonucunda ilk kez vücut dışında insan yumurtası ve spermini bir araya

getirilerek fertilizasyonu bildirmişlerdir. Bu olaydan 34 yıl sonra, 25 Temmuz 1978 yılında İngiliz bilim adamları Robert Edwards ve Patrick Steptoe'nun in vitro fertilizasyon (IVF) ile doğan ilk bebeği açıklamaları üzerine üreme tıbbı için önemli bir dönüm noktası başlamıştır⁸².

Çağımızda yardımcı üreme teknikleri (YÜT)'nin ilerlemesiyle kısırlık tedavisindeki başarı oranları artmış ve daha çok kısır çiftin sağlıklı ve canlı bebeğe sahip olma şansı artmıştır. Overden yumurtaların elde edilmesini veya spermin hazırlanarak kullanılmasını sağlayan tüm teknikleri içermektedir. İlk yöntem intrauterin inseminasyon olmakla beraber, en yaygın yöntem in vitro fertilizasyon (IVF) olup, ancak gün geçtikçe teknolojik yöntemler de sayıca artmaktadır. YÜT'ün başarısı kısırlığın değerlendirmesi ve tedavisi tamamen değişim geçirmektedir.

IVF işlemi eksojen gonadotropin ile yapılan kontrollü ovarian stimülasyonu, transvajinal ultrasonografi altında oosit toplanma işlemini, laboratuarda fertilizasyonu ve embryoların uterusu transferini içerir. IVF artık ejakulat ile intra stoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) veya mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu (MESA) veya testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile elde edilmiş spermlerin intra sitoplazmik olarak enjekte edildiği yöntemleri, yardımcı embriyo tutunma tekniğini (assisted hatching) ve implantasyon öncesi genetik tanıyı (PGT) içermektedir⁸³.

2.8.1 Fertilizasyon

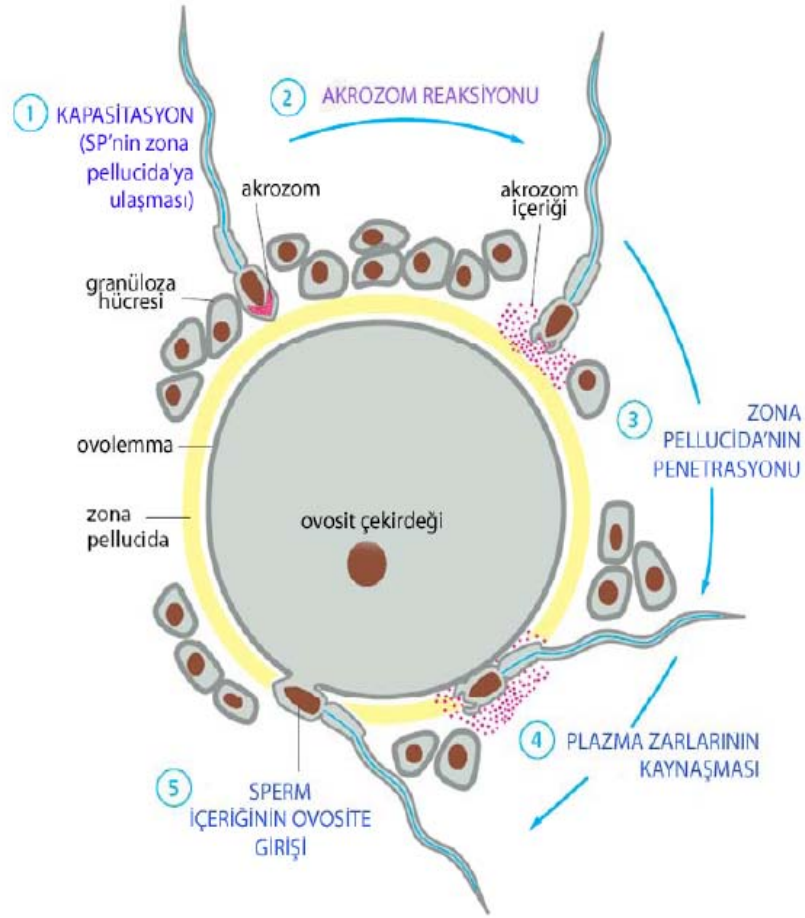
Tuba uterinanın distal 1/3 bölümü oluşturan ampulla bölgesinde gerçekleşir. Bu kısım tuba uterinanın en uzun ve geniş bölümüdür. Fertilizasyon, tuba uterinanın diğer kısımlarında da olabilir, fakat yumurta uterusu ulaştıktan sonra artık olmaz. Fertilizasyon sperm ile yumurtanın reaksiyonu ile başlar ve birinci mitoz bölünmesinin metafaz aşamasında anne ve baba kromozomlarının birleşmesiyle tamamlanır.

Fertilizasyon aşağı yukarı 24 saat devam eder. Karbonhidrat bağlayıcı reseptör proteinler gametlerin yüzeylelerinde bulunurlar. Bunlar fertilizasyon sırasında gametlerin birbirini doğru bir şekilde tanıyıp reaksiyona girmelerini sağlamaktadırlar ⁸⁴.

Fertilizasyon spermin yumurta ile olan kompleks reaksiyonlar dizisidir. Fertilizasyon olayının gerçekteşebilmesi için sperm ve yumurta arasındaki reaksiyon belli bir kural içinde devam etmelidir. Bu durumda, spermlerin kümölüs hücreleri arasında ileri hareket etmesi, zona pellusidaya bağlanıp penetre olması ve spermle yumurta zarlarının birleşerek spermin yumurta sitoplazması içine girmesi sağlanır. Bu reaksiyonların devamında yumurta başka bir spermin girmemesini engellemek için kortikal reaksiyon ve zona reaksiyonu olur.

Toplanan yumurtalar spesifik kültür ortamlarında yumurtaların matürasyon durumuna göre, matür yumurtalar için 4-8 saat, immatür yumurtalar için 12-24 saat inkübasyondan sonra semenden hazırlanmış hareketli spermatozoalarla karıştırlırlar (insemine edilirler). İnseminasyonu takiben 16-24 saat sonra yumurtanın fertilize olup olmadığı kontrol edilir. Fertilizasyon iki ayrı pronükleus ve iki polar cismin varlığı ile belirlenir ⁸⁵.

Aşırı düşük sperm konsantrasyonu, motilitede azalma ve anormal sperm morfolojisi klasik IVF'de fertilizasyonun olmayışının primer sebepleridir.



Şekil 8: Fertilizasyon için sperm ve yumurta reaksiyonları ⁸⁶

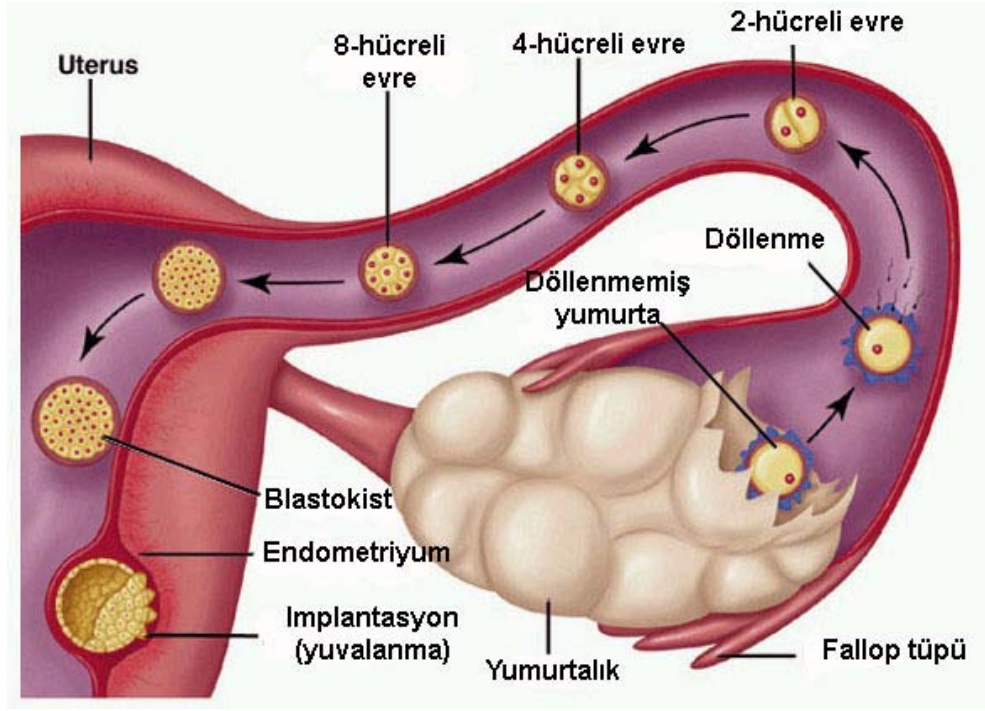
Günümüzde İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) şiddetli erkek infertilitesi tedavisinde tek çözümdür. Tercihen iyi morfolojiye sahip tek bir canlı sperm embriyolog tarafından seçilerek yumurtanın içine enjekte edilir. ICSI prosedürünün temeli yumurta ve sperm işlemlerine dayanmaktadır. ICSI işleminin SUZI işleminden farklı olarak tek bir sperm zona pellusidadan sonra ikinci bir bariyeri; oolemmayı geçerek enjekte edildiği için daha invaziv bir yöntemdir ⁸⁷.

ICSI yöntemi ile elde edilen ilk canlı doğum tavşan ve sığırlarda bildirilmiştir ⁸⁸. İnsanlardaki ilk gebelikler ise 1992 yılında gerçekleştirilmiştir. ICSI prosedürünün ortaya çıkışından çok kısa bir süre sonra fertilizasyon oranlarının, gelişen embriyo sayısının ve implantasyon oranlarının SUZI' ye göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir ⁸⁹.

2.8.2 İmplantasyon

İmplantasyon, embriyonun öncelikle desidua içerisine yerleşip sonra da annenin dolaşım sistemine plasentayı oluşturmak için ulaşmasını kapsayan bir seri işlem olarak tanımlanmaktadır ⁹⁰. Bu esnada endometrium ile embriyo arasında büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri, ekstraselüler matris ve prostoglandinler ile oluşan karmaşık bir ilişki/iletişim vardır. Embriyo bu etkenlerle epitele yapışmakta, bazal membrana doğru inmekte ve stromaya invaze olmaktadır ⁹¹. Bu sistemde meydana gelen herhangi bir aksaklık, implantasyonu engellemektedir. İmplantasyon mekanizmaları tam olarak aydınlatılmadıkça endometrial uygunluğun kesin bir tanımını yapmak zordur.

Embriyo gelişiminin birinci haftası boyunca gerçekleşen olaylar şematik olarak şekil 9'da aşağıda anlatılmaktadır. Gebelik başlangıcı yumurtalıklardan atılan yumurtanın uygun zamanda (atıldıktan 12-24 saat süre içinde) cinsel birleşme olması ile erkekten gelen spermin (dişi genital yollarında 48-72 saat yaşayabilir) döllenesi (fertilizasyon) ile başlar. Yumurta ve sperm Fallop tüpünün içinde buluşur ve döllene burada olur. Döllenen yumurtadaki hücreler bir yandan bölünerek çoğalırken diğer yandan rahime (uterus) doğru yolculuğunu sürdürür. Yaklaşık 6. gün uterus içine gelir ve rahim iç zarına (endometriyum) yapışır ve buraya yerleşerek gelişmeye başlar.



Şekil 9: Embriyo gelişiminin birinci haftası boyunca gerçekleşen olayların şematik görünümü⁹²

3-GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Grupları

Bu çalışmaya, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD'na bağlı Tüp Bebek Merkezine problemleri sebebi ile devam eden normal, zayıf ve yüksek cevaplı 45 infertil hastalar dahil edildi.

- I. Grup (Normal, n=15): Normal over yanıt veren yaş ortalamaları **29.3 ± 5.2** ve toplanan folikül sayısı 5 ve 20 arasında olan hastalardan oluşmaktadır.
- II. Grup (Zayıf, n=15): Zayıf yanıt veren yaş ortalamaları **35.1 ± 3.9** ve toplanan folikül sayısı 5'ten az olan hastalardan oluşmaktadır.
- III. Grup (Yüksek, n=15): Yüksek cevap veren yaş ortalamaları **26.9 ± 4.3** olan ve toplanan folikül sayısı 20'den fazla hastalardan oluşmaktadır.

Folikül sıvıları yumurta toplama işlemi sırasında foliküllerden aspire edilerek eppendorf tüplere konuldu. Toplanan materyal -80 °C de deney yapılincaya kadar muhafaza edildi. Toplanan folikül sıvılarındaki enzimatik ve diğer analizler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD Araştırma Laboratuvarında çalışıldı.

3.2. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, T.C. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kurumsal Araştırma Değerlendirme Komisyonu tarafından, 02 Haziran 2010 tarihli ve 44 No'lu kararı uyarınca etik açıdan uygun bulunmuştur.

3.3. Kullanılan Aletler

pH metre (Jenway)

Hassas Terazı (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Vorteks (Heidolf Reox 2000)

Spektrofotometre (Schimadzu, UV 1601)

Benmari (Heto)

Soğutmalı santrifuj (Damon IEC, B-20A soğutmalı, Hermle Z 323K)

Otomatik ve cam pipetler

Diğer plastik ve cam malzemeler

3.4. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan tüm maddeler analitik saflıkta olup, Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir. Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4), Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4), Trikloroasetikasit (TCA), Sodyum Hidroksit (NaOH), Adenin, Guanin, CuSO_4 , Fenol, Sodyum nitropurissiad, 1,1,3,3-Tetraetoksipropan, Triton X-100, KCl, MgCl_2 , Amonyum Sulfat (NH_4) $_2\text{SO}_4$, Etanol, TRİS ve HCl.

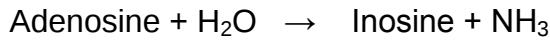
Metotların Uygulanması

3.5. Kullanılan Metotlar

3.5.1 Adenozin Deaminaz [Adenozin amino hidrolaz EC 3.5.4.4] Aktivitesinin Tayini

ADA aktivitesi tayini ile ilgili birçok metot mevcuttur. Bunlar spektrofotometrik, radyoizotop işaretleme tekniği ve HPLC ile olmak üzere üç başlık altında toplanmaktadır. Biz burada pratik ve ekonomik olması sebebi ile spektrofotometrik metodu tercih ettik. Spektrofotometrik metot iki şekilde yapılmaktadır. Birincisi adenozin'in maksimum absorbans verdiği 265 nm deki absorbans azalmasının takip edildiği kinetik metod, diğeri ise 628 nm de ADA etkisi ile açığa çıkan amonyak-fenol kompleksinin absorbansının ölçüldüğü end poin metotdur. Çalışmamızda kullandığımız metot 265 nm de Adenozin'in inozine dönüşümündeki absorbans azalışının takip edildiği metotdur¹⁰⁶.

ADA



Prensip: Yukarıdaki reaksiyon gereği 265 nm de maksimum absorbans veren adenosin'in ADA tarafından tüketilmesine bağlı olarak absorbansdaki azalma takip edilir.

Tablo 1 : ADA aktivitesinin tayini

Reaktifler (µL)	Numune	Kör
Tampon	100	100
Numune	20	20
D. su	880	860
Abs değişimi sabitleşinceye kadar takip edilir		
Substrat	20	****

265 nm’de kör’e karşı daha önce 0 ayarı yapılan spektrofotometre ile 1, 2., 3., 4. ve 5. dakikalarda numunenin absorbans değişimi okunur. (Kısaca 265 nm de 5 dakika absorbans azalması takip edilir.

Reaktifler:

1. Tampon: 50 mM, pH.7.2 Fosfat ya da Tris tamponu
2. Adenozin: 4.0 mM

ADA Aktivitesi, adenozin substratının molar soğurma katsayısından yararlanılarak hesaplanmıştır (ϵ adenosine: 8.1 L/ μ mol.cm). Bir IU, bir dakikada 1 μ mol adenozini (2’deoksiadenozin) inozine (2’deoksiinozin) dönüştüren enzim aktivitesi olarak tarif edilmektedir.

$$\text{ADA Aktivitesi (IU/L)} = (A_N - A_K) \times 6.27$$

A_N : Numunenin absorbansı

A_K : Kör’ün absorbansı

3.5.2. Guanaz - Gua (Guanin Aminohidrolaz; Guanin Deaminaz-GD)

Tablo 2 : Guanaz aktivitesinin tayini

Reaktif (mL)	Numune Körü	Numune	Stan. Körü	Standart
Tampon	2.0	2.0	2.5	2.5
Guanin	***	0.50	****	***
Numune	0.20	0.20	***	***
Standart	***	***	***	0.20
D.Su	***	****	0.20	***
Tüplerin ağzı parafilmle kapatılıp, karıştırılır ve 37 °C de 30 dakika su banyosunda inkübe edilir.				
H ₂ SO ₄	0.40	0.40	0.40	0.40
Guanin	0.50	***	****	***
Na-Tungstat	0.20	0.20	0.20	0.20
Karıştırılıp 10 dakika 5000 rpm de santrifüj edilerek supernatantlar ayrılır				
Süpernatant	2.0	2.0	2.0	2.0
Fenol/Nitropur	2.0	2.0	2.0	2.0
Alkalihipokl.	2.0	2.0	2.0	2.0

Karıştırılıp 15 dakika 37 °C 'lik su banyosunda beklettikten sonar 630 nm de her bir tüpün absorbansı d. suya karşı okunur.

GUA aktivitesi Caraway VT'nin tarif ettiği medoda göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır. Metodun prensibi ilk aşamada GUA dan deaminasyon sonucu NH₃'ün hidrolizini, daha sonra ise NH₃'ün fenol ile kompleksleşmesi esasına dayanmaktadır¹⁰⁷.

$$\text{GUA Aktivitesi (IU/L)} = \{ (\Delta A)_{\text{numune}} / (\Delta A)_{\text{standart}} \} \times 13.12$$

Reaktifler:

- 1- Stok guanin çözeltisi 2mg/mL
Guanin çalışma çözeltisi 0.2 mg/mL
Substrat çözeltisi günlük olarak hazırlanmalıdır.
- 2- Tampon çözelti 50 mM pH= 7.5 fosfat tamponu
- 3- Na tungstat %10 luk (w/v)
- 4- Fenol renk reaktifi 0.125 g sodyum nitropürüsit içerisinde bir miktar distile su bulunan 500 mL'lik balon jojeye konur. Üzerine 25 mL fenol çözeltisi ilave edilir. Distile suyla 500 mL' ye tamamlanır.
- 5- Alkalihipoklorit içerisinde bir miktar distile su bulunan 500 mL'lik balon jojeye 12.5 g NaOH eklenerek çözülür. Bunun üzerine 20 L % 5.25' lik sodyumhipoklorit çözeltisi ilave edilir. Distile suyla 500 mL'ye tamamlanır.
- 6- Stok standart çözelti ; 2 mg/mL saf, (NH₄)₂SO₄
- 7- H₂SO₄ 0.67 normal

3.5.3. 5'-Nükleotidaz {5'NT, 5'-Ribonükleotid fosfohidrolaz, EC 3.1.3.5} tayin metodu

Tablo 3 : 5'-Nükleotidaz aktivitesinin tayini

Reaktifler (mL)	Numune Körü	Numune	Standard kör	Standard
Tampon	1.300	1.500		
MnSO ₄	0.100	0.100		
NiCl ₂	0.200	0.200		
Numune	0.200	0.200		
Substrat	0.200	0.200		
<i>Karıştır ve 30 dakika 37 °C su banyosunda inkübeet</i>				
TCA	2.00	2.00		
<i>3000 g de 15 dakika santrifüj edilip supernatant ayrılır.</i>				
Supernatant	2.00	2.00		
Standard	-	-	-	1.00
D. su	-	-	1.00	1.0
TCA	-	-	1.00	-
Na-asetat	3.00	3.00	3.00	3.00
NH ₄ -Molibdat	0.500	0.500	0.500	0.500
İndirgeyici Çöz.	0.500	0.500	0.500	0.500
<i>Karıştır ve 5 dk 37 °C ' de su banyosunda inkübe et, 680 nm' de distile suya karşı her bir tüpün absorbansı ölçülür.</i>				

5'NT aktivitesi Donald WM'nin tarif ettiği metoda göre yapılmıştır. Metodun prensibi ilk aşamada 5'AMP den fosfatın hidrolizini daha sonra ise açığa çıkan fosfatın molibdat ile sarı renkli fosfo molibdik asite dönüştürülerek 628 nm de spektrofotometrik olarak P ölçülmesi esasına dayanmaktadır¹⁰⁸.

Reaktifler:

1. MnSO₄: 20 mM

2. Tampon: 40 mM; pH:7.5 Na-Barbiturat tamponu

3. NiCl₂: 100 mM

4. AMP : Substrat 10 mM

5. TCA: 0.68M

6. NH₄-Molibdate : 40 mM

7. İndirgeyici Çözelti: 60 mL d. suda 25 g potasyum bisulfate çözülür; 10 mL d. suda 200 mg metilaminofenol sülfat çözülür, iki çözelti karıştırılır ve 100 mL d. suyla seyreltilir.

8. Na-Asetat: 2.5 mM

9. Stok P. çözeltisi : 1.0 mg P/mL, KH₂PO₄

10. Standart P çözelti 10µg/mL stok P çözeltisinden hazırlanır

$$\text{Aktivite (IU/L)} = (\Delta A)_{\text{Sa}} / (\Delta A)_{\text{St}} \times 108$$

3.5.4. Oksidasyona Duyarlık (OD)

10 µM'lık CuSO₄ çözeltisi ile 1/1 (v/v) 60 dakika 37 C da muamele edilen numuneler kullanılarak aşağıdaki tabloya göre MDA tayini yapılır. Metodun prensibi: İki mol TBA asidik ortamda ve 85-100 °C sıcaklıkta bir mol MDA ile birleşerek mor renkli TBA-MDA kompleksini oluşturur. Bu kompleksin verdiği absorbans 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür ¹⁰⁹.

Tablo 4 : Oksidasyona duyarlık tayini

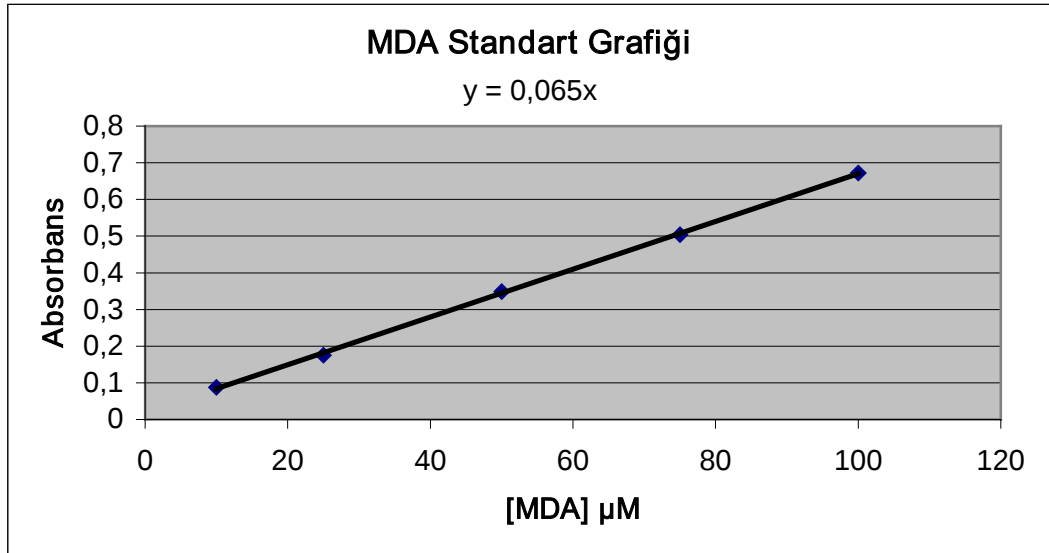
Reaktif (ml)	Numune	N.Körü		
Tampon	1.00	1.00		
Etanol	0.20	0.20		
TBA	1.00	***		
TCA	1.00	1.00		
Numune/Standart	0.10	0.10		
30 Dakika kaynar su banyosunda (80-95 °C) inkübe ettikten sonra çeşme suyu altında veya kendi haline bırakarak soğut, 5000xg de 20 dak santrifüj et. Supernatantları ayır.				
TBA	***	1.00		

İyice karıştırılır ve 532 nm. de her bir tüpün absorbansı kendi körüne veya distile suya karşı okunur.

Reaktifler

1. Tampon çözelti: (100 mM, pH: 6) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (2.13 gr./11.56 gr)
2. % 20'lik TCA çözeltisi (0.6N HCl içerisinde hazırlanır)
4. % 2'lik TBA çözeltisi: 200 mg TBA az miktarda d. suda çözülerek 10 ml'lik çözeltisi hazırlanır.

MDA standartı: 1,1,3,3-Tetraetoksi propan veya MDA standartından farklı konsantrasyonlarda kullanılarak $A = f(\text{konsantrasyon})$ grafiği çizildi.



HESAP (OD): Standart grafiğin eğiminden faydalanılarak yapılır.

3.6. İstatistik

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi ve grafiklerin çizimi istatistik paket programı SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program, for Windows 16.0) ile Microsoft Excel (for windows XP) kullanılarak yapılmış ve ortalama $\pm$ standart sapma ($X \pm SD$) olarak sunulmuştur.

Değerlendirmede çoklu gruplar arası karşılaştırma için One-Way ANOVA analizi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen grupların karşılaştırılması için Nonparametrik Mann-Whitney U testi, parametreler arasındaki korelasyon ilişkisini açıklamak için ise Pearson korelasyon testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

IVF hastalarının bazı karakteristikleri ve hormon değerlerine ait veriler Tablo5 de görülmektedir. Grupların yaş ortalamaları açısından değerlendirildiğinde; normal-zayıf ve zayıf-yüksek grupları arasında anlamlı bir fark bulunmakta olup her iki karşılaştırma için p değeri $p<0.001$ dir.

Siklus öncesi 3. gün FSH değerleri incelendiğinde, zayıf gruba ait FSH düzeyleri her iki gruba göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuş olup, sırası ile $P_{Z-N}< 0.037$ ve $P_{Z-Y}<0.007$ dir.

Ovulasyon indüksiyonda kullanılan toplam gonadotropin dozu'na bakıldığında zayıf grup her iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur ($P_{Z-N} < 0.009$, $P_{Z-Y}<0.001$). Endometrium kalınlığı incelendiğinde, zayıf gruba göre hem normal hem de yüksek grupta anlamlı derecede kalınlaşma tesbit edilmiştir ($P_{Z-N}< 0.002$, $P_{Z-Y}<0.009$).

Toplam Oosit Sayısı olarak normal gruba göre zayıf grupta anlamlı bir düşüş söz konusu iken yüksek grupta anlamlı derecede yükselme söz konusudur ($P_{Z-N}< 0.001$, $P_{Z-Y}<0.001$ ve $P_{Y-N}<0.001$).

2 PN Sayısı, normal göre zayıf grupta anlamlı derecede düşük bulunmasına karşılık, yüksek grupta anlamlı derecede artmış olarak bulunmuştur ($P_{Z-Y}<0.001$, $P_{Y-N}<0.001$).

ICSI Yapılan Oosit Sayısı, normal gruba göre zayıf grupta düşük iken, yüksek grupta anlamlı derecede artmıştır ($P_{Z-N}< 0.001$, $P_{Z-Y}<0.001$, $P_{Y-N}<0.001$).

Embriyo Transfer Sayısı ise normal gruba göre zayıf grupta anlamlı derecede düşük bulunurken, yüksek grupta anlamlı bir değişiklik görülmemektedir ($P_{Z-Y}<0.003$).

EmbriyoTransfer Grade-1 incelendiğinde normal gruba göre zayıf grupta anlamlı bir değişiklik gözlenemezken yüksek grupta anlamlı derecede artış tesbit edilmiştir ($P_{Z-Y}<0.003$).

Tablo 5: IVF hastalarına ait grupların demografik verileri

Veriler	Normal ±SD	Zayıf ±SD	Yüksek ±SD	P Değeri
<i>Kadın Yaşı (yıl)</i>	29.3 ± 5.2	35.1 ± 3.9	26.9 ± 4.3	P _{Z-N} <0.001, P _{Z-Y} <0.001
<i>Siklüs öncesi 3.gün FSH düzeyi (mIU/ml)</i>	6.3 ± 1.6	8.7 ± 4.3	5.7 ± 1.5	P _{Z-N} < 0.037, P _{Z-Y} <0.007
<i>Siklüs öncesi 3.gün E2 düzeyi (pg/ml)</i>	48.7 ± 28.4	94.5 ± 101.1	36.1 ± 16.3	P _{Z-Y} <0.019
<i>Hcg gününde endometrium kalınlığı (mm)</i>	13.2 ± 1.9	10.5 ± 1.8	12.7 ± 2.5	P _{Z-N} < 0.002, P _{Z-Y} <0.009
<i>Toplam Oosit Sayısı</i>	12.9 ± 1.7	3.4 ± 1.29	24.3 ± 6.1	P _{Z-N} < 0.001, P _{Z-Y} <0.001, P _{Y-N} <0.001
<i>2 PN Sayısı</i>	6.1 ± 2.99	2.2 ± 0.9	12.7 ± 6.4	P _{Z-Y} <0.001, P _{Y-N} <0.001
<i>ICSI Yapılan Oosit Sayısı</i>	9.5 ± 2.3	3.2 ± 0.8	16.9 ± 5.8	P _{Z-N} < 0.001, P _{Z-Y} <0.001, P _{Y-N} <0.001
<i>Embriyo Transfer Sayısı</i>	3.1 ± 0.8	2.2 ± 0.9	3.2 ± 0.8	P _{Z-Y} <0.003
<i>EmbriyoTransfer Grade-1</i>	1.7 ± 1.2	1.4 ± 1.1	2.8 ± 1.1	P _{Z-Y} <0.003

IVF folikül sıvılarında yapılan Enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu göstergesi olarak OD seviyelerine ait analiz sonuçları Tablo 2 ve grafiklerde (Grafik 1-6) da görülmektedir.

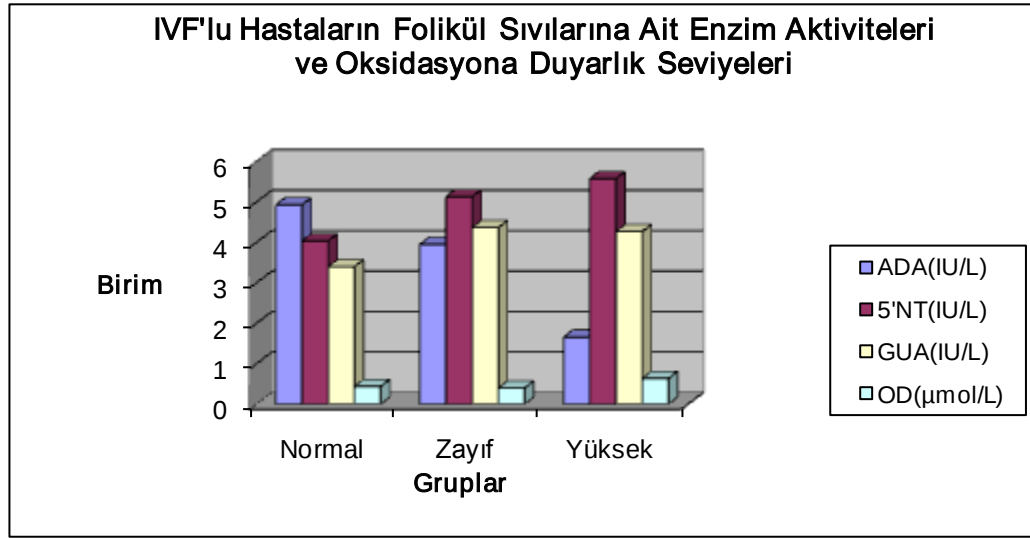
Tablo ve grafiklerden de görüleceği gibi, ADA aktivitesi normal grupla karşılaştırıldığında hem zayıf hem de yüksek grupta azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı düşüş sadece yüksek grupta görülmektedir $p < 0.05$.

5'-NT enzim aktivitesi ile ilgili sonuçlara bakıldığında normal gruba göre kıyaslama yapıldığında zayıf ve yüksek gruplarda bariz bir artış olmasına karşılık istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. GUA aktivitesi de 5'-NT ye benzer olarak normal gruba göre zayıf ve yüksek grupta kısmi artış olmasına karşılık, istatistiksel anlamda bir fark görülmemektedir.

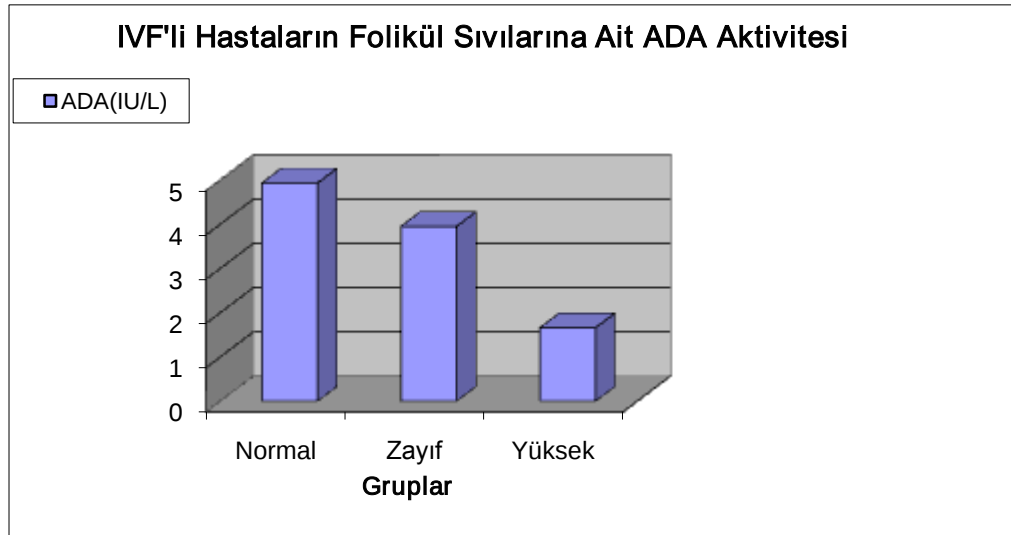
OD seviyelerinde normal grup ile zayıf ve yüksek gruplar arasında anlamlı bir değişiklik olmamasına karşılık, yüksek grupta zayıf grup'a göre anlamlı derecede yükselme tesbit edilmiştir ($p < 0.05$).

Tablo 6. İn vitro Fertilizasyon (IVF) Hastalarının Folikül Sıvılarında Adenozin Deaminaz, 5'Nükleotidaz ve Guanaz Enzim Aktiviteleri ile Oksidasyona Duyarlık Seviyeleri ($\bar{X} \pm SS$)

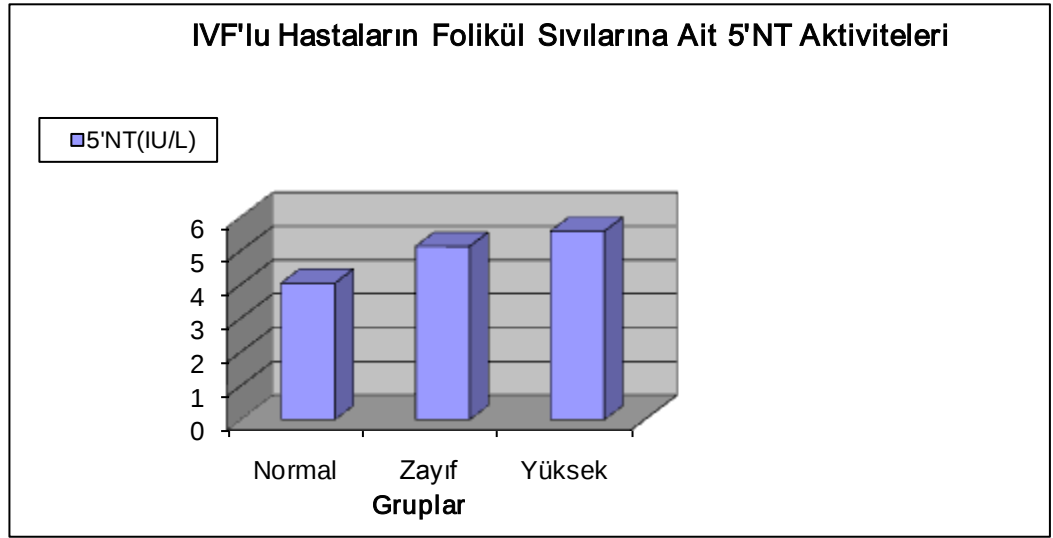
Grup	ADA(IU/L)	5'NT (IU/L)	GUA (IU/L)	OD (nmol/mL)
Normal (I)	4.93 $\pm$ 2.16	4.04 $\pm$ 2.07	3.40 $\pm$ 2.51	0.44 $\pm$ 0.21
Zayıf (II)	3.95 $\pm$ 1.82	5.13 $\pm$ 2.19	4.37 $\pm$ 2.39	0.40 $\pm$ 0.23
Yüksek (III)	1.66 $\pm$ 1.29	5.58 $\pm$ 2.42	4.27 $\pm$ 2.31	0.64 $\pm$ 0.28
<i>İstatistiksel Değerlendirme8Mann Whitney-U test)</i>				
I-II	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
I-III	$P < 0.025$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
II-III	$P < 0.001$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$P < 0.05$



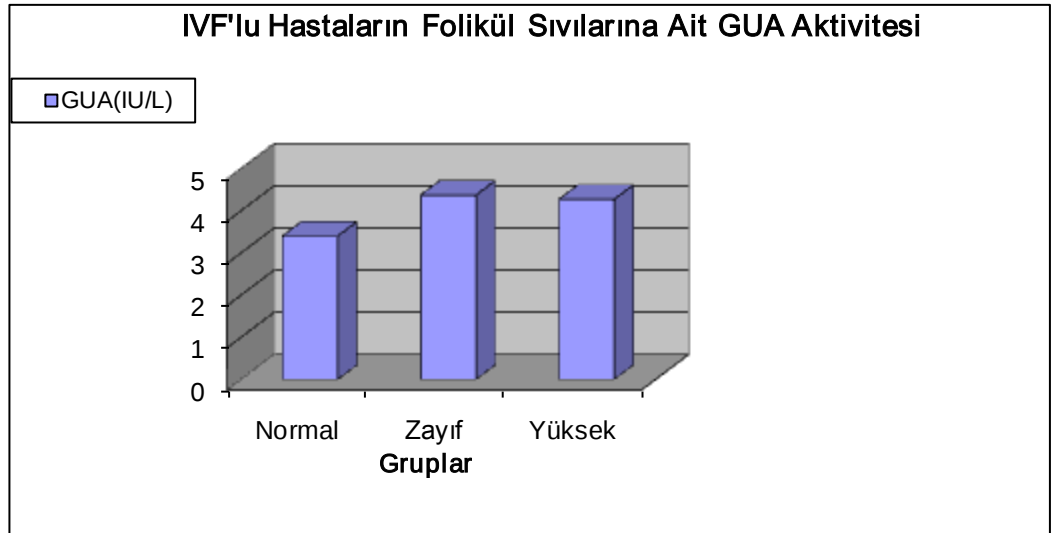
Grafik 1. Folikül sıvılarına ait ADA, 5'NT ve GUA Enzim Aktiviteleri ve Oksidasyona Duyarlık Seviyeleri



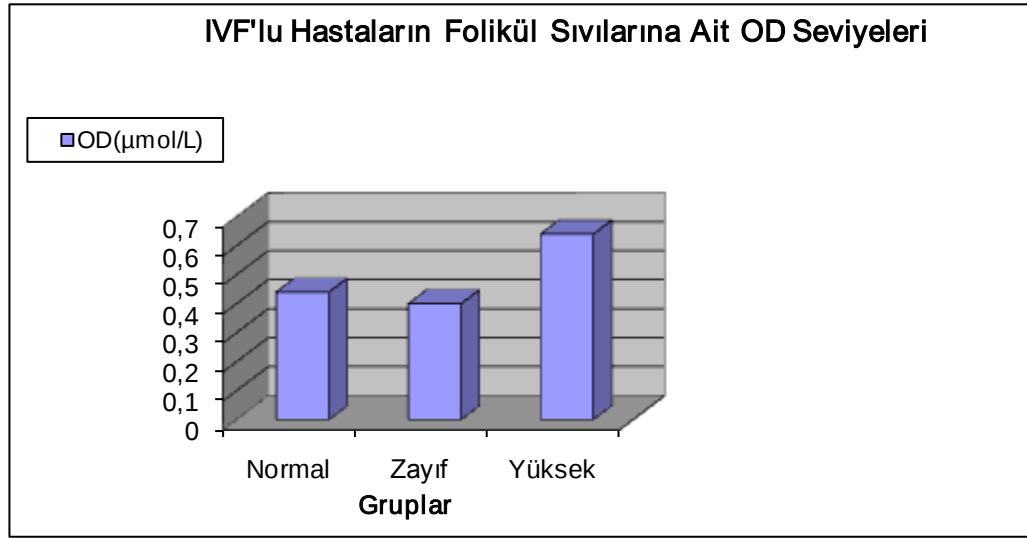
Grafik 2: Folikül sıvısı ADA (IU/L) aktivitesi



Grafik 3: Folikül sıvısı 5'NT (IU/L) aktivitesi



Grafik 4: Gruplara ait folikül sıvısı GUA Aktivitesi



Grafik 5: Gruplara ait folikül sıvısı OD Seviyelerierleri

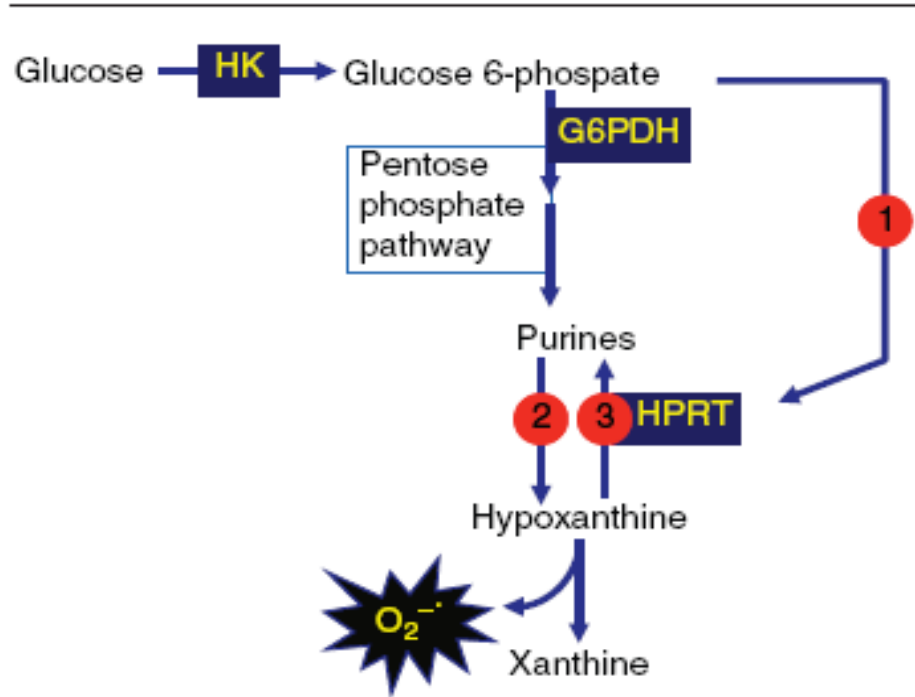
5. TARTIŞMA

Biyolojik sistemlerde metabolizma ve çevresel faktörler sonucunda moleküller oksijenden süperoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi, diğer bileşiklerden de N ve S kaynaklı bazı reaktif türler meydana gelmektedir. Meydana gelen bu reaktif türlerin (radikal yapılar), konsantrasyonundaki artış vücutta önemli fonksiyonlara sahip moleküllere, hücre zarı, DNA ve makromoleküllerden proteinler ve özellikle çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek, hücresel bütünlüğün bozulmasına ve dolayısı ile de değişik hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Oluşabilecek muhtemel hasarlar enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri tarafından etkisiz hale getirilmektedir.

Ksantin oksidaz inhibisyonu embriyolarda ROT azalmasına neden olmaktadır⁹³, öte yandan hipoksantin fare embriyolarında 2-hücreli bloğa neden olur ve pürinler in vitro olarak fare embriyosu gelişmesini inhibe etmektedir⁹⁴. Fare blastositlerinde ksantin oksidaz aktivitesi gözlenmemiş olmasına karşın,⁹⁵ cAMPi düzeylerini uyarıcı olduğu bilinen bileşiklerin eklenmesinin hipoksantin aracılık ettiği 2-hücreli bloğun üstesinden gelebilmesi bu yapay gelişim bloklanmasında pürin kurtarılmasının rol aldığını düşündürmektedir. 2-hücreli blok zamanında embriyolarda ROT üretiminde artış olması ksantin oksidazın pürin nükleotidleri ile yıkımından köken alabilir. Sonuç olarak, O_2^- ve böylece H_2O_2 fare 2 hücreli embriyolarında ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilebilir.

Zigot genomik aktivasyonundan (ZGA) önce pürin katabolizması hızlanabilir: Adenozin deaminaz aktivitesi bu zamanda maksimumdur. Bu dönem embriyonik genom tarafından transkripsiyon aktivasyonu ve önceden var olan maternal mRNA'nın büyük kısmının inaktivasyonu veya yıkımıyla belirginleşir. Bu zamanda, hipoksantin fosforibozil transferaz (HGPRT) aktivitesi pürin kurtarılmasında ve ROT oluşumunun sınırlandırılmasında rol oynayabilir. HGPRT aktivitesinin

inhibisyonu ksantin oksidaz yoluyla hipoksantinin ksantine dönüşmesini ve süperoksit anyonlarının üretilmesini indükler. Glukoz farelerde HGPRT aktivitesini inhibe eder (Şekil 10) ve bu inhibisyon farelerde gelişimin durmasına neden olur. Sığır embriolarında ROT oluşumuna kısmen ortamdaki yüksek glukoz konsantrasyonu neden olurken ⁹⁶, pürinler in vitro fare embriyo gelişmesini inhibe eder ⁹⁴.



Şekil 10: Glukoz, pürin metabolizması ve reaktif oksijen türleri üretimi arasındaki etkileşimler.

Şekile göre sonuç şu şekilde açıklanabilir;

1. Glukoz hipoksantin fosforibozil transferaz (HPRT) aktivitesini embriyoda inhibe etmektedir ve daha sonra hipoksantin üretiminde bir artışa neden olmaktadır.
2. Pürin yıkılması ve
3. Pürin kurtarma⁹⁷.

Hidroksil radikalleri bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer ve DNA dizisinin kırılmasına yol açarlar^{98,99}. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'yı etkileyerek hücre disfonksiyonuna, hatta ölümüne yol açar.

ROT ve RNT ile DNA hasarları oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon gibi çok çeşitli yollarla olabilmektedir^{100,101}. Singlet oksijen ise guanine bağlanarak DNA hasarı oluşturabilir¹⁰². Oksidanlar DNA'yı direk etkileme yanında, gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerinde veya enzimlerde meydana gelen değişiklikler aracılığı ile de DNA hasarına yol açabilirler^{98,99}. Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar mutagenezise, kansere ve yaşlanmaya yol açmaktadır¹⁰³.

Folikül fonksiyonuyla ilgili olarak, follikül sıvısında biyokimyasında değişiklikler meydana gelmekte ve bu durumun hem hücresel hem de kromozomal düzeyde insan oositlerinin gelişim potansiyelini etkilediği bilinmektedir. Folikül sıvısı, granüloza ve teka hücreleri tarafından salınan pek çok büyüme faktörleri ve sitokinleri içermektedir.

Overyan yaşılanmanın, foliküler sıvıda artmış oksidatif stresle ilişkili olduğu öne sürülmüştür. IVF yapılan yaşlı kadınlar genç kadınlarla karşılaştırınca, yaşılanan ratlarla yapılan bir çalışmada, prostaglandin F2 alfa (PGF 2 α) ~~indeleri~~ indüklenen luteolizisin azalmış murin yumurtalarda miyotik içciklerin bozukluklarına yol açtığı ve bu nedenle dejenerasyon veya apoptozis ortaya çıkabileceği belirtilmektedir. Yaşlanmış gametlerden çoğu anöplodik olmak üzere kötü kalitede embriyolar meydana geliyor.

Metal şelasyonu lipid peroksidasyonunu ve DNA parçalanmasını kontrol etmenin temel bir aracıdır ve transferrin gibi metal bağlayıcı proteinler potansiyel radikal oluşturucu reaksiyonların kontrolünde merkezi öneme sahiptir. Albüminden sonra, tubal sıvıda en bol bulunan protein transferrindir.

Fizyolojik şartlar altında LH ve HCG, bu faktörlerin salınımını stimüle eder. Bunun sonucunda da oosit maturasyonunu dolayısıyla fertilizasyon oranı etkilenir.

Bu çalışmada pürinlerin yıkım yolunda görev alan enzimlerden 5'nükleotidaz, Adenozin deaminaz, Guanaz enzimleri ile lipid peroksidasyonuna karşı direnci değerlendirmek amacı ile Oksidasyona duyarlılık seviyelerini insan foliküller sıvısındaki (FS) değişimleri normal, zayıf ve yüksek cevap gruplarında araştırılmıştır.

Oksidatif stresin yardımcı üreme teknikleri sonuçlarına etkisini tartışan bir başka çalışmada FF'da lipid peroksidaz (LPO) ve TAC konsantrasyonları incelenmiştir. Buna göre aynı yaş grubundaki hastalardan normal, zayıf ve yüksek gruplarına ait folikül sıvılarına ait TAC ve LPO ile gebelik oranları arasında sırası ile istatistiksel olarak anlamlı

derecede pozitif ve negatif bir korelasyonun olduğu belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda yine zayıf over kapasiteli hastalarda, normal ve yüksek over kapasiteli hastalarla karşılaştırıldığında normal grup ile zayıf ve yüksek arasında anlamlı bir fark bulunamazken, zayıf gruba göre yüksek grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede bir yükselme sözkonusudur ($p<0.05$). Bu durum yüksek gruptaki yumurtaların endojen ve eksojen radikalik ya da diğer oksidasyon ajanlarına karşı iyi bir koruma sağladığını göstermektedir.fark gözlenememiştir.

Konumuzla ilgili diğer çalışmalara baktığımızda, pürin yıkım yolu ile ilgili olarak adenosin metabolizmasında görev yapan enzimlerin in vitro inhibisyonları ile, fertilizasyonun doza bağımlı olarak aktive olduğu görüldüğü belirtilmiştir ¹⁰⁰. Bir diğer çalışmada ise; Adenosinin foliküler sıvıdaki seviyesi oocyte (oosit) yaşamı ve fonksiyonu açısından önemli olduğu vurgulanmıştır ¹⁰¹. Yine bir çalışmada Foliküler sıvıdaki oksidan stres; ovaryan hormonların etkileri ve gonadotropin stimülizasyonu açısından önemli bir risk faktörü olduğu söylenmiştir ¹⁰². Oksidatif stresin, sağlıklı embriyo gelişimi açısından önemli bir risk faktörü olduğunu söyleyen çalışmalar da vardır ¹⁰³. Başka bir çalışmada; Sığır embriyolarının oksidan faktörlere maruz bırakılmasının oosit fertilizasyonunu ciddi şekilde engellediği belirtilmiştir ve bu durum oksidan stresin bu açıdan çok önemli bir risk faktör olduğunu göstermektedir ¹⁰⁴. Diğer bir çalışma; Piruvat gibi bir oksidan madde ile muamele hücrenin redoks dengesini bozarak, sağlıklı embriyo gelişimini engellemektedir denmektedir ¹⁰⁵.

Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar; gruplarımız arasında oksidasyon hassasiyetleri açısından normal ve zayıf grup ile normal ve zayıf arasında bir fark olmadığını, ancak zayıf ile yüksek grup arasında anlamlı bir direnç farkının olduğunu ortaya koymaktadır. ADA aktivitesi çalışma gruplarımızda normal gruba nazaran daha düşük bulunmuştur. Buna karşılık diğer enzimler açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Düşük ADA aktivitesinin, düşük nükleotid seviyelerinin bir neticesi olabileceği kanaatindeyiz.

Literatürde bazı araştırmacıların elde ettiği sonuçlar ise, oksidan stresin sağlıklı embriyo gelişimi açısından önemli bir risk faktörü olabileceğini göstermektedir. Eğer durum böyleyse, antioksidanların doğrudan kullanımı veya oksidan stres oluşturan faktörlerin ve kimyasal reaksiyonların inhibisyonu fertilizasyon açısından önemli olabileceği söylenebilir. Ayrıca; sağlıklı fertilizasyon için hücre içi nükleotid seviyelerinin de belirli bir düzeyin üzerinde olmasının önemli olabileceği, bu bakımdan da nükleotid yıkımını azaltacak veya kurtarıcı (Salwage) yol ile hücre içi seviyesini arttıracak faktörlerin bu bakımdan faydalı sonuçlar verebileceği görülmektedir. Çalışma grubumuzda bulduğumuz düşük ADA düzeyi bu bakımdan bir risk durumunu (düşük adenin ve adenozin seviyelerini) ifade edebilir. Bu çelişkili sonuçlar ışığında, konunun aydınlığa kavuşturulması için ileri çalışmaların yapılmasının daha açıklayıcı bilgiler sağlayacağı kanaatindeyiz.

6.ÖZET

Bu çalışmada invitro fertilizasyon hastalarından zayıf, normal ve yüksek responder gruplarına ait toplam 45 hastanın folikül sıvılarında purin-pirimidin metabolizmasında görev alan enzimlerden ADA, 5'NT, GUA aktiviteleri ile oksidan antioksidan statü hakkında fikir sahibi olabilmek açısından oksidasyon duyarlılığı (OD) araştırıldı. ADA aktivitesinde normal gruba zayıf ve yüksek grubu karşılaştırıldığında, hem zayıf hem yüksek grupta azalma olduğu fakat anlamlı azalmanın sadece yüksek grupta olduğu tespit edildi. 5' Nükleotidaz ve guanaz aktivitelerine bakıldığında, normal gruba göre zayıf ve yüksek gruplarda bir artış olduğu fakat bunun anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi. Oksidasyona duyarlılık aktivitesindeyse normal gruba zayıf ve yüksek grup arasında çok fark olmamasına karşın, yüksek grupta zayıf gruba göre anlamlı derecede yükselme tesbit edilmiştir. Bu durum yüksek gruptaki yumurtaların endojen ve eksojen radikalik ya da diğer oksidasyon ajanlara karşı iyi bir koruma sağladığını göstermektedir. IVF'li hastaların oksidant-antioksidan statülerini daha iyi açıklayabilmek için daha fazla sayıda örnek ve hem enzimatik hem de enzimatik olmayan parametrelerin birlikte incelenmesi ile aydınlatılabileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler: Adenozin deaminaz, Guanaz, 5'Nükleotidaz, Oksidasyona direnç, folikül sıvısı

7. SUMMARY

In this study, activities of ADA, 5' NT and GUA enzymes which participate in the nucleotide metabolism, and oxidation sensitivity test were studied in follicular fluids from 54 in vitro fertilization patients who respond weak, normal and high efficiency with the aim of gaining information about oxidant/antioxidant status of the fluids. As to the ADA activity, it has been observed that activity is lower in both study groups relative to the controls, but the difference is meaningful only in high respond group from statistical point of view. In the 5'NT and GUA activities, no meaningful differences were observed even there were slight but unmeaningful decreases in both enzyme activities in the study groups. Concerning the oxidation sensitivity values, there were no differences between control and study groups. However, the value was higher in high respond group relative to low one. This scheme shows that there is strong protective mechanisms in high respond group against oxidant stress factors. However, it has been concluded that other oxidant/antioxidant parameters including enzymatic and non enzymatic ones should also be studied by using more samples to obtain more correct information about the case.

Key Words:Adenosine deaminase, Guanase, 5'Nucleotidase, Resistance of oxidation, follicular fluids

8. KAYNAKLAR

- 1.** Grever MR, Coleman MS, Balcerzak SP, et al. Adenosine Deaminase and Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Biochemical Markers in the Management of Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer Research* 1983; 43: 1442-1445.
- 2.** Ho AD, Ganeshaguru K. Enzymes of purine metabolism in lymphoid neoplasm clinical relevance for treatment with enzyme inhibitors. *Klin Wochenscher* 1988;66: 467-474.
- 3.** Ho AD, Dörken B. Purine Degradative Enzymes and Immunological Phenotypes in Chronic B- Lymphocytic Leukemia, Indication that Leukemic Immunocytoma is a Separate Entity. *British Journal Of Haematology* 1986; 62: 545-555.
- 4.** Trangas T, Courtis N, Gounaris A. Patterns of Adenosine Deaminase, Ecto-5'- Nucleotidase, Poly (A) Polymerase and Surface Light Chain Expression in Chronic Lymphocytic Leukemias. *Blut* 1989; 58: 187- 193.
- 5.** Tritsch GI, Niswander PW. Purine Catabolism as a Source of Superoxide in Macrophage. *Annals Newyork Akademy of Science* 1985;451: 279-291.
- 6.** Vivekanandhan S, Soundararajan C C, Tripathi M, Maheshwari MC. Adenosine Deaminase and 5' Nucleotidase Activities in Peripheral Blood T Cells of Multiple Sclerosis Patients. *Neurochemical Research* 2005; 30: 453 –456.
- 7.** Balis ME. Adenosine Deaminase and Malignant Cells. *Annals New York Academy of Sciences* 1985; 45: 142- 149.
- 8.** Dornand J, Bonnafoous JC, Favero J, Ecto 5'- nucleotidase and Adenosine Deaminase Activities of Lymphoid Cells. *Biochemical Medicine* 1982; 28: 144-156.
- 9.** Whisler RL, Murray JL, Roach RW, Balcerzak SP . Characterization of multiple immune defects in human malignant lymphoma. *Cancer* 1984; 53: 2628-2634.

- 10.** Poplack DG, Blatt J, Reaman G. Purine Pathway Enzymes Abnormalities in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Research* 1981; 41: 4821-4832.
- 11.** Ratech H, Martinuk F, Borer WZ. Differential Expression of Adenosine Deaminase Isoenzymes in Acute Leukemia. *Blood* 1988; 72 : 1627-1632.
- 12.** Vives JL, Rozman C, Pujades MA. Combined Assay Adenosine Deaminase, Purine Nucleoside Phosphorylase and Lactate Dehydrogenase in the Early Clinical Evaluation of B-Chronic Lymphocytic Leukemia. *American Journal of Hematology* 1988; 27: 157-162.
- 13.** YÜREGİR, G. : Temel biyokimya 1. 3. Baskı, Çukurova Üniv. Tıp Fak. Yayınları, Adana, 1988; 152-153.
- 14.** Gözükkara, E. : Biyokimya 2. 2. Baskı, Evin Matbaası, Malatya, 1994; 665-666.
- 15.** Goldberg, DM. : Serum Adenosine Deaminase in the Differential Diagnosis of Jaundice. *Brit Med J.* 1995 1 : 353-355
- 16.** SOLOMON, JB. : Constitutive Enzymes of the; Developing Chick Embryo: Adenosine Deaminase. *Biochem J.* 1959 75 : 278-284.
- 17.** N. O. Kaplan in S:P. Colowick & N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology.* Academic Press, New York 1951, Vol. 2, p. 473.
- 18.** T.G. Brady, *Biochem. J.* 36, 478 [1942].
- 19.** J.L. York & G. A. LePage, *Canad. J. Biochem.* 44, 331 [1966].
- 20.** R. M. Smillie, *Arch. Biochem.* 67, 213 [1957].
- 21.** W. K. Jordan, R. March, O. B. Houchin & E. Popp, *J. Neurochem.* 4, 170 [1959].
- 22.** T. G. Brady & C. I. O' Donovan, *Biochem. J.* 80, 17 [1961].
- 23.** B. Galanti & G. Giusti, *Minerva Med.* 59-II, 5867 [1968].
- 24.** G. Giusti, *Pol. Arch. Med. Wewn.* 44, 524 [1970].
- 25.** Daddona, P.E., Orkin, S.H., Shewach, D.S and Kelley, W.N.: cDNA and Amino acid Sequence of Human Adenosine Deaminase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1985; 451: 238-244.

- 26.** Wilson, D.K., Rudolph, F.B., Quijcho, F.A.: Atomic Structure of Adenosine Deaminase Complexed with Transition-State Analge: Understanding Catalysis and Immunodeficiency Mutations. *Science*. 1991 252:1278-1284.
- 27.** Bloom GE. Leukocyte adenosine deaminase phenotypes in acute leukemia. *Cancer* 1972; 29: 1357-60.
- 28.** Koizumi H, Tomizawa K, Tanaka H, Kumakiri M, Ohkawara A. Clinical significance of serum adenosine deaminase activity in patients with mycosis fungoides. *J Dermatol* 1993; 20: 394-399.
- 29.** Balıs ME. Adenosine Deaminase and Malignant Cells. *Annals New York Academy of Sciences* 1985; 45:142- 149.
- 30.** Ratech H, Martinuik F, Borer WZ. Differential Expression of Adenosine Deaminase Isoenzymes in Acute Leukemia. *Blood* 1988; 72 : 1627-1632.
- 31.** Gökbulut, I. 2000. Çeşitli Göğüs Hastalıklarında Bronşial Lavaj Sıvısı ve Plazmada Ksantin Oksidaz ve Adenozin Deaminaz Aktiviteleri ile Nitrik Oksit ve Malondialdehit Seviyeleri. Yüksek Lisans Tezi, Malatya 475.
- 32.** Aoki, Y., Katoh, O., Nakanishi, Y., Kuroki, S., Yamada, H.: A Comparison Study of IFN γ , ADA, and CA 125 as Diagnostic Parameters in Tuberculous Pleuritis. *Respiratory Medicine* 1994; 88: 139-143.
- 33.** Baganha, M.F., Pego, A., Lima, M.A., Gaspar, E.V., Cordeiro, A.R: Serum and Pleural Adenosine Deaminase. *Chest* 97: 605-610, 1990.
- 34.** Banales, J.L., Pineda, P.R., Fitzgerald, J.M., Rubio, H., Selman, M., Salazar-Lezama, M.: Adenosine Deaminase in the Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusions. *Chest*. 1991; 99:355-357.
- 35.** Fontan Bueso, J., Vereá Hernando, H., García-Buela, J.P., Domínguez Juncal, L., Martín Egana, M.T., Montero Martínez, M.C. Diagnostic Value of Simultaneous Determination of Pleural Adenosine Deaminase and Pleural Lysozyme/Serum Lysozyme Ratio in Pleural Effusions. *Chest* 1998; 93(2): 303-307.

- 36.** Chiang, C-S., Chiang, C-D., Lin, J-W., Huang, P-L., Chu, J-J.: Neopterin, Soluble Interleukin-2 Receptor and Adenosine Deaminase Levels in Pleural Effusions. *Respiration* 1994; 61:150-154.
- 37.** Moriwaki, Y., Kohjiro, N., Itoh, M., Nakatsuji, Y., Okada, M., Ishihara, H., Tachibana, I., Kokubu, T.: Discrimination of Tuberculosis from Carcinomatous Pleural Effusion by Biochemical Markers: Adenosine Deaminase, Lysozyme, Fibronectin and Carcinoembryonic Antigen. *Japan J. Med.* 1989; 28;4: 478-484.
- 38.** Ocana, I., Martinez-Vasquez, J., M., Segura, R.M., Fernandez-de-Sevilla T., Capdevika, J.A.: Adenosine Deaminase in Pleural Fluids. *Chest.* 1983; 84: 51-53.
- 39.** Orphanidou, D., Gaga, M., Rasidakis, A., Dimakou, K., Toumbis, M., Latsi, P., Pandalos, J., Christacopoulo, J., Jordanoglou, J.: Tumor Necrosis Factor, Interleukin-1 and Adenosine Deaminase in Tuberculous Pleural Effusion. *Respiratory Medicine* 90: 95-98, 1996.
- 40.** Dolezal T. Adenosine deaminase review of physiological roles 2001. Available from: URL: <http://www.entu.cas.cz/fyziol/seminars/ada.htm>
- 41.** Ciliv, G., Emerk, K., Karan, A.: İnsan Biyokimyasına Giriş. 2. Baskı, Hacettepe Üniv. Yayınları, Ankara 1980; 266-267.
- 42.** Kellems, RE., Yeung, CY., Ingolia, DE.: Adenosine Deaminase Deficiency and Severe Combined Immunodeficiencies. *Trends Genet.* 1985;1:278-283.
- 43.** Meykens, FL., Williams, HE. : Adenosine Metabolism in Human Erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1971; 240: 170-179.1971.
- 44.** Franco, R., Aran, JM., Colomer, D., Matutes, E., Vivescorrons, JL. : Association of Adenosine Deaminase with Erythrocyte and Platelet Plasma Membrane : An Immunological Study Using Light and Electron Microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1990; 38 : 653-658.

- 45.** KANE, BJ., KUHN, JG., ROUSH, MK.: Pentostatin: An Adenosine Deaminase Inhibitor for the Treatment of Hairy Cell Leukemia. *Ann Pharmacother.* 1992; 26: 939-947.
- 46.** KORKMAZ, M., KOCABEY, Z.: *Biyokimya İpuçları*. Saray Tıp Kitabevi, İzmir, 1985; 34-35.
- 47.** CARSON, DA., IIZASA, T., SETO, S., CARRERA, CJ., KUBOTA, M., WILLIS, EH., WASSON, DB., KAJANDER, O.: Metabolic Basis for Immune Dysfunction in Adenosine Deaminase Deficiency. *Ann N Y Acad Sci.* 1985; 451: 34-41.
- 48.** Dikmen N, Özgünen T. *Harper Biyokimya* .25.Baskı. İstanbul: Nobel Kitapçılık; 2004; 375-401.
- 49.** R. Levine, T. C. Hall & C. A. Harris, *Cancer* 16, 269 [1963].
- 50.** E. M. Knights, J. L. Whitehouse, A. C. Hue & C. L. Santos, *J. Lab. Clin. Med.* 65, 355 [1965].
- 51.** E. Bowkiewicz-Surma & J. Krawczynski, *Clin. Chim. Acta* 16, 29 [1967].
- 52.** G. Giusti & B. Galanti, *Minerva Med.* 56.II, 4448 [1965].
- 53.** R. K. Morton, *Biochem. J.* 55, 786 [1953].
- 54.** R. K. Morton, *Biochem. J.* 57, 231 [1954].
- 55.** Enien WM , Sahwy SE., Haris CP Serif MW, Elstein M, et al. Human chorionic gonadotropin and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with successful fertilization and cleavage of human oocytes in vitro fertilization cycles. *Human Reproduction*, 10, 2840-2844.
- 56.** Hartshorne GM. Preovulatory follicular fluid: relationship to ovarian stimulation protocol, fertilization, and sperm penetration in vitro. *Fertility and Sterility* 1989; 52:998-1005.
- 57.** Styne-Gross A, Elkind-Hirsch K, Scott RT, Jr. Obesity does not impact implantation rates or pregnancy outcome in women attempting conception through oocyte donation. *Fertil Steril*, 2005; 83(6): p. 1629-34.
- 58.** Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A, et al. Incidence and main causes of

infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991; 811-6.

59. Schlegel PN, Girardi SK. In vitro fertilization for male factor infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997; 82(3): 709-716.

60. Cahil DJ. What is the optimal medical management of infertility and minoendometriosis? *Human Reproduction* 2002; 17(5): 1135-1140.

61. Diamond E. Lysis of postoperative pehvic adhesions in infertility. *Fertil Steril* 1979; 34-8.

62. Gomel V. Salpmgo-ovanolysis by laparoscopy m infertility. *Fertil Stenl* 1983; 40-607.

63. Donnez J, Casanas-Roux F. Prognostic factors of fimbnal microsurgery. *Fertil Steril* 1986; 46-200.

64. Dubuisson JB, Bouquet de Joliniere J, Aubriot FX, Darai E, Foulot H, Mandelbrot L,et al. Terminal tuboplasties by laparoscopy 65 consecutive cases. *Fertil Steril* 1990; 54- 401.

65. Canis M, Mage G, Pouiy JL, Manhes H, Wattiez A, Bruhat MA,et al. Laparoscopic distal tuboplasty report of 87 cases and a 4-year experience, *Fertil Steril* 1991;56-616.

66. Dlugi AM, Reddy S, Saleh WA, Mersol-Barg MS, Jacobsen G,et al. Pregnancy rates after operative endoscopic treatment of total (neosalpingostomy) ornear total (salpmgostomy) distal tubal occlusion *Fertil Stenl* 1994; 62-913.

67. Taylor RC, Berkowitz J, McComb PF.,et al. Role of laparoscopic salpmgostomy in the treatment of hydrosalpinx, *Fertil Steril*. 2001; 75-594.

68. Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M,et al. Moderate and severe endometnosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2000;73 344.

69. Illera MJ, Juan L, Stewart CL, Cullinan E, Ruman J, Lessey BA,et al. Effect of peritoneal fluid from women with endometnosis on implantation in the mouse model. *Fertil Steril* 2000;74-41.

70. Padilla SL. Ovanan abscess following puncture of an endometnoma dung ultrasound-guided oocyte retneval. *Hum Reprod* 1993;8-1282.

71. Younis JS, Ezra Y, Laufer N, Ohel G,et al. Late manifestation of pelvic abscess following oocyte retneval, for in vitro fertilization, in patients with

severe endometrosis and ovarian endometriomas, *J Assist Reprod Genet* 1997;14-343.

72. Bernard JB., Pineau C., Toppari J. Spermatogenesis in vitro in mammals. In *Assisted Reproductive Technology*. Jonge CD, Barratt CLR, eds. Cambridge University Press: Cambridge;2002.

73. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New Engl J Med* 2001; 345-1388.

74. van der Westerlaken LA, Naaktgeboren N, Helmerhorst FM, et al. Evaluation of pregnancy rates after intrauterine insemination according to indication, age, and sperm parameters. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15-359.

75. Miller DC, Hollenbeck BK, Smith GD, Randolph JF, Christman GM, Smith YR, Lebovic DI, Ohl DA, et al. Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination, *Urology* 2002; 60-497.

76. Van Voorhis BJ, Barnett M, Sparks AE, Syrop CH, Rosenthal G, Dawson J. et al. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2001;75-661.

77. Lee RK, Hou JW, Ho HY, Hwu YM, Lin MH, Tsai YC, Su JT, et al. Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. *Int J Androl* 2002; 25-277.

78. Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A, editörler. *Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd Sti; 2004.

79. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2 1978; 366.

80. Boldt J, Howe AM, Parkerson JB, Gunter LE and Kuehn, E, et al. Carbohydrate involvement in sperm-Egg Fusion in Mice. *Biol. Reprod.* 1989, 40(4): 887-896.

81. Robert D, Vincent JR, MD: In vitro fertilization and other assisted reproductive techniques. In David H. Chestnut (eds): *Obstetric anesthesia* Mosby Inc. 1999:249-262.

82. Aydos K. Sperm kapasitasyonu, hiperaktif motilite ve akrozom reaksiyonu. [internette] 19.12.2002 elektronik adresi:

<http://www.androloji.info/img/Ders5.JPG>

- 83.** Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, et al. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa in to human oocytes. *Fertil Steril* 1988; 49:835.
- 84.** Iritani A. Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. *Mol Reprod Dev* 1991; 28:199.
- 85.** Palermo G, Joris H, Devroey P, el al. Sperm characterictics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1993; 5:826.
- 86.** Speroff, L. and M.A. Fritz. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 7thed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. x, 1334 p; 2005.
- 87.** Tabibzadeh S. and Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod*, 1995; 10(6): p. 1579-602.
- 88.** Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human: Clinically oriented embryodgy*, 6th edn. Philadelphia: WB Saunders, 1998; 44.
- 89.** Nasr-Esfanai MH, Johnson. The origin of reactive oxygen species in Mouse embryo cultred in vitro block to development of the Mouse preimplatation embryo. *J.Reprod. Fertil*,1991, 96, 41-48.
- 90.** Nureddin A, Epsaro E, Kiessling AA. Purines inhibit the development of Mouse embryo in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 1990, 90, 445-464.
- 91.** Alexiou M, Leese HJ. E nzymes of purine salvage and catabolism in the Mouse preimplatation embryo measured by high performance liquid chromatography. *J. Reprod. Fertil.*, 1994, 101, 151-158.
- 92.** Wata H, Akamatsu S, Minami N. Et al. Effect of antioxidants on development of bovine IVM/IVF embryos in various concentratsion of glucose. *Theriogenology*,1998, 50, 365-375.
- 93.** Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001; 7(2):175-89.
- 94.** Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. Jan 1994; 74 (1): 139-162.

- 95.** Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am. J Med* 1991(Suppl 3C); 3C-23S – 3C-30S.
- 96.** Dizdaroglu M. DNA and Free Radicals. Ellis Horwood, Chichester 1993; 19–39.
- 97.** Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1991; 281: 9–19.
- 98.** Van den Akker E, Lutgerink JT, Laqueur MVM, Joenje H. Retel J. The formation of one-G deletions as a consequence of single-oxygeninduced DNA damage. *Mutat Res.* 1994; 309: 45-52.
- 99.** Totter JR. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1763–7.
- 100.** Monks NJ, Fraser LR. , Inhibition of adenosine-metabolizing enzymes modulates mouse sperm fertilizing ability: a changing role for endogenously generated adenosine during capacitation, *Gamete Res.* 1988 Nov;21(3):267-76.
- 101.** Wen X, Perrett D, Jones N, Tozer AJ, Docherty SM, Iles RK. , High follicular fluid adenosine levels may be pivotal in the metabolism and recycling of adenosine nucleotides in the human follicle, *Metabolism.* 2009 Dec 31.
- 102.** Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani A, Groome NP, Muttukrishna S. , Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation, *Fertil Steril.* 2008 Apr;89(4):912-21.
- 103.** Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. , Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings, *Hum Reprod Update.* 2001 Mar-Apr;7(2):175-89.
- 104.** Silva PF, Gadella BM, Colenbrander B, Roelen BA. , Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage, *Theriogenology.* 2007 Feb;67(3):609-19. Epub 2006 Oct 23.
- 105.** Dumollard R, Ward Z, Carroll J, Duchén MR. , Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo, *Laboratoire de Biologie du Développement UMR 7009 CNRS/Paris VI, Observatoire, Station Zoologique, Villefranche sur Mer, France.*

- 106.** Enzyme Activities. Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer HU, Verlag Chemia Gmbh Weinheim, Bergest, 1974.
- 107.** Caraway VT . Colorimetric Determination of Serum Guanase Activity. Clinical Chemistry 12(4): 187-193, 1966.
- 108.** Donald WM (1986). Enzymes. In: Tietz NW, ed. *Text book of clinical chemistry*. W.B. Saunders Company: Philadelphia, USA, pp. 718–720.
- 109.** Van Ye TM, Roza AM, Pieper GM, Henderson J Jr, Johnson CP, Adams MB. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphological damage. *J Surg Res* 1993; 55: 553–558.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Zahide Esra

Soyadı: DURAK

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 28.08.1985

e-posta: zaesrad@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

1991-1996: Ankara Bahçelievler Ulubatlı Hasan İlköğretim Okulu,

1996-1998 : Ankara Üniversitesi Geliştirme Vakfı Özel Lisesi,

1998-2003: Özel Sevgi Lisesi

2003 -2008: Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği (Bir yıl İngilizce hazırlık)

Stajımı 2007 yaz döneminde Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü İlaç ve Kozmetik bölümünde,

2008 yaz döneminde Ülker Birlik Anonim Şirketi Un ve Bisküvi Fabrikasında yaptım.

2009- Bahar döneminde Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde (Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında) yüksek lisans yapmaya başladım.

Yabancı dilim İngilizcedir.

10.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve bu tezin gerçekleştirilmesinde, başlangıcından sonuna kadar, gerekli bütün tavsiye ve yönlendirmeleriyle bana büyük yardımı olan tez danışmanım ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU' ya;

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU' na;

Yüksek Lisans eğitimim boyunca teorik derslerimde değerli bilgi birikim ve tecrübelerini benimle paylaşan tüm Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bugünlere ulaşmamı sağlayan değerli aileme sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.